

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Ottimizzazione di colture microalgali in un
contesto industriale mediante lo studio delle
condizioni di crescita mixotrofiche e selezione di
mutanti casuali.**

Relatore: Prof. Tomas Morosinotto

Dipartimento di Biologia

Controrelatore: Prof. Elisabetta Bergantino

Dipartimento di Biologia

Laureando: Vladimir Jovanović

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

ABSTRACT.....	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1. LA CRISI ALIMENTARE ED ENERGETICA E LE FONTI DI ENERGIE RINNOVABILI	3
1.2. MICROALGHE COME ALTERNATIVA ENERGETICA ED ALIMENTARE	4
1.3. APPLICAZIONI COMMERCIALI DELLE MICROALGHE.....	5
1.4. <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i>	6
1.5. <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	7
1.6. <i>PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM</i>	7
1.7. PROBLEMATICHE RELATIVE ALL'APPLICABILITÀ INDUSTRIALE TECNICHE DI OTTIMIZZAZIONE DELLA BIOMASSA.....	8
1.8. SISTEMI DI COLTIVAZIONE DELLE MICROALGHE	10
1.9. CONDIZIONI DI COLTURA	12
1.10. MODALITÀ OPERATIVE	13
2. SCOPO DELLA TESI.....	16
3. MATERIALI E METODI.....	18
3.1. COLTURE DI <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i> , <i>CHLORELLA VULGARIS</i> (UTEX 30), <i>P. TRICORNUTUM</i> (CCAP 1052/B).....	18
3.1.1. <i>Terreno BG11 per Chlorella</i>	18
3.1.2. <i>Terreno TAP per C. vulgaris (UTEX30)</i>	19
3.1.3. <i>Terreni F/2 e F/2 PLUS per P. tricornutum</i>	19
3.1.4. <i>Colture in liquido di C. sorokiniana e P. tricornutum</i>	20
3.1.5. <i>Coltivazione fed-batch di colture di C. sorokiniana e P. tricornutum</i>	20
3.2. MISURA DELLA PRODUTTIVITÀ TRAMITE PESO SECCO.....	20
3.3. ANALISI BIOCHIMICHE	22
3.3.1. <i>Misure di assorbanza</i>	22
3.3.2. <i>Conta cellulare</i>	22
3.4. MUTAGENESI CHIMICA <i>RANDOM</i> MEDIANTE EMS	23
3.4.1. <i>Selezione delle colture mutate</i>	23
3.4.2. <i>Valutazione delle curve di crescita dei mutanti</i>	23
3.4.3. <i>Estrazione dei pigmenti fotosintetici</i>	24
3.4.4. <i>Quantificazione dei pigmenti estratti</i>	24
4. RISULTATI.....	27
4.1. STUDIO DELLA CRESCITA DELLE COLTURE MICROALGALI IN CONDIZIONI DI MIXOTROFIA E FOTOAUTOTROFIA.....	27
4.1.1. <i>Studio della crescita di Chlorella sorokiniana</i>	27
4.1.2. <i>Studio della crescita di Phaeodactylum tricornutum</i>	35
4.2. STUDIO SU MUTANTI CON RIDOTTO RAPPORTO CLOROFILLA/CAROTENOIDI MEDIANTE MUTAGENESI CHIMICA <i>RANDOM</i> DI <i>CHLORELLA VULGARIS</i> UTEX 30.....	39
4.2.1. <i>Studio della crescita del ceppo mutato rispetto al controllo wild type</i>	41
4.2.2. <i>Analisi del contenuto di clorofille e carotenoidi</i>	43
5. DISCUSSIONE.....	48

5.1. STUDI DI CRESCITA DI <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i> IN MIXOTROFIA A DIVERSE CONDIZIONI	48
5.2. STUDI DI CRESCITA DI <i>PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM</i> IN MIXOTROFIA A DIVERSE CONDIZIONI.....	51
5.3. OTTENIMENTO DI UN MUTANTE DI <i>CHLORELLA VULGARIS</i> CON FENOTIPO GIALLO MEDIANTE MUTAGENESI CHIMICA <i>RANDOM</i>	53
6. CONCLUSIONI.....	56
BIBLIOGRAFIA	58

ABSTRACT

La crescita costante della popolazione mondiale determina una richiesta di risorse alimentari ed energetiche non soddisfacibile con gli attuali sistemi di produzione, che risultano insufficienti e ad elevato impatto ambientale. In questo contesto storico le microalghe rappresentano una possibile alternativa alle tradizionali fonti energetiche ed alimentari grazie alla loro sostenibilità ecologica: fissando la CO₂ mediante il metabolismo fotosintetico, le alghe non contribuiscono all'aumento dell'effetto serra, causato dal rilascio di anidride carbonica nell'atmosfera. Oltre al carattere ecosostenibile, le microalghe presentano potenzialmente numerose applicazioni in un'ampia varietà di settori, quali: nutraceutico ed alimentare, delle energie rinnovabili e farmaceutico.

Nell'ambito alimentare alcune specie microalgali risultano interessanti come fonte di proteine, acidi grassi polinsaturi, vitamine, minerali e polisaccaridi e sono utilizzate come integratori nel settore nutraceutico. Particolarmente interessante è la specie *Chlorella vulgaris* grazie al suo elevato contenuto di proteine e amminoacidi essenziali.

L'applicabilità su larga scala delle tecnologie che utilizzano microalghe risulta, tuttavia, limitata a causa della bassa produttività ottenibile a livello industriale. Per affrontare queste limitazioni un metodo di coltivazione interessante è la mixotrofia, che prevede la coltura di microalghe in presenza sia di luce, sia di un substrato organico; in queste condizioni è possibile ottenere una crescita della biomassa superiore rispetto a coltivazioni esclusivamente fotoautotrofe o eterotrofe.

Nella prima parte del presente lavoro di tesi è stata studiata le produttività in condizioni mixotrofiche di due specie algali importanti a livello industriale, *Phaeodactylum tricornutum* e *Chlorella sorokiniana*. Mediante modifiche delle condizioni di crescita, si è tentato di migliorare la crescita della biomassa nelle due colture mixotrofiche.

Nella seconda parte, mediante mutagenesi chimica, si è cercato di ottenere un ceppo di *Chlorella vulgaris* con caratteristiche fenotipiche tali da renderla più adatta ad un utilizzo in ambito nutraceutico; in particolare si è tentato di ridurre la concentrazione di clorofilla della microalga per migliorarne le caratteristiche organolettiche.

1. INTRODUZIONE

1.1. LA CRISI ALIMENTARE ED ENERGETICA E LE FONTI DI ENERGIE RINNOVABILI

Si prevede che entro il 2050 la popolazione mondiale raggiungerà i 9,7 miliardi di abitanti (Dasan et al., 2019), il che porterà ad un aumento della richiesta di fonti di cibo del 50% (World Resources Report: Creating a Sustainable Food Future, 2019). Le pratiche di agricoltura e allevamento intensivi attualmente adottati contribuiscono a circa il 30% delle emissioni di gas serra complessivamente prodotte dalle attività umane (Caporgno & Mathys, 2018).

Le attività umane legate alla produzione di energia hanno determinato l'attuale concentrazione atmosferica di anidride carbonica (CO₂) che rappresenta la più alta degli ultimi 800.000 anni (Dasan et al., 2019), inoltre, per i prossimi decenni, si prevede un aumento continuo della concentrazione di CO₂ nell'atmosfera (figura 1.1).

Vi sono numerosi effetti collaterali dovuti all'innalzamento del livello di CO₂ in atmosfera. Uno dei principali è l'aumento della temperatura media globale: per limitare il fenomeno del riscaldamento globale sarà indispensabile ridurre le emissioni di CO₂ di circa il 70% entro il 2050 (Philp, 2018).

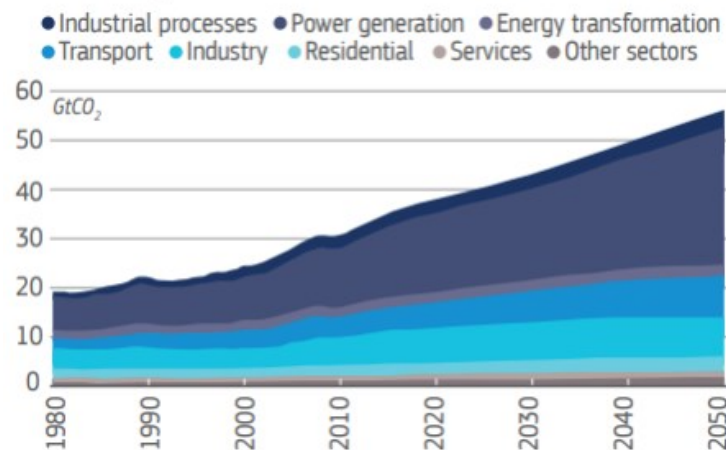


Figura 1.1: Previsioni sull'aumento delle emissioni di CO₂ fino al 2050 (OECD Environmental Outlook baseline, 2011)

1.2. MICROALGHE COME ALTERNATIVA ENERGETICA ED ALIMENTARE

Col termine microalga si definisce un gruppo non tassonomicamente definito di microorganismi fotosintetici unicellulari, procariotici o eucariotici. Vi sono più di 200 000 specie di microalghe (Bleakley & Hayes, 2017), di cui circa 30 000 sono state studiate ed analizzate (Abbate et al., 2012). Le microalghe presentano una variabilità genetica molto elevata essendo un gruppo eterogeneo ed ubiquitario: sono presenti in numerosi ecosistemi, quali acque marine, acque dolci, acque di scarico, sorgenti termali, ghiacci. Le microalghe vivono sospese in un corpo d'acqua (formando il fitoplancton) o fissate ad un substrato mediante mucillagini o apposite appendici, sia come cellule singole, sia in colonia e possono essere costituite da cellule immobili o dotate di motilità. Ogni specie di microalga presenta un range ottimale di pH e di temperatura per la crescita, ma alcune specie sono in grado di tollerare ampi intervalli di diverse condizioni ambientali: resistono a grandi differenze di temperatura, diversi gradi di salinità e di pH, diverse condizioni di luce (Abbate et al., 2012).

A partire dalle microalghe si possono ottenere prodotti di interesse sia per l'industria alimentare sia per l'industria energetica. Tra i prodotti di principale interesse vi sono mangimi e prodotti per l'industria alimentare, ottenibili grazie all'elevato contenuto di proteine in alcune specie microalgali, e i biocarburanti ottenibili a partire dai lipidi (Hariskos & Posten, 2014).

Vi sono numerose caratteristiche che rendono le alghe interessanti dal punto di vista industriale:

1) crescono velocemente, presentando un'elevata produttività e un tempo per il recupero del prodotto più breve in confronto a quello per le piante terrestri. Le microalghe hanno una resa teorica di circa 77 g di biomassa/m²/giorno, corrispondente a circa 280 ton/ha/anno, sebbene la resa a livello industriale sia ancora molto inferiore rispetto a quella teorica (Brennan & Owende, 2010);

2) essendo specie acquatiche non presentano un apparato radicale e non competono con i terreni fertili per le coltivazioni. L'utilizzo di specie algali marine evita il consumo di acqua dolce, inoltre vi sono alcune specie che possono crescere anche nelle acque reflue e negli scarichi urbani, che contengono già i nutrienti essenziali per la loro crescita. (Behera et al., 2015);

3) sono in grado di produrre molecole utilizzabili in diversi settori. Ad esempio, alcune specie di alghe (tra cui i generi *Chlorella* e *Nannochloropsis*), in condizioni di stress sono in grado di accumulare lipidi utilizzabili nel settore alimentare o energetico (Chen & Jiang, 2017);

1.3. APPLICAZIONI COMMERCIALI DELLE MICROALGHE

Le applicazioni commerciali delle microalghe coinvolgono numerosi settori di mercato: l'alimentazione umana e animale, la cosmesi, l'energia, le industrie chimiche.

Si possono distinguere due tipi principali di prodotti derivanti da microalghe:

- 1) le bulk commodities, ovvero merci prodotte su larga scala e che comprendono biocarburanti, prodotti chimici e alimenti umani o animali;
- 2) i prodotti ad alto valore aggiunto commerciabili in settori quali nutraceutica e cosmesi (Ruiz et al., 2016).

Le microalghe possono essere considerate *cell factories*, in quanto è possibile, a partire dalla biomassa microalgale, estrarre prodotti quali lipidi, proteine, polisaccaridi, pigmenti e vitamine di interesse commerciale. I composti prodotti dalle alghe variano in base alla specie e alle condizioni di crescita (Molino et al. 2018).

I lipidi, ad esempio, sono prodotti d'interesse sia per l'industria alimentare sia per l'industria energetica. Di interesse nutrizionale risultano gli acidi grassi polinsaturi (PUFAs, polyunsaturated fatty acids), tra cui omega-3 e omega-6. Esempi di questi acidi grassi sono l'acido eicosapentaenoico (EPA), l'acido docosaesaenoico (DHA), l'acido linoleico, l'acido gamma-linoleico e l'acido arachidonico. (Canelli et al. 2020; Benedetti et al, 2018; Markou et al., 2013). Per quanto riguarda l'industria energetica, invece, i triacilgliceroli (TAGs) rappresentano i composti più interessanti in quanto precursori nella produzione di biodiesel (Khan et al., 2018). La produzione di proteine è importante nell'alimentazione umana e animale e sono utilizzati come sostituto di alimenti proteici di origine animale.

I polisaccaridi prodotti dalle alghe sono utilizzabili nel settore chimico-industriale, come bioflocculanti o agenti per la rimozione di metalli pesanti e nel settore alimentare, come antitumorali, antivirali e immunostimolanti.

I pigmenti assumono interesse commerciale come prodotto a valore aggiunto, in particolare i carotenoidi sono utilizzati come additivi alimentari, integratori, coloranti naturali e come protezione dai raggi UV in prodotti cosmetici. Tra i più interessanti vi sono l'astaxantina, il beta-carotene, la luteina e, nei cianobatteri e in alghe rosse, le ficobiline.

Le microalghe possono essere utilizzate come fonte di molte vitamine: A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina, acido folico (Dolganyuk et al., 2020).

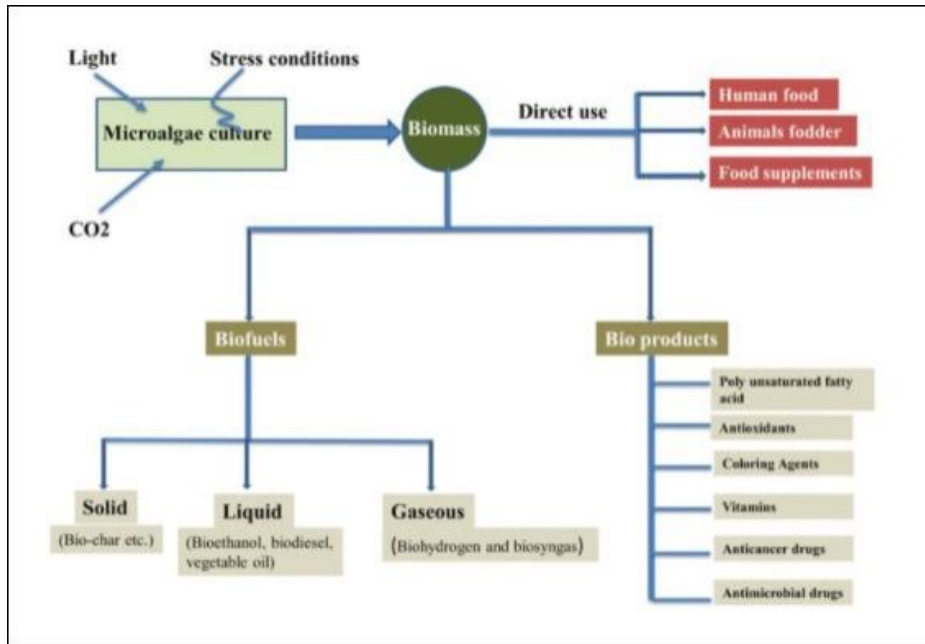


Figura 1.2: Potenziali applicazioni industriali delle microalghe (Khan et al., 2018)

1.4. *CHLORELLA SOROKINIANA*

Chlorella sorokiniana è una specie dulcicola del genere *Chlorella*, il quale fa parte del phylum Chlorophyta (alghe Verdi); non presenta flagelli e ha morfologia generalmente sferica; ha dimensioni di 2-10 μm di diametro (De-Bashan et al., 2008). L'utilizzo della specie a livello industriale è promettente, in quanto *C. sorokiniana* è in grado di crescere con diverse fonti di carbonio e in mixotrofia con una preferenza per gli zuccheri esosi: è in grado di crescere in acque reflue, utilizzando il carbonio organico per il metabolismo respiratorio, con rifornimento di CO_2 a partire da gas di scarico. (Lizzul et al., 2018).

Analisi del peso secco di *C. sorokiniana* dimostrano che la composizione media delle cellule della specie è: 40% proteine, 30–38% carboidrati e 18–22% lipidi (Gouveia and Oliveira, 2009). L'elevato contenuto proteico di *C. sorokiniana* risulta interessante per applicazioni dell'alga nell'industria alimentare.

C. sorokiniana risulta interessante nel settore nutraceutico in quanto, in condizioni di stress, è in grado di produrre elevate quantità di carotenoidi (0.69% del peso secco) (Matsukawa et al., 2000).

1.5. *CHLORELLA VULGARIS*

Chlorella vulgaris (figura 1.3) è una specie del genere *Chlorella* e fa parte del phylum Chlorophyta (alghe verdi). *C. vulgaris* è una specie dulcicola e presenta dimensioni che variano da 2 a 10 μm di diametro. *C. vulgaris* è una delle specie di microalghe più utilizzate a livello industriale, in particolare nel settore alimentare. La specie è parte dei GRAS (generally recognized as safe), ovvero degli alimenti generalmente riconosciuti come sicuri dallo USFDA (Food and Drug Administration) e dall'EFSA (European Food Safety Authority) (Molino et al., 2018), inoltre, risulta interessante l'elevato contenuto proteico, che per alcuni ceppi può raggiungere fino al 51%–58% del peso secco, e la presenza degli amminoacidi essenziali per l'uomo (EAAs, essential amino acids) (Caporgno and Mathys, 2018). *C. vulgaris* è in grado di accumulare altri composti d'interesse industriale, quali carotenoidi, polisaccaridi e vitamine (Bleakley and Hayes, 2017; Safi et al., 2019) e può essere utilizzata per il trattamento delle acque e la produzione di fertilizzanti (Safi et al., 2019).

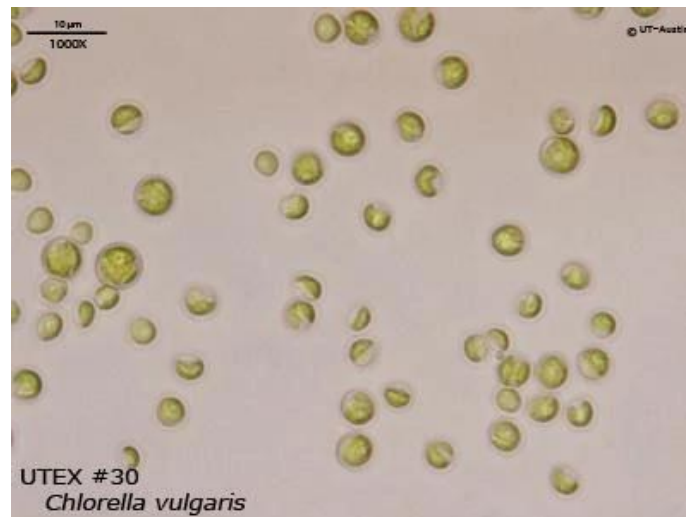


Figura 1.3: *Chlorella vulgaris* UTEX 30 (utex.org)

1.6. *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

Phaeodactylum tricornutum è una specie di microalga unicellulare, marina, non-flagellata, tipica di zone intertidali e costiere (De Martino et al., 2007) (Fig. 1.4). *P. tricornutum* è l'unica specie del genere *Phaeodactylum* e appartiene alla classe delle Bacillariophyceae, che comprende un gruppo di microalghe dal colore giallo-bruno comunemente chiamate diatomee (Pasqua et al., 2011).

Le cellule di *P. tricornutum* presentano tre differenti morfotipi: fusiforme, ovale e triradiato; la forma più comune è quello fusiforme. La struttura cellulare di *P.*

tricornutum cambia in risposta a variazioni ambientali: in condizioni di bassa salinità o basse temperature, ad esempio, risulta prevalente il morfotipo ovale (De Martino et al., 2011). Le cellule di *P. tricornutum* presentano un corpo centrale contenente i principali organelli: il nucleo centrale e un grande plastidio parietale color giallo-bruno con uno o più pirenoidi (De Martino et al., 2007). *P. tricornutum* è studiata come fonte potenziale di acidi grassi polinsaturi (PUFAs), in particolare di acido eicosapentaenoico (EPA), un omega-3 con un alto valore nutrizionale (Liu et al., 2009, Cerón-García et al., 2006). *P. tricornutum* è utilizzata come mangime per larve di pesci (De Martino et al., 2007) e per la produzione di biocarburanti, in quanto gli acidi grassi costituiscono 20-30% del peso secco (Morais et al., 2009, Wu et al., 2012, Cerón-García et al., 2013).



Figura 1.4: *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1052/1B (www.ccap.ac.uk)

1.7. PROBLEMATICHE RELATIVE ALL'APPLICABILITÀ INDUSTRIALE TECNICHE DI OTTIMIZZAZIONE DELLA BIOMASSA

L'insieme dei processi che avvengono a livello industriale durante la produzione di prodotti di origine microalgale sono distinguibili in processi *upstream*, che comprendono la coltivazione delle microalghe e la produzione della biomassa, e processi *downstream*, che comprendono la raccolta e l'estrazione e purificazione dei prodotti d'interesse (Perez-Garcia et al., 2015).

L'ottimizzazione dei processi *upstream* è importante perché il miglioramento di questi consente l'aumento della produttività e l'ottenimento di un prodotto con le

caratteristiche d'interesse. Oltre all'abbassamento dei costi, il prodotto deve rispondere alle esigenze del mercato, sia da un punto di vista legislativo, sia alle richieste del consumatore. Ciò risulta rilevante nel caso di prodotti dell'industria alimentare, per la quale esistono parametri che ne stabiliscono la qualità e le caratteristiche richieste dal consumatore. Nel caso dei prodotti di origine microalgale, ad esempio, la presenza di clorofilla è un problema a causa del colore e del sapore (Batista et al., 2017; Benedetti et al., 2018).

L'ottimizzazione della quantità e della qualità della biomassa può avvenire attraverso due approcci principali: la selezione dei ceppi (*wild-type* o mutati) oppure la scelta e il perfezionamento delle condizioni di coltivazione (Benedetti et al., 2018).

La selezione dei ceppi può avvenire mediante due approcci principali:

a) ricerca e caratterizzazione di specie algali *wild-type*. Essendo organismi ubiquitari con elevata variabilità genotipica e fenotipica è possibile individuare specie presenti in natura con caratteristiche d'interesse industriale;

b) alternativamente, è possibile ricorrere a tecniche di biologia molecolare e selezione di fenotipi d'interesse. Vi sono due strategie principali:

1) *forward genetics*: prevede la generazione di mutanti casuali (mutagenesi random) in una specie e la successiva selezione del fenotipo d'interesse, mentre la determinazione del genotipo avviene in tempi successivi. Vi sono diverse tecniche di *forward genetics*:

- mutagenesi casuale chimico-fisica: sono utilizzati agenti mutageni che possono essere sostanze chimiche, quali, ad esempio, N'-nitro-N nitrosoguanidina (NTG) e l'etil metanosulfonato (EMS), oppure radiazioni ionizzanti, ad esempio, raggi UV e raggi X. Non essendoci la possibilità di determinare a priori il sito della mutazione, lo step limitante del metodo di mutagenesi random è lo screening e la selezione dei mutanti d'interesse. Il metodo presenta vantaggi caratteristici: la possibilità di produrre mutanti in specie in cui l'applicazione delle tecniche di ingegneria genetica è difficile o impraticabile, come in organismi aploidi in cui non avviene ricombinazione omologa; l'assenza di inserzione di DNA esogeno, il che rende i mutanti prodotti, legislativamente, non OGM (Beacham et al., 2015);

- mutagenesi inserzionale casuale: avviene mediante l'inserimento di geni esogeni nell'organismo ospite; tra le sequenze inserite sono presenti geni che permettono la selezione dei mutanti, come, ad esempio, geni per la resistenza ad antibiotici o che consentano di compensare un'auxotrofia; anche in questo tipo di mutagenesi si ottiene una libreria di mutanti, sebbene i mutanti possano essere individuati

mediante selezione in terreno con antibiotico o in assenza di nutrienti essenziali e, conoscendo la sequenza inserita, è possibile individuare il locus mutato;

2) *reverse genetics*: si ha conoscenza a priori della sequenza che subirà modificazioni attraverso *knockout*, *knockdown* o sovraespressione; l'analisi del fenotipo avviene in un momento successivo; vi sono diverse tecniche che fanno utilizzo della *reverse genetics*:

- mutagenesi mediante ricombinazione omologa: il principio della tecnica è simile alla mutagenesi casuale inserzionale, tuttavia, la sequenza d'interesse presenta sequenze fiancheggiatrici che ne permettono l'inserimento in un locus specifico del genoma; il vantaggio della tecnica è la possibilità di produrre mutanti in modo preciso, tuttavia, diversi organismi non sono in grado di eseguire ricombinazione omologa efficientemente;

- silenziamento genico: strategia utilizzata in varie tecniche che consiste nell'inibire l'espressione di uno specifico gene; può avvenire sia il *knockout*, ovvero il completo silenziamento del gene, sia il *knockdown*, ovvero una ridotta espressione del gene d'interesse;

- *genome editing*: si tratta di tecniche che permettono il taglio del DNA sequenza-specifico, mediante nucleasi.

Per aumentare la crescita e la produttività di biomassa è possibile modificare le condizioni di coltura e alcuni parametri, quali: la composizione del terreno di coltura, la temperatura, il pH, il mixing e l'illuminazione (Dolganyuk et al., 2020). È inoltre possibile agire modificando i sistemi di coltivazione.

1.8. SISTEMI DI COLTIVAZIONE DELLE MICROALGHE

Vi sono due sistemi principali di coltivazione delle microalghe: in *pond*, ovvero in vasche aperte, e in fotobioreattori (PBR) che sono sistemi chiusi.

I *pond* consistono in grandi vasche aperte poco profonde (0,2 - 0,5 m), posizionate all'esterno e che presentano un flusso che va da un'entrata ad uno scarico (Tan et al., 2018). I *pond* sono sistemi meno costosi da costruire e mantenere, rispetto ai PBR. Le alghe coltivate all'interno di *pond* sfruttano la luce naturale per la fotosintesi. Il sistema è aperto, pertanto è soggetto ai cambiamenti delle condizioni ambientali, va incontro ad evaporazione, si contamina molto più facilmente, non utilizza efficacemente la CO₂ e richiede grandi spazi (Xu et al., 2009). Sono state implementate numerose strategie per migliorare i *pond*, quali: impiego di sistemi di controllo della temperatura, rifornimento di nutrienti adeguati, ottimizzazione della

profondità del *pond*, sistemi di insufflamento di CO₂. I *pond* più diffusi sono i *raceway-shaped pond* costituiti da un sistema circolare dotato di pale che spostano l'acqua in un unico senso (figura 1.5).



Figura 1.5: *Raceway-shaped pond* (algaeorbiofuels.com)

La produttività ottenuta con l'utilizzo di fotobioreattori è significativamente superiore rispetto ai *pond* (da 3 a 5 volte) ed è dovuta ad un maggiore controllo sulle condizioni di coltura, sui parametri di crescita e sulle contaminazioni (Mata, Martins and Caetano, 2010). I PBR presentano, tuttavia, un maggiore costo in termini di costruzione e manutenzione (Mata, Martins and Caetano, 2010).

Sono state studiate diverse forme per i PBR per incrementare l'assorbimento della luce e il mixing della coltura. Le tre tipologie di PBR più adatte alla coltivazione su larga scala sono quelli tubulari, cilindrici e a pannello piatto (Xu et al., 2009; Mata, Martins and Caetano, 2010; Tan et al., 2018).

I PBR tubulari consistono in una serie di tubi collegati e disposti parallelamente, verticalmente o a elica. Il diametro dei tubi è di circa 0,1 m, necessario a garantire un elevato rapporto superficie/volume. Un PBR cilindrico, invece, si presenta come un cilindro dal cui fondo è insufflata aria per permettere il mixing e l'arricchimento di CO₂. I PBR a pannello piatto consistono in pannelli con elevata area superficiale che possono essere posti verticalmente od orizzontalmente.

Un'ulteriore tipologia è il fotobioreattore soft-frame, ovvero costituito da strutture non fisse e costruite con materiali flessibili con forme variabili (Aziz et al., 2020) (figura 1.6).

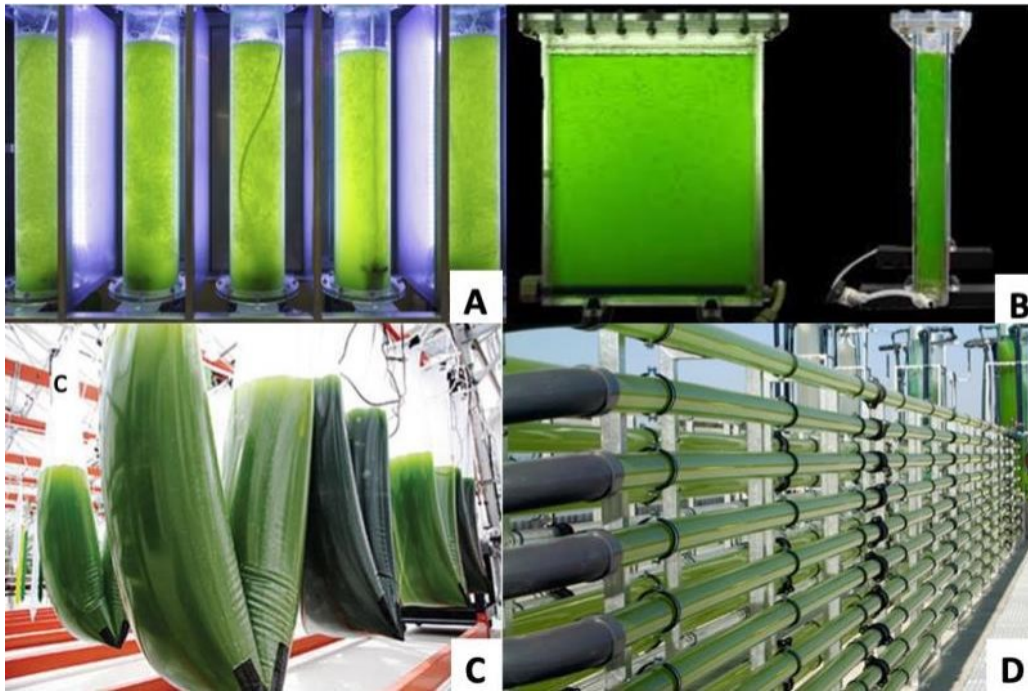


Figura 1.6: Fotobioreattori cilindrici (A), a pannello piatto (B), *soft-frame* V-bag (C), tubulari (D) (Tan et al., 2018)

1.9. CONDIZIONI DI COLTURA

Le microalghe sono organismi fotoautotrofi, pertanto necessitano di luce e una fonte di carbonio inorganico; tuttavia, essendo organismi ubiquitari, si adattano a diverse condizioni ambientali adottando caratteristiche metaboliche differenti:

- fotoautotrofia: è la condizione di crescita in cui le alghe convertono l'energia luminosa in energia chimica mediante fotosintesi; in questo caso la fonte di carbonio inorganico è l'anidride carbonica. La fotoautotrofia rappresenta la condizione di coltura più economica e applicabile, essendo utilizzabile sia in *pond*, sia in fotobioreattori, tuttavia, risulta poco efficiente a causa della bassa resa di biomassa dovuta anche all'elevata densità cellulare all'interno dei fotobioreattori: questa densità determina il fenomeno del *self-shading*, ovvero l'oscuramento delle cellule situate in posizioni più interne della coltura: essendo la gran parte delle microalghe verdi dipendente dalla fotosintesi per la produzione di energia chimica, il fenomeno dell'oscuramento determina un abbassamento della produttività. Si è tentato di affrontare il problema mediante ottimizzazione del design dei fotobioreattori che, tuttavia, determina un aumento dei costi di costruzione (Mata et al., 2010, Zhan et al., 2017);

- eterotrofia: è il metabolismo adottato in assenza di luce e che utilizza fonti di carbonio organico quali zuccheri o acidi organici (Mata et al., 2010, Cheirsilp & Torpee, 2012). La condizione di crescita eterotrofica è compatibile con reattori più semplici e meno costosi a causa dell'assenza di luce e delle problematiche relative alla sua distribuzione, inoltre lo scaling-up risulta più rapido. La crescita di microalghe in eterotrofia presenta svantaggi relativi all'utilizzo di substrati organici: i costi di produzione sono più elevati, le contaminazioni microbiche risultano più probabili e si ha produzione di CO₂ derivante dal metabolismo respiratorio (Perez-Garcia et al., 2015, Daneshvar et al., 2021).

- mixotrofia: condizione per cui la fotosintesi e i processi respiratori avvengono in contemporanea. Le condizioni di crescita necessitano sia presenza di luce e utilizzo di anidride carbonica, sia disponibilità di una fonte di carbonio organico (Mata et al., 2010, Cheirsilp & Torpee, 2012).

In condizioni di coltura mixotrofiche, le microalghe utilizzano sia il carbonio organico, sia la luce, fissando anidride carbonica. In questo modo si ha un aumento della produttività e un aumento dell'accumulo di biomassa ma anche una riduzione dell'anidride carbonica complessivamente emessa rispetto alle condizioni eterotrofiche. Un ulteriore vantaggio della coltivazione di microalghe in condizioni mixotrofiche è dovuto alla minore quantità di carbonio organico fornito, rispetto alle condizioni eterotrofiche, che determina un abbassamento dei costi di coltivazione (Wu et al., 2012, Zhan et al., 2017). La necessità di utilizzare substrati organici in mixotrofia aumenta la probabilità di contaminazioni (Perez-Garcia et al., 2015).

1.10. MODALITÀ OPERATIVE

La somministrazione dei nutrienti in una coltura microalgale in laboratorio o su larga scala può avvenire secondo differenti modalità (figura 1.7):

- sistema batch, ovvero un sistema chiuso in cui i nutrienti sono forniti all'inizio prima della chiusura del sistema. Le cellule attraversano una fase di adattamento e successivamente crescono esponenzialmente fino a quando i nutrienti diventano limitanti;

- sistema semi-continuo, ovvero un sistema mantenuto come batch per un periodo di tempo prestabilito. Alla fine del periodo viene rimossa una parte della coltura e sostituita da terreno fresco. La coltura, pertanto, è diluita a intervalli di tempo definiti, il che permette di riottenere una coltura con concentrazione di biomassa stabilita. Il vantaggio principale riguarda la possibilità di mantenere la coltura in fase esponenziale per lunghi periodi di tempo.

- sistema continuo, ovvero un sistema aperto con entrata e scarico. Si ha una fase esponenziale iniziale seguita dal raggiungimento di uno stato stazionario nel quale la biomassa è mantenuta ad una concentrazione costante. Il vantaggio del sistema riguarda la qualità del prodotto, che mantiene proprietà chimico-fisiche omogenee (Mata, Martins and Caetano, 2010).

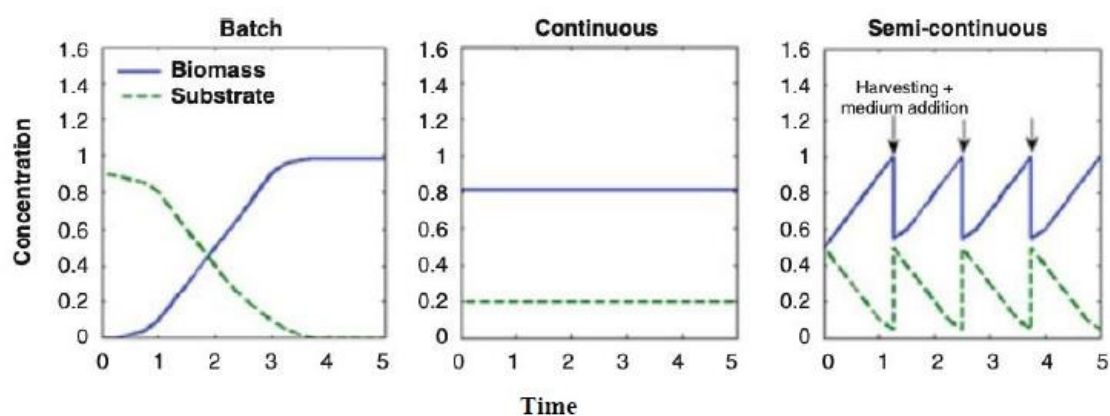


Figura 1.7: Confronto dell'andamento delle concentrazioni di biomassa e substrato in funzione del tempo con diverse modalità operative (Perez-Garcia et al., 2015)

2. SCOPO DELLA TESI

Le microalghe rappresentano una possibile soluzione alle crisi energetica e alimentare causate dalla costante crescita demografica. In particolare, la versatilità di utilizzi, la variabilità filogenetica e la veloce crescita delle microalghe le rendono un candidato ideale come alternativa sia di fonti energetiche sia di fonti alimentari. Vi sono tuttavia problematiche legate all'applicazione industriale delle tecnologie che utilizzano microalghe.

Nel presente lavoro si sono affrontate due diverse questioni che riguardano i processi *upstream* e l'applicabilità industriale e commerciale delle microalghe:

- 1) L'ottimizzazione delle produttività delle specie *Chlorella sorokiniana* e *Phaeodactylum tricorutum* in condizioni di mixotrofia e in un sistema semicontinuo;
- 2) L'ottenimento di mutanti mediante mutagenesi random della specie *Chlorella vulgaris* con fenotipo più giallo, ovvero con un ridotto contenuto di clorofilla.

Nella prima parte il lavoro si è concentrato sull'ottimizzazione della crescita in semicontinuo, che rappresenta una problematica legata all'applicabilità su scala industriale della coltivazione di specie microalgali, le quali tendono, a elevate concentrazioni di biomassa, a subire il fenomeno del *self-shading*. Questa problematica è affrontata con la coltivazione in mixotrofia che, inoltre, aumenta la produttività delle colture microalgali.

Nella seconda parte il focus degli esperimenti è stata la specie *Chlorella vulgaris*, utilizzata nell'industria alimentare. In questo caso l'ottenimento di fenotipi d'interesse rappresenta una via di miglioramento delle caratteristiche e semplifica la commerciabilità di questa specie.

3. MATERIALI E METODI

3.1. COLTURE DI CHLORELLA SOROKINIANA, CHLORELLA VULGARIS (UTEX 30), P. TRICORNUTUM (CCAP 1052/B)

3.1.1. TERRENO BG11 PER *CHLORELLA*

Le specie del genere *Chlorella* sono state coltivate in terreno BG11 per microalghe dulcicole. Il terreno è stato preparato a partire da: quattro soluzioni *stock* (tabella 3.1) con concentrazione finale 1x; NaNO₃ (SIGMA) (1,5 g/L); Na₂CO₃ (SIGMA) (0,02 g/L); HEPES (*N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid*) (SIGMA) 1 M a pH 8 (10mM) come sistema tampone (tabella 3.1). Il pH del terreno è stato portato a 7.5 aggiungendo HCl 6 N. La sterilizzazione del terreno è avvenuta mediante autoclave.

Componenti soluzioni stock	Concentrazioni (g/L)
Stock 1 (100X)	
Na EDTA	0,1
(NH ₄) ₅ [Fe(C ₆ H ₄ O ₇) ₂]	0,6
C ₆ H ₃ O ₇	0,6
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,6
Stock 2 (100X)	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5
Stock 3 (100X)	
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (or K ₂ HPO ₄)	4 (or 3,05)
Stock 5 (1000X)	
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,05
NaMoO ₄ ·2H ₂ O (or MoO ₄)	0,391 (or 0,018)

Tabella 3.1: Componenti del terreno BG11

La crescita di *C. sorokiniana* in mixotrofia è stata testata cambiando le concentrazioni dei componenti del terreno. Sono state studiate concentrazioni di, rispettivamente, 2x e 5x di NaNO₃ rispetto al terreno BG11 standard e terreno BG11 con concentrazione 2x di tutti i componenti.

3.1.2 TERRENO TAP PER *C. VULGARIS* (UTEX30)

La coltura di *C. vulgaris* (UTEX30) utilizzata negli esperimenti di mutagenesi è stata coltivata in terreno TAP per microalghe dulcicole. Il terreno TAP è stato preparato a partire da quattro soluzioni stock (tabella 3.2). In 1L di terreno sono presenti: 10 ml di TRIS 2M, 50 ml di soluzione A, 1 ml di oligoelementi e 1 ml di P buffer II. La soluzione è stata portata a pH=7 con acido acetico.

Per ottenere il terreno solido sono stati aggiunti 15 g L⁻¹ di agar prima della sterilizzazione mediante autoclave.

1L TRIS 2M	
Tris	242 g
1L SOLUZIONE A	
NH ₄ Cl	8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g
CaCl ₂ .H ₂ O	1 g
100 mL P Buffer II	
K ₂ HPO ₄	9,35 g
KH ₂ PO ₄	6,30 g
pH 6.8-7	
1L OLIGO ELEMENTI	
EDTA	50 g
H ₃ BO ₃	11,40 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	5,06 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	4,90 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,61 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1,10 g

Tabella 3.2: Componenti del terreno TAP

3.1.3. TERRENI F/2 E F/2 PLUS PER *P. TRICORNUTUM*

Phaeodactylum tricornutum, acquistata da CCAP (*Colture Collection of Algae and Protozoa*), ceppo 1052/B è stata coltivata in terreno F/2 minimo per microalghe marine. Il terreno è stato preparato a partire da: Sea salts (SIGMA) (32 g/L) e Tris (Trizma – SIGMA) (40 mM) come sistema tampone. Il pH del terreno è poi aggiustato al valore di 8 aggiungendo HCl 6N. Il terreno è sterilizzato mediante autoclave e successivamente sono aggiunti i nutrienti attraverso il Guillard's (F/2) Marin Water Enrichment Solution (SIGMA – 50X), portato ad una concentrazione di 1X.

P. tricornutum è coltivata in terreno F/2 PLUS per microalghe marine, un terreno arricchito rispetto a F/2 minimo. Il terreno F/2 PLUS è preparato nello stesso modo del terreno F/2 minimo, con la differenza che, in seguito a sterilizzazione mediante autoclave, i componenti aggiunti sono: Na₂HPO₃ (5 g/L); NaNO₃ (15 g/L); Na₂EDTA (8,72 g/L); FeCl₃ (6,3 g/L); CuSO₄*5H₂O (0,01 g/L); ZnSO₄*7H₂O (0,022 g/L); CoCl₂*6H₂O (0,01 g/L); MnCl₂*4H₂O (0,18 g/L); Na₂MoO₄*2H₂O (0,006 g/L); vitamina B12 (0,005 g/L); vitamina B1 (0,1 g/L); biotina (0,005 g/L).

3.1.4. COLTURE IN LIQUIDO DI *C. SOROKINIANA* E *P. TRICORNUTUM*

Le colture di *C. sorokiniana* e *P. tricornutum* sono state allestite in beute da 20 mL e mantenute all'interno di celle termostate, con la temperatura mantenuta a 22 ± 2 °C e con luce continua (100-130 μmol di fotoni * m⁻² s⁻¹). Per assicurare gli scambi gassosi, le colture in beuta sono state mantenute in agitazione continua alla velocità di 100 rpm.

3.1.5. COLTIVAZIONE FED-BATCH DI COLTURE DI *C. SOROKINIANA* E *P. TRICORNUTUM*

Sono state allestite colture autotrofe e mixotrofe di *C. sorokiniana* per valutare le differenti condizioni di crescita della specie; le colture sono state mantenute con metodo di coltivazione fed-batch (semi-continuo) praticando una diluizione delle colture tre volte a settimana per riportarle a un OD₇₅₀ di 0,3 inizialmente e OD₇₅₀ pari a 1 in successivi esperimenti. Alle colture mixotrofe è stato aggiunto glucosio (0,3% m/v e 0,6% m/v) per indurre il metabolismo mixotrofo.

Sono state allestite colture autotrofe e mixotrofe di *P. tricornutum* per valutare le differenti condizioni di crescita della specie; le colture sono state mantenute con metodo di coltivazione fed-batch (semi-continuo) praticando una diluizione delle colture tre volte a settimana per riportarle a un OD₇₅₀ di 0,3 inizialmente e OD₇₅₀ pari a 0,6 in successivi esperimenti. Alle colture mixotrofe è stato aggiunto glicerolo (0,1% m/v, 0,3% m/v, 0,6% m/v) per indurre il metabolismo mixotrofo.

3.2. MISURA DELLA PRODUTTIVITÀ TRAMITE PESO SECCO

La produttività della biomassa si ottiene misurando il peso secco. Sono filtrati 5 mL di coltura, diluiti 1:10 con acqua deionizzata in modo da dissolvere i sali, utilizzando filtri di acetato di cellulosa con pori di diametro 0,45 μm. I filtri vengono poi fatti seccare a 65°C per almeno 24 h e poi pesati. La produttività di biomassa è calcolata come segue:

$$(P_f - P_i)/(t_f - t_i),$$

con P_f e P_i massa della coltura, rispettivamente, finale e iniziale e $(t_f - t_i)$ il numero di giorni trascorsi.

Essendo la concentrazione di biomassa in g/L e l'OD direttamente proporzionali tra loro, si sono messi in relazione, per ciascuna delle due specie utilizzate negli esperimenti di mixotrofia, i due valori di densità per ottenere una retta di tendenza che permettesse di calcolare il peso secco teorico a partire dai dati di OD ottenuti nel corso degli esperimenti e (figura 3.1, figura 3.2).

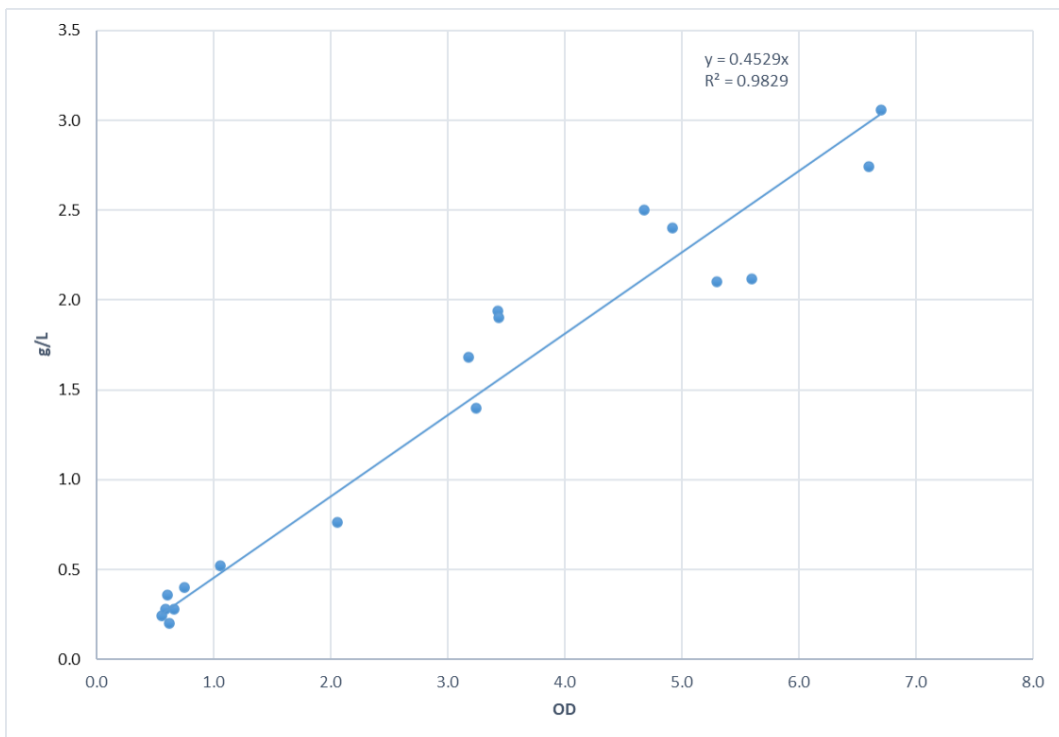


Figura 3.1: Retta di correlazione tra OD (asse delle ascisse) e peso secco in g/L (asse delle ordinate) per *Chlorella sorokiniana*

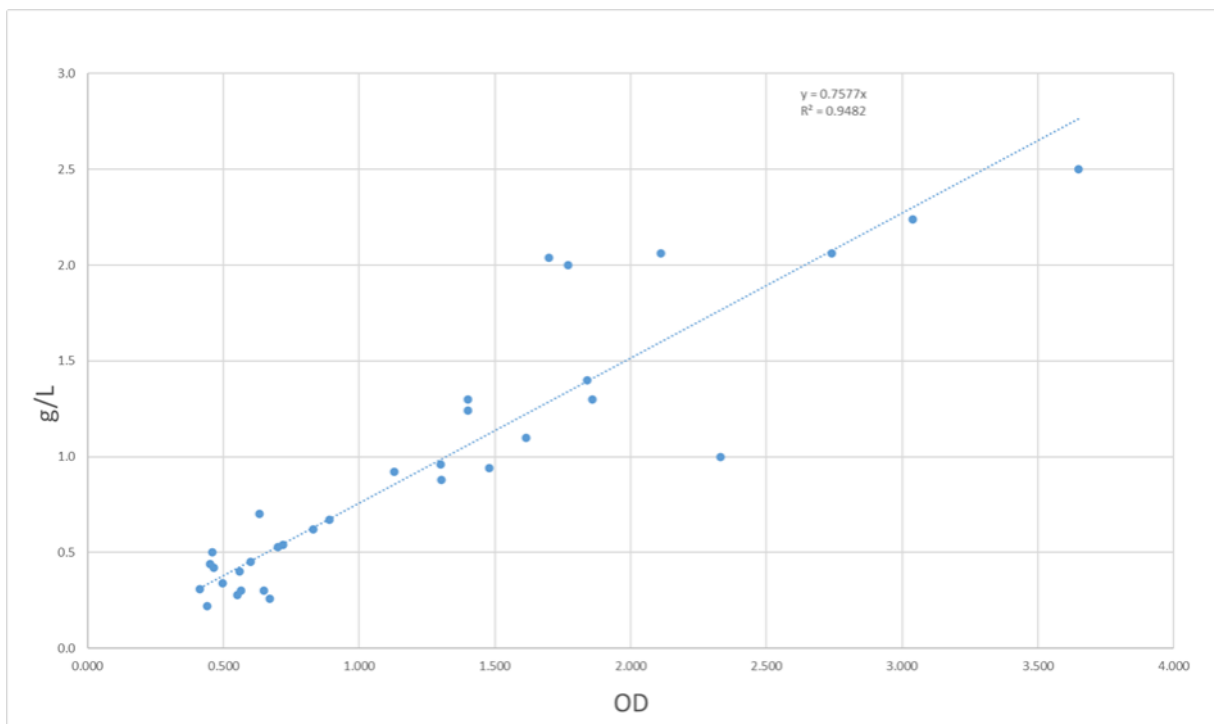


Figura 3.2: Retta di correlazione tra valori di OD (asse delle ascisse) e biomassa in g/L (asse delle ordinate) per *Phaeodactylum tricornutum*

3.3. ANALISI BIOCHIMICHE

3.3.1. MISURE DI ASSORBANZA

La densità ottica (OD) delle colture è misurata con uno spettrofotometro a doppio raggio (Vetrotecnica – A560 UV/VIS Spectrophotometer). Il campione da analizzare è posto in cuvette di plastica trasparenti e per le colture algali si imposta la lunghezza d'onda a 750 nm, per evitare la componente di assorbimento dovuta ai pigmenti fotosintetici. Il bianco è costituito dal terreno di coltura utilizzato.

3.3.2. CONTA CELLULARE

Per la conta del numero di cellule presenti in un millilitro di coltura si utilizza il Cellometer Auto X4 (Nexcelom bioscience). Lo strumento permette la conta di cellule all'interno di slides, ovvero camerette di conta in cui sono caricati 20 µl di coltura. Dopo il caricamento, si sedimentano sul fondo della slide per 10 minuti. La conta delle cellule avviene sia in *bright field* che in *fluorescence field*, restituendo una misura delle cellule totali e di quelle vitali. Quest'ultima misura è possibile

mediante l'utilizzo di luce ad una specifica lunghezza d'onda che eccita la clorofilla, contenuta esclusivamente nelle cellule vive, da cui è riemessa sotto forma di fluorescenza. Lo strumento riporta anche il diametro medio individuato delle cellule.

3.4. MUTAGENESI CHIMICA *RANDOM* MEDIANTE EMS

Per la mutagenesi di *C. vulgaris* il materiale di partenza è una coltura cresciuta per cinque giorni a partire da $OD_{750}=0,2$. Si esegue la conta cellulare e si effettua una diluizione in modo da ottenere $15 \cdot 10^6$ cellule per 500 μL di coltura. I 500 μL di coltura sono trattati per un'ora con EMS (*Ethyl methanesulfonate*) alla concentrazione di 300 mM, un agente alchilante che induce mutazioni casuali mediante sostituzione nucleotidica. Si effettuano quattro lavaggi in centrifuga a 5000 g per 8 min con terreno BG11 o TAP a cui sono aggiunti kanamicina e ampicillina. In seguito ai lavaggi, la coltura viene lasciata in recovery per un'ora. Si eseguono diluizioni seriali con l'obiettivo di ottenere 10 000 cellule per piastra e si piastra la coltura mutata su terreno solido. Le colture trattate con EMS hanno una mortalità teorica del 90%.

3.4.1. SELEZIONE DELLE COLTURE MUTATE

Le colture mutate di *C. vulgaris* sono selezionate mediante norflurazon (Sigma) aggiunto al terreno TAP alla concentrazione di 50 μM .

Le colture in piastra di *C. vulgaris* sono mantenute a luce continua (100/130 μE) e ad una temperatura di 22 ± 2 °C.

3.4.2. VALUTAZIONE DELLE CURVE DI CRESCITA DEI MUTANTI

Le curve di crescita sono ottenute facendo crescere le colture in fiaschette a partire da OD_{750} iniziale di 0,2. Le colture sono mantenute per cinque giorni in cella termostata al buio o a luce continua a 100-130 μmol di fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 22 ± 2 °C e in agitazione a 100 rpm per garantire gli scambi gassosi. Vengono effettuate misure di OD quotidianamente.

3.4.3. ESTRAZIONE DEI PIGMENTI FOTOSINTETICI

Per l'estrazione di pigmenti fotosintetici (clorofille e carotenoidi) delle colture mutate di *C. vulgaris* si preleva e si centrifuga 1 mL di coltura a 16000 g per 10 minuti a temperatura ambiente. Viene rimosso il surnatante e si aggiunge un volume uguale di DMF (N,N-dimetilformammide) (SIGMA). L'aggiunta di DMF avviene al buio, a causa della fotosensibilità dei pigmenti. I campioni sono successivamente incubati al buio a 4°C, *overnight*.

3.4.4 QUANTIFICAZIONE DEI PIGMENTI ESTRATTI

La quantificazione dei pigmenti si esegue ottenendo uno spettro nel range del visibile, da 750 nm a 350 nm, con uno spettrofotometro Cary 100 UV-VIS (Agilent) a doppio raggio, con il campione inserito in cuvette di quarzo (con cammino ottico di 1 cm).

Per l'elaborazione dei dati si utilizza la legge di Lambert - Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C,$$

dove A è l'assorbanza di un campione ad una certa lunghezza d'onda, ε è il coefficiente di estinzione molare del campione, l è il cammino ottico della cuvetta e C è la concentrazione del campione.

Per calcolare la concentrazione di clorofille e carotenoidi estratti mediante DMF di un dato campione si utilizzano le seguenti formule (Porra et al., 1989, Wellburn Alan R. 1994):

$$\text{Chl a } [\mu\text{g/ml}] = 12 \cdot \text{OD}_{664} - 3,11 \cdot \text{OD}_{647}$$

$$\text{Chl b } [\mu\text{g/ml}] = 20,78 \cdot \text{OD}_{647} - 4,88 \cdot \text{OD}_{664}$$

$$\text{Car } [\mu\text{g/ml}] = [(1000 \cdot \text{OD}_{480}) - (1,12 \cdot [\text{Chl a}])] / 245$$

Per il calcolo delle clorofille si misura l'assorbanza ai loro massimi di assorbimento, a 664 nm per la clorofilla a e a 647 nm per la clorofilla b, alle quali viene sottratto il rumore di fondo dovuto alla presenza di altri pigmenti (Porra et al., 1989). I coefficienti presenti nelle formule derivano dalla semplificazione tra coefficiente di estinzione molare e il fattore di moltiplicazione che permette di avere la concentrazione in $\mu\text{g/ml}$ invece che in mg/mL .

Per il calcolo dei carotenoidi si misura l'assorbanza al massimo di assorbimento a 480 nm, viene sottratto il rumore di fondo dovuto alla clorofilla a, dato dalla concentrazione della clorofilla a per il suo coefficiente di assorbimento specifico a 480 nm (Wellburn Alan R. 1994). Il coefficiente di estinzione molare in DMF è di

245 ml $\text{mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Wellburn Alan R. 1994). Per convertire la concentrazione da mg/mL a $\mu\text{g/mL}$ si utilizza un fattore di moltiplicazione di 1000.

4. RISULTATI

4.1. STUDIO DELLA CRESCITA DELLE COLTURE MICROALGALI IN CONDIZIONI DI MIXOTROFIA E FOTOAUTOTROFIA

Per ognuna delle due specie microalgali, *Chlorella sorokiniana* e *Phaeodactylum tricornutum*, sono state allestite tre colture in beute da 100 mL, in condizioni di luce continua a intensità di 100-130 μE e alla temperatura di 22 ± 2 °C. Di queste tre colture, due sono state allestite in condizioni di mixotrofia e una in fotoautotrofia come controllo. Le due diverse colture mixotrofe sono state mantenute a diverse concentrazioni di substrato organico per valutarne eventuali differenze di crescita. Tutte le colture sono state mantenute in condizioni di crescita in semicontinuo con tre diluizioni a settimana, effettuate in modo da ottenere una densità di biomassa, misurata come OD₇₅₀, predefinita. Lo scopo delle diluizioni è rifornire periodicamente la coltura di nutrienti. Il vantaggio della modalità di crescita in semicontinuo, infatti, è la possibilità di mantenere le colture di cellule in fase di crescita esponenziale per lunghi periodi di tempo. Nel corso degli esperimenti sono state cambiate le condizioni di crescita delle colture per individuare fattori che ne potessero ottimizzare la produttività. Coi dati ottenuti sono state calcolate le cinetiche di crescita e le produttività nelle diverse condizioni studiate.

4.1.1. STUDIO DELLA CRESCITA DI *CHLORELLA SOROKINIANA*

Le tre colture di *C. sorokiniana* sono state allestite in beute da 100 mL, in terreno BG 11 a pH 7,5, esposte a luce continua a intensità 100-130 μE . Si sono allestite due colture in condizioni di mixotrofia, alle rispettive concentrazioni di glucosio di 0,3% m/V e 0,6% m/V, e una coltura in condizioni di fotoautotrofia che rappresentava il controllo. La biomassa di tutte le colture è stata riportata ad un valore di OD₇₅₀ = 0,3 tre volte a settimana, corrispondente a 0,14 g/L. Nel grafico in figura 4.1 è riportata la cinetica di crescita alle tre condizioni.

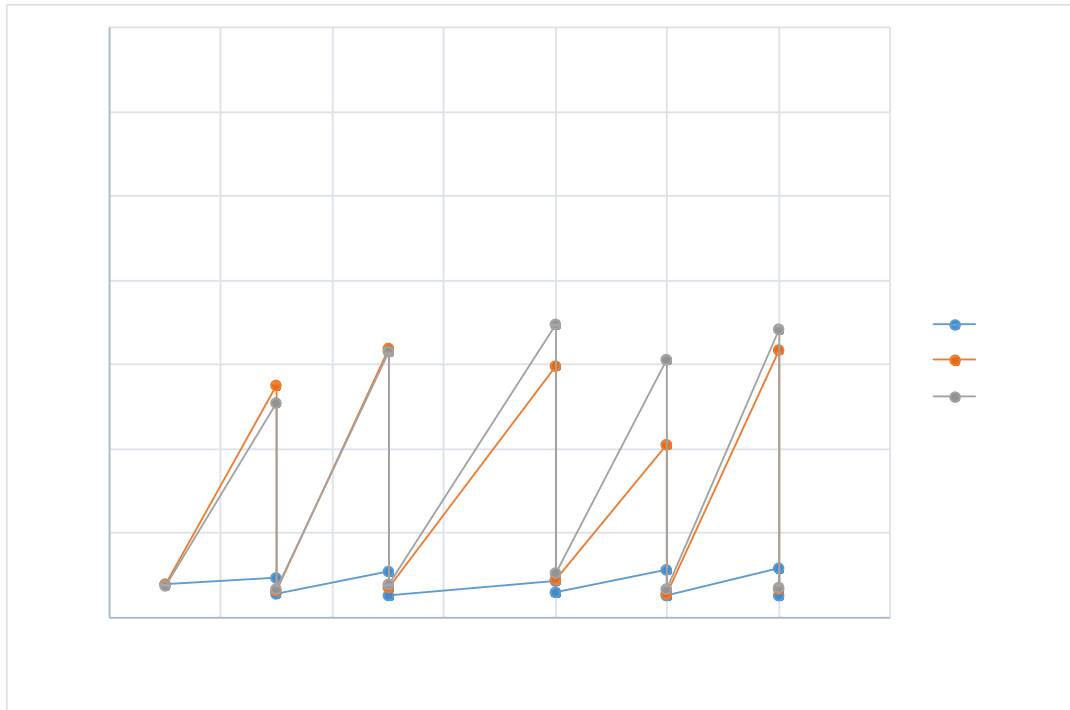


Figura 4.1: Cinetica di crescita di *C. sorokiniana* con OD standard = 0,3. Le concentrazioni di glucosio delle due colture in mixotrofia sono, rispettivamente, 0,3 %m/V e 0,6% m/V

In tutti gli esperimenti di mixotrofia effettuati non sono stati tenuti in considerazione i primi valori ottenuti in seguito all'allestimento delle colture. Questa scelta è stata fatta per evitare lo studio di dati di crescita condizionati dalla fase di acclimatamento delle colture alle nuove condizioni.

Dai valori di concentrazione della biomassa si nota una crescita superiore nelle colture mixotrofe, tuttavia, tra le due colture a diverse concentrazioni di glucosio non vi sono significative differenze di crescita. Sulla base dei dati ottenuti dalla crescita della biomassa si sono calcolate le produttività di ciascuna delle colture. I calcoli della produttività sono basati sulle misure di peso secco.

Sulla base dei dati di peso secco ottenuti sperimentalmente e per correlazione, si sono calcolati i valori medi di produttività delle colture. Le produttività sono state calcolate come rapporto tra la differenza delle concentrazioni di biomassa tra la coltura diluita e la coltura prima della successiva diluizione e il numero di giorni trascorsi (figura 4.2).

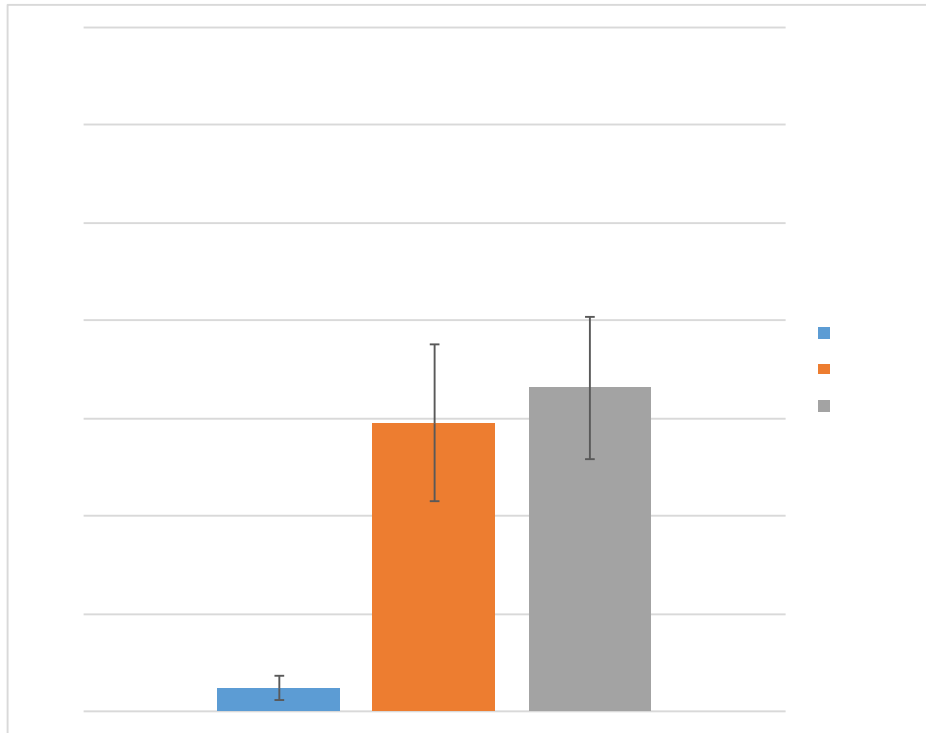


Figura 4.2: Produttività media delle tre colture alla prima condizione testata in g/L/giorno: OD standard = 0,3; concentrazioni di glucosio di, rispettivamente, 0,3% m/V e 0,6% m/V. I valori sono riportati come produttività media \pm SD (n=5). Sono state individuate differenze statisticamente significative tra le singole colture mixotrofe in relazione a quella di controllo (ANOVA, p-value < 0.05)

Dal grafico si nota come i valori di produttività risultino più di 10 volte superiori nel caso, sia della coltura cresciuta in mixotrofia, con concentrazione di substrato pari a 0,3% m/V, sia nel caso della coltura mixotrofica a concentrazione di glucosio pari a 0,6% m/V, quindi, chiaramente *C. sorokiniana* riesce ad utilizzare con ottima efficienza la presenza di carbonio organico per la crescita. Non si rilevano differenze significative di crescita tra le due colture cresciute a differenti concentrazioni di glucosio, dimostrando che l'effetto del substrato organico era saturato. Per verificare come l'effetto del glucosio potesse cambiare con la concentrazione di biomassa, in un successivo esperimento, le OD₇₅₀ standard sono state aumentate ad un valore di 1, corrispondenti a 0,45 g/L. Le restanti condizioni e le condizioni di crescita della coltura controllo in fotoautotrofia non sono state modificate (figura 4.3).

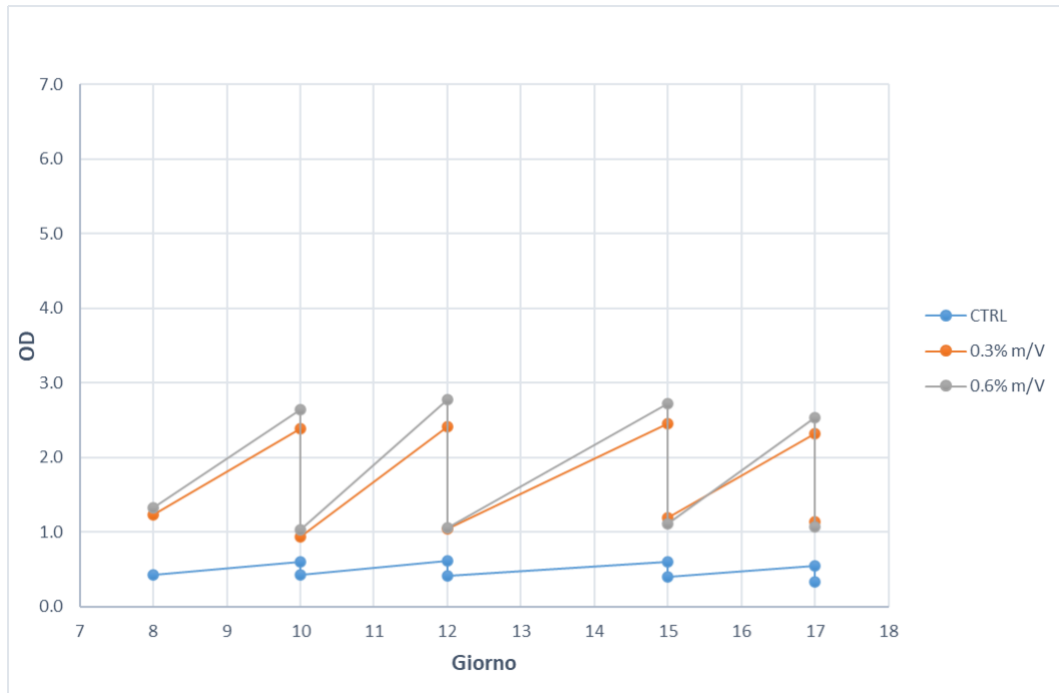


Figura 4.3: Cinetiche di crescita di *C. sorokiniana*; OD standard = 1 per le colture in mixotrofia; concentrazioni di glucosio di, rispettivamente, 0,3% m/V e 0,6% m/V

Per interpretare il dato ottenuto dalla curva di crescita è necessario calcolare le produttività medie delle tre colture. Si nota, comunque, che i valori di concentrazione di biomassa raggiunti dalle colture in mixotrofia sono più bassi di quelli raggiunti dalle colture in mixotrofia con OD₇₅₀ standard posto a 0,3.

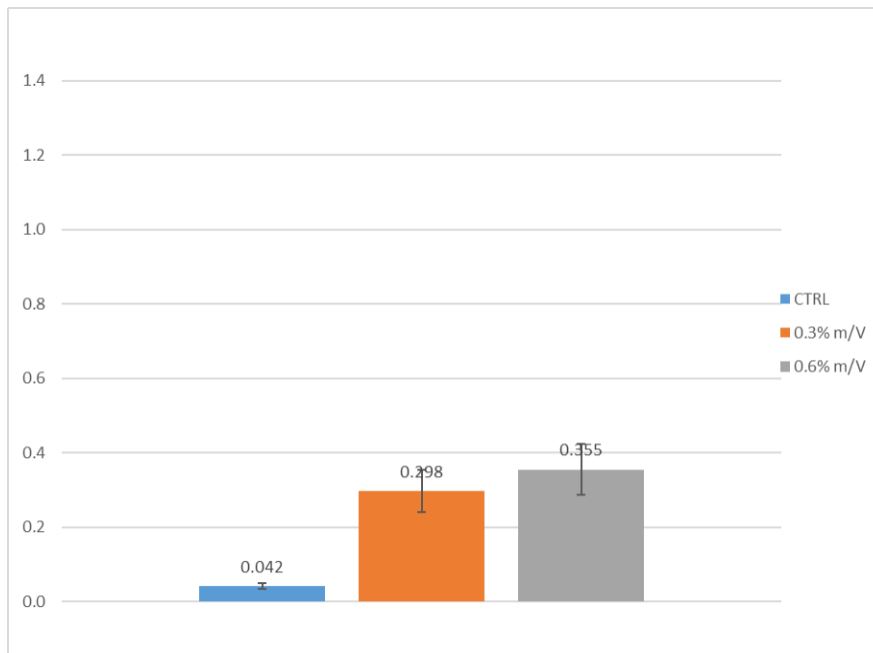


Figura 4.4: Produttività media delle tre colture in g/L/giorno: OD standard = 1 per le colture in mixotrofia; concentrazioni di glucosio di, rispettivamente, 0,3% m/V e 0,6% m/V. I valori sono riportati come produttività media \pm SD (n=4). Sono state individuate differenze statisticamente significative tra le singole colture mixotrofe in relazione a quella di controllo (ANOVA, p-value < 0.05)

Il calcolo delle produttività dimostra come ci sia un calo della crescita rispetto allo studio precedente. L'aumento della concentrazione di biomassa ha probabilmente portato ad un consumo più rapido dei nutrienti contenuti nel mezzo di crescita rendendo uno o più di questi limitanti per una crescita efficace della coltura (figura 4.4). Nel tentativo di superare il problema del fattore limitante è stata raddoppiata la concentrazione di NaNO_3 nel terreno BG11 (da 1,5 g/L nel terreno BG11 standard a 3 g/L), essendo l'azoto uno dei principali macroelementi utilizzati dalle microalghe (figura 4.5).

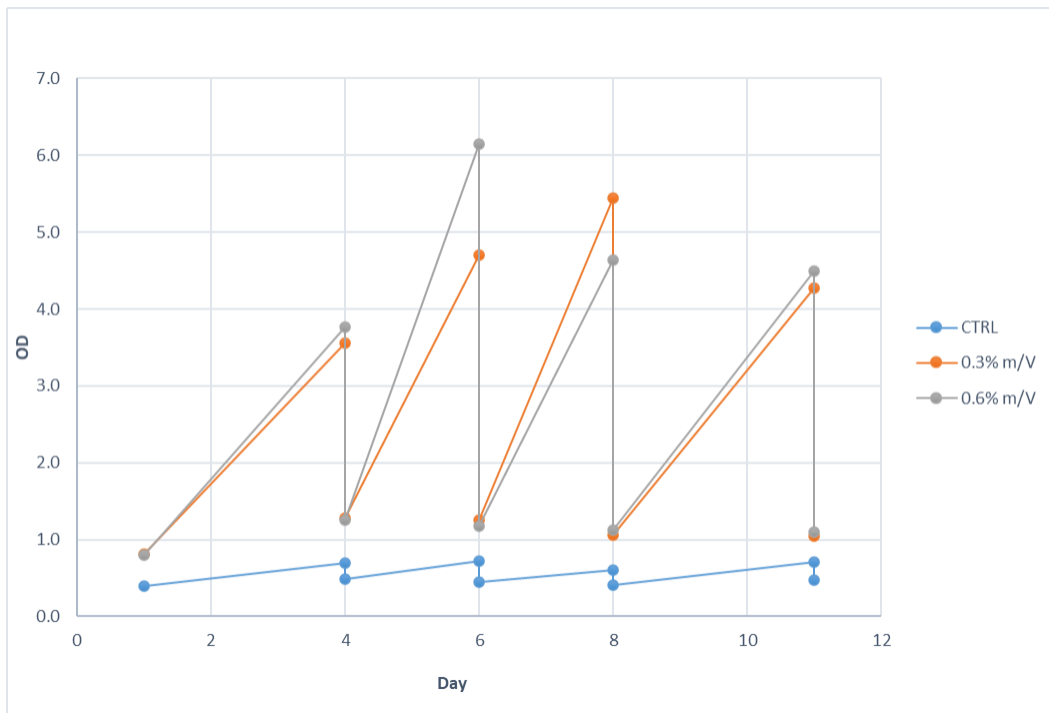


Figura 4.5: Cinetiche di crescita di *C. sorokiniana*. OD standard = 1 per le colture in mixotrofia; concentrazioni di glucosio di, rispettivamente, 0,3% m/V e 0,6% m/V; Concentrazione di nitrato doppia rispetto al terreno BG11 standard

L'aumento della concentrazione di azoto nel mezzo di coltura ha portato ad un aumento della crescita delle alghe, tuttavia, non si notano differenze significative di crescita tra le due colture in condizioni di mixotrofia, confermando che, anche in questo caso, la concentrazione di 0,3% m/V di glucosio è saturante e che, sebbene l'azoto sia stato individuato come fattore limitante, la concentrazione studiata di 3 g/L risulta comunque limitante o vi sono altri componenti del terreno che lo sono.

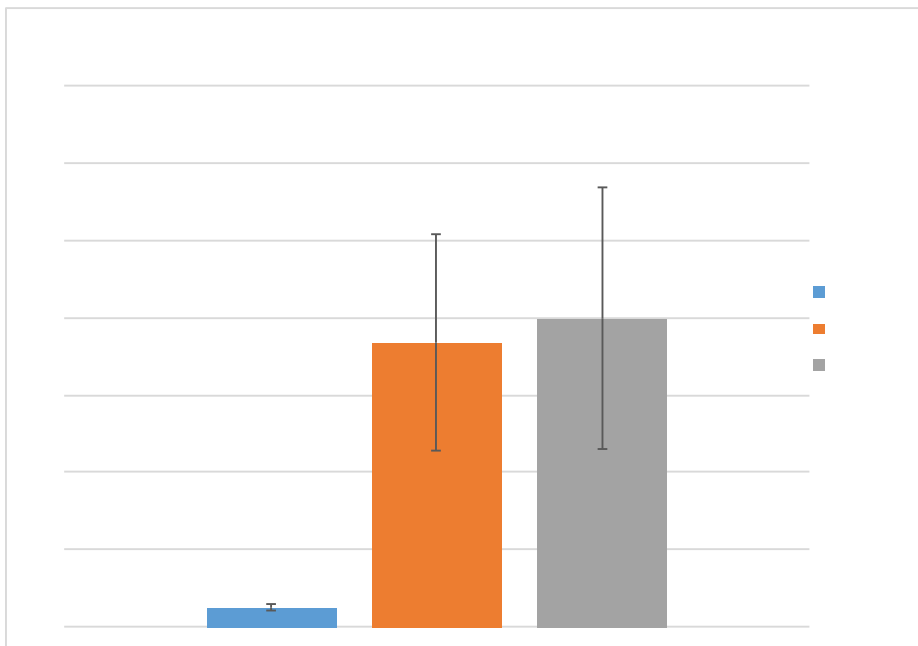


Figura 4.6: Produttività media delle tre colture in g/L/giorno: OD standard = 1 per le colture in mixotrofia; concentrazioni di glucosio di, rispettivamente, 0,3% m/V e 0,6% m/V; concentrazione di nitrato doppia rispetto al terreno BG11 standard. I valori sono riportati come produttività media \pm SD (n=4). Sono state individuate differenze statisticamente significative tra le singole colture mixotrofe in relazione a quella di controllo (ANOVA, p-value < 0.05)

Il calcolo della produttività media riconferma i dati della curva di crescita. Inoltre, la produttività delle colture in mixotrofia, con OD₇₅₀ standard pari a 1 e con concentrazione di NaNO₃ pari a 3 g/L, risulta quasi doppia rispetto alle condizioni iniziali studiate, ovvero in terreno BG11 normale con OD₇₅₀ standard pari a 0,3 (figura 4.6).

In un successivo esperimento è stata ulteriormente aumentata la concentrazione di azoto a cinque volte il valore normale (7,5 g/L). La scelta è stata dettata dall'aumento di crescita ottenuto nelle condizioni precedentemente testate, ovvero alla concentrazione di NaNO₃ di 3 g/L. Avendo individuato NaNO₃ come fattore limitante si è ipotizzato che con un ulteriore aumento della concentrazione di azoto, la concentrazione di 0,3% di glucosio non sarebbe risultata saturante. Tuttavia, le nuove condizioni di coltura hanno portato ad una crescita inferiore, presumibilmente a causa della tossicità del nitrato ad elevate concentrazioni (figura 4.7, figura 4.8).

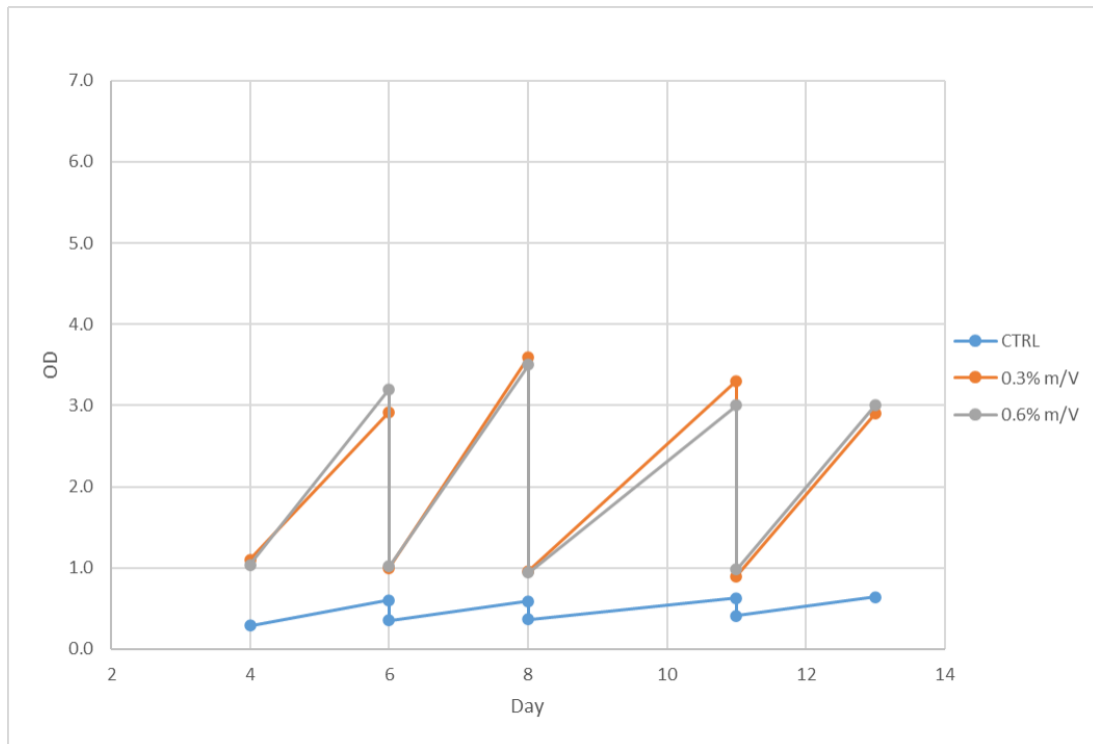


Figura 4.7: Cinetiche di crescita di *C. sorokiniana*. OD standard = 1 per le colture in mixotrofia; concentrazioni di glucosio di, rispettivamente, 0,3% m/V e 0,6% m/V; Concentrazione di nitrato pari a cinque volte quella del terreno BG11 standard

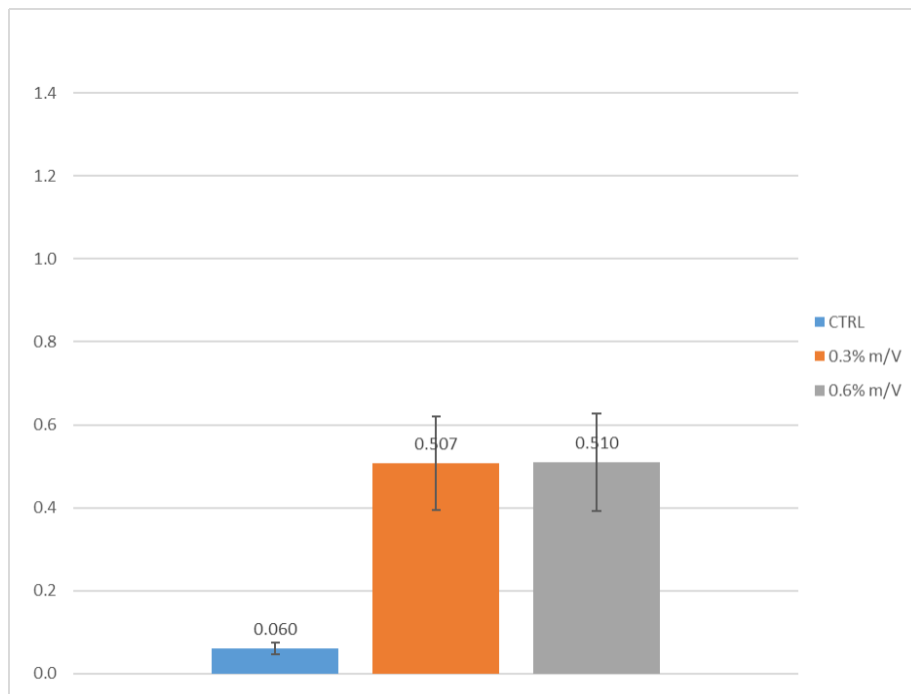


Figura 4.8: Produttività media delle tre colture in g/L/giorno: OD standard = 1 per le colture in mixotrofia; concentrazioni di glucosio di, rispettivamente, 0,3% m/V e 0,6% m/V; concentrazione di nitrato pari a cinque volte quella del terreno BG11 standard. I valori sono riportati come produttività media \pm SD (n=4). Sono state individuate differenze statisticamente significative tra le singole colture mixotrofe in relazione a quella di controllo (ANOVA, p-value < 0.05)

Infine, per verificare se l'assenza di differenze nella crescita tra le due colture fosse dovuta a uno o più componenti del terreno che risultassero limitanti, si è raddoppiata la concentrazione di tutti i componenti del terreno BG11, mantenendo il pH ad un valore di 7,5 (figura 4.9).

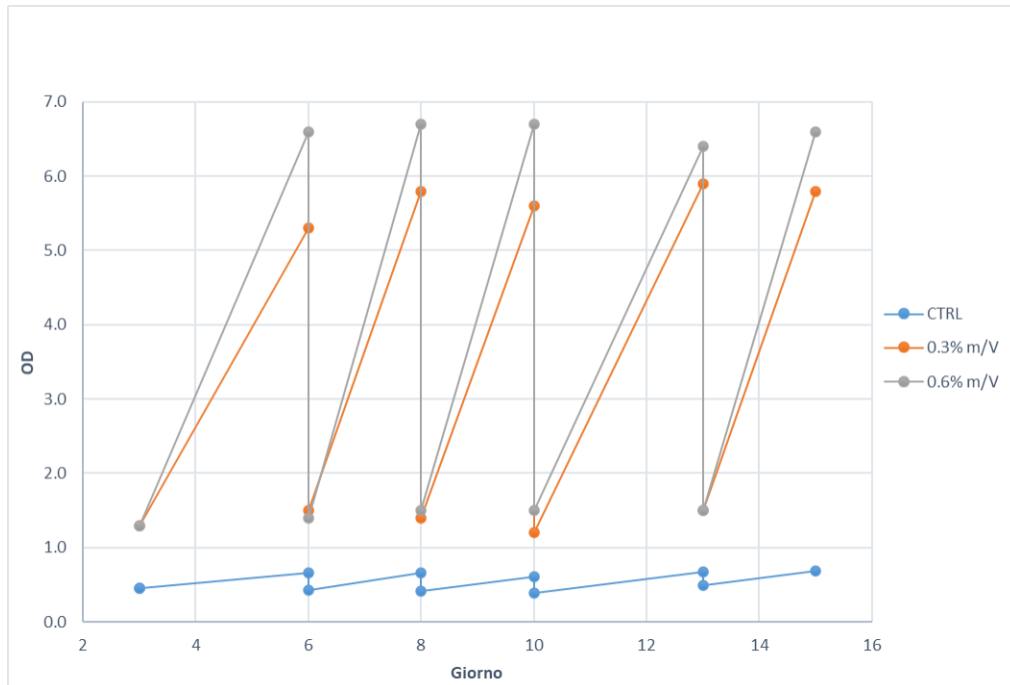


Figura 4.9: Cinetiche di crescita di *C. sorokiniana*. OD standard = 1,0 per le colture in mixotrofia; concentrazioni di glucosio di, rispettivamente, 0,3% m/V e 0,6% m/V; concentrazione doppia di tutti i componenti del terreno BG11 rispetto al mezzo standard

Lo studio delle colture mixotrofiche con le nuove condizioni dimostra una crescita leggermente superiore rispetto della crescita in condizioni di concentrazione di NaNO_3 pari a 3 g/L.

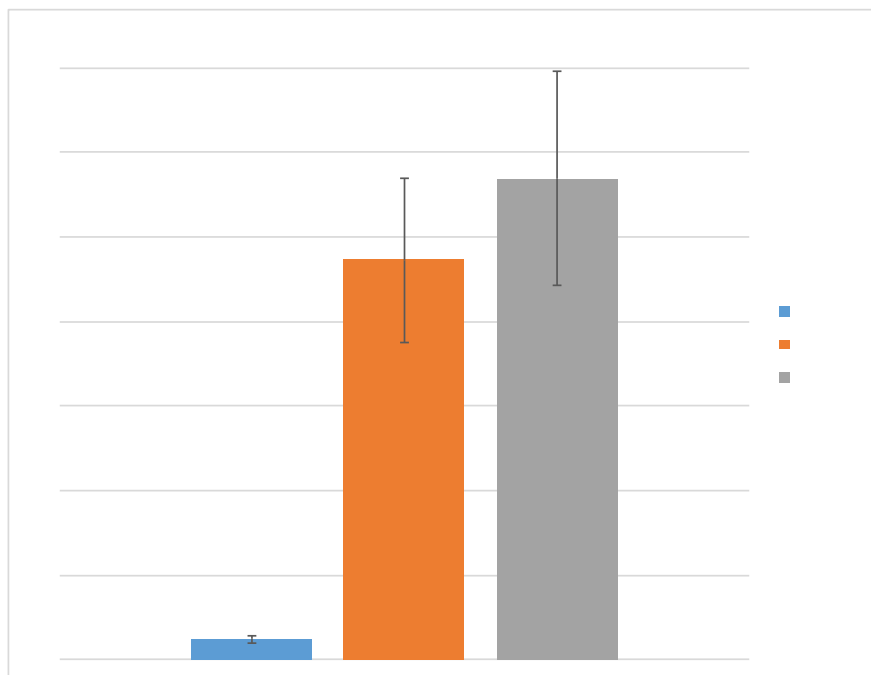


Figura 4.10: Produttività media delle tre colture in g/L/giorno: OD standard = 1 per le colture in mixotrofia; concentrazioni di glucosio di, rispettivamente, 0,3% m/V e 0,6% m/V, concentrazione doppia di tutti i componenti del terreno BG11 rispetto al mezzo standard. I valori sono riportati come produttività media \pm SD (n=5). Sono state individuate differenze statisticamente significative tra le singole colture mixotrofe in relazione a quella di controllo (ANOVA, p-value < 0.05)

Inoltre, dal calcolo delle produttività non si nota una differenza statisticamente significativa nella crescita tra i due campioni in condizioni di mixotrofia ad indicare che anche con l'aumento delle concentrazioni dei componenti del terreno BG11 la concentrazione di glucosio di 0,3% m/V risulta saturante.

La mixotrofia si dimostra essere un metodo di coltivazione molto efficace, nelle condizioni testate, con una produttività di circa 20 volte superiore rispetto al controllo in fotoautotrofia. Il metodo di coltivazione è, tuttavia, ottimizzabile come dimostrato dalla scarsa differenza di crescita tra le due colture a concentrazioni diverse di substrato (figura 4.10).

Dai risultati ottenuti si nota che relativamente piccole concentrazioni di glucosio sono sufficienti a determinare ampi aumenti di produttività e un ulteriore studio sui possibili componenti limitanti del mezzo di crescita potrebbero determinare un ulteriore incremento di produttività a concentrazioni di substrato organico più elevate.

4.1.2. STUDIO DELLA CRESCITA DI *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

Le tre colture di *P. tricornutum* sono state allestite in beute da 100 mL, in terreno F/2 a pH 8, esposte a luce continua a intensità 100-130 μ E. Si sono allestite due

colture in condizioni di mixotrofia, alle rispettive concentrazioni di glicerolo di 0,1% m/V e 0,3% m/V, e una coltura in condizioni di fotoautotrofia. La biomassa di tutte le colture è stata riportata, tre volte a settimana, ad un valore di $OD_{750} = 0,3$, pari a 0,28 g/L. Nel grafico in figura 4.11 è riportata la crescita alle tre condizioni.

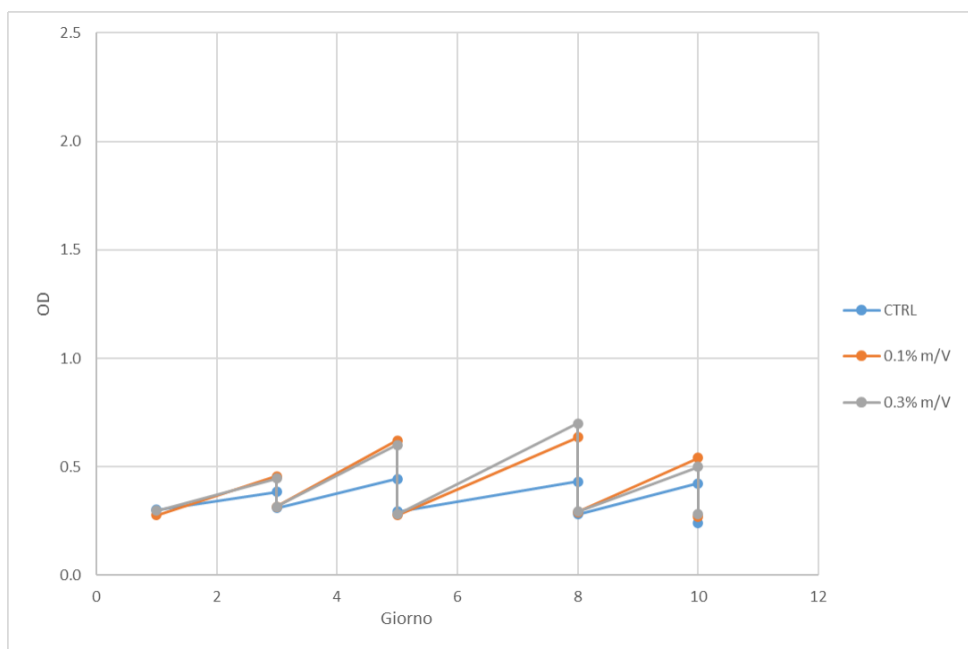


Figura 4.11: Cinetiche di crescita di *Phaeodactylum tricornutum*; $OD_{standard} = 0,3$; concentrazioni di glicerolo di, rispettivamente, 0,1% m/V e 0,3% m/V per le colture in condizioni di mixotrofia; terreno F/2

Dallo studio delle cinetiche di crescita delle prime condizioni osservate risulta che le colture in mixotrofia presentano scarse differenze rispetto al controllo in fotoautotrofia. Si è attribuita la bassa crescita alla concentrazione dei nutrienti del terreno, pertanto, si è deciso di utilizzare come mezzo di crescita il terreno F/2 PLUS, ovvero un terreno F/2 arricchito.

In successivi esperimenti (non riportati nel presente lavoro a causa dell'irrelevanza dei dati dovuta alla crescita bassa e instabile del controllo fotoautotrofo) la crescita in F/2 PLUS si è dimostrata superiore per le colture in mixotrofia, ma bassa per il controllo in condizioni di fotoautotrofia, ad indicare che il terreno F/2 presentava fattori limitanti per una efficace crescita mixotrofica. La scarsa crescita di *P. tricornutum* in fotoautotrofia è stata affrontata aumentando la biomassa del controllo ad un $OD = 0,5$, pari a 0,47 g/L. I successivi esperimenti sono stati svolti in terreno F/2 PLUS.

Per ottimizzare la crescita di *P. tricornutum* in condizioni mixotrofiche si è aumentato l' OD_{750} standard a un valore di 0,6, corrispondente a 0,57 g/L, ipotizzando che la scarsa crescita ottenuta negli studi precedenti fosse dovuta all'insufficiente concentrazione di biomassa e che non era in grado di metabolizzare tutto il carbonio organico fornito (figura 4.12).

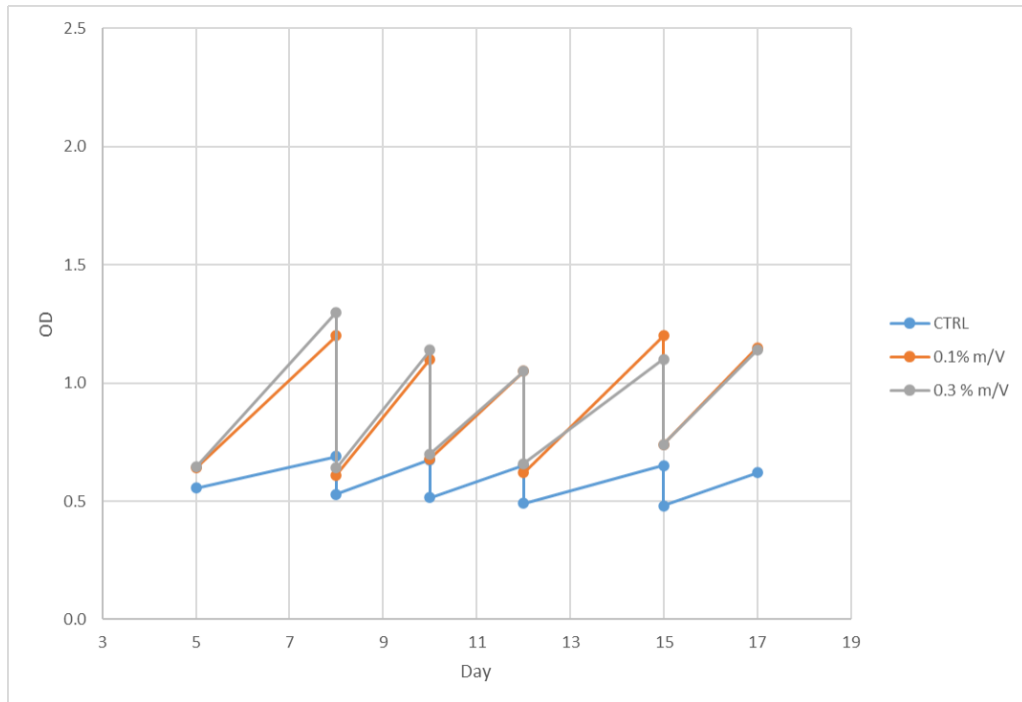


Figura 4.12: Cinetiche di crescita di *Phaeodactylum tricorutum*; OD standard= 0,6; concentrazioni di glicerolo di, rispettivamente, 0,1% m/V e 0,3% m/V per le colture in condizioni di mixotrofia; terreno F/2 PLUS

L'aumento della concentrazione di biomassa ha portato ad un significativo aumento di crescita. Non risulta che ci sia significativa differenza di crescita tra i due esperimenti in mixotrofia, pertanto, si è deciso di aumentare la concentrazione di glicerolo a, rispettivamente, 0,3% m/V e 0,6% m/V per testare se la concentrazione di substrato organico utilizzata nell'esperimento fosse troppo bassa per individuare un aumento di produttività (figura 4.13).

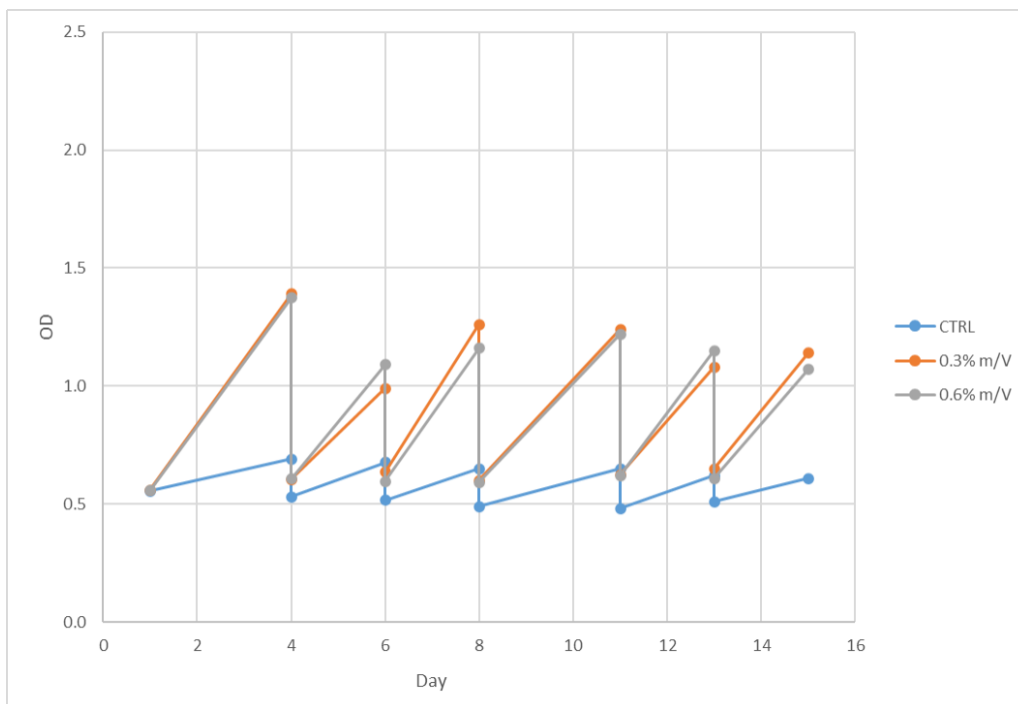


Figura 4.13: Cinetiche di crescita di *Phaeodactylum tricornutum*; OD standard= 0,6; concentrazioni di glicerolo di, rispettivamente, 0,3% m/V e 0,6% m/V per le colture in condizioni di mixotrofia; terreno F/2 PLUS

Le nuove condizioni di crescita studiate dimostrano nuovamente poca differenza di crescita tra le due colture in mixotrofia, ad indicare che il glicerolo alla concentrazione di 0,3% m/V risulta saturante, in quest'ultimo caso. A partire dai dati ottenuti si sono calcolate le produttività di tutte le condizioni testate in terreno F/2 PLUS alla concentrazione di biomassa pari a $OD_{750} = 0,6$ (figura 4.14).

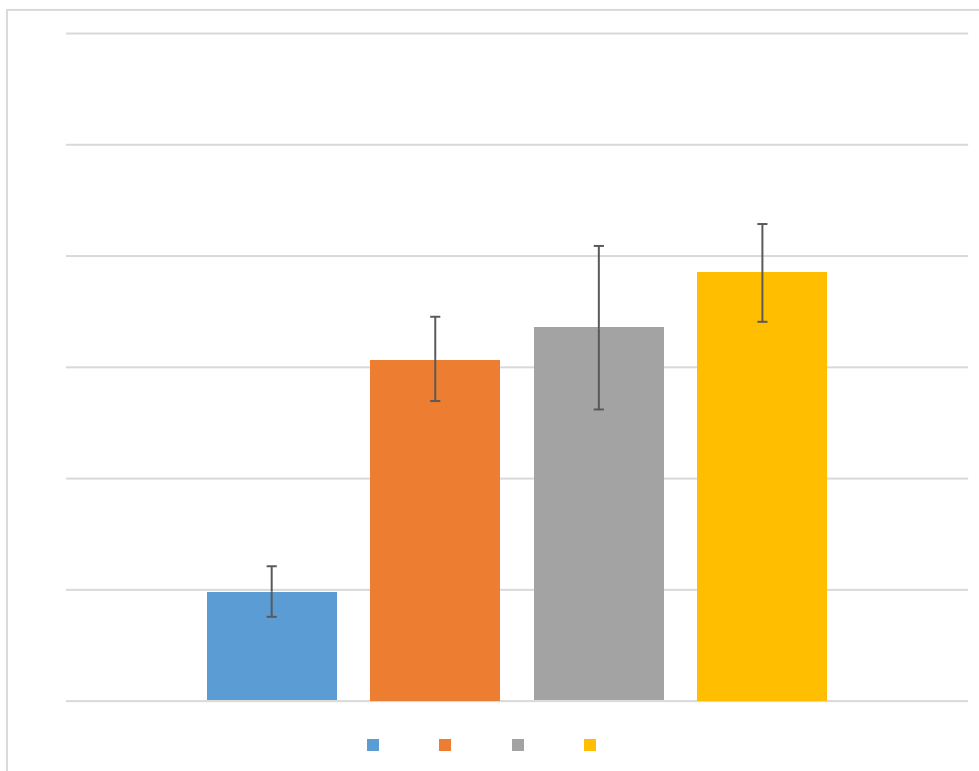


Figura 4.15: Produttività media in g L⁻¹ d⁻¹ di *P. tricornutum* nelle diverse condizioni testate in terreno F/2 PLUS. Le rispettive concentrazioni di glicerolo utilizzate per le colture in condizioni di mixotrofia sono: 0,1% m/V, 0,3% m/V, 0,6% m/V. I valori sono riportati come produttività media \pm SD (n=5). Sono state individuate differenze statisticamente significative tra le singole colture mixotrofe in relazione a quella di controllo (ANOVA, p-value < 0.05)

Dai risultati ottenuti si nota complessivamente una non significativa differenza di crescita con l'aumento della concentrazione di glicerolo, dimostrando come la concentrazione di glicerolo di 0,1% m/V risulti già saturante. Il risultato potrebbe indicare la presenza di un fattore limitante non individuato o il raggiungimento del limite ottimale di crescita in condizioni mixotrofiche utilizzando glicerolo come fonte di carbonio organico. Si nota, tuttavia, una crescita in condizioni di mixotrofia statisticamente rilevante e più che triplicata rispetto al controllo fotoautotrofico, ad indicare l'efficacia del metodo di coltivazione.

4.2. STUDIO SU MUTANTI CON RIDOTTO RAPPORTO CLOROFILLA/CAROTENOIDI MEDIANTE MUTAGENESI CHIMICA *RANDOM* DI *CHLORELLA VULGARIS* UTEX 30

Nel presente studio è stato applicato un protocollo di mutagenesi chimica *random* con l'agente alchilante EMS (*ethyl methane sulfonate*), il quale induce mutazioni per sostituzione nucleotidica. I campioni trattati con EMS sono stati piastrati in terreno solido TAP in seguito a diluizioni seriali eseguite in modo da ottenere 10 000 cellule per piastra. I campioni trattati con EMS alla concentrazione di 300 mM hanno una

mortalità del 90%, quindi si sono ottenute 1000 cellule vitali per piastra. La selezione dei mutanti è avvenuta in terreno TAP in presenza di norflurazon ad una concentrazione pari a 50 μ M.

Il norflurazon è un inibitore della sintesi dei carotenoidi che agisce inibendo l'enzima fitoene-desaturasi. Le cellule di *C. vulgaris* non sono in grado di sopravvivere allo stress indotto dall'esposizione alla luce in seguito all'inibizione della sintesi di carotenoidi, i quali hanno un ruolo fotoprotettivo negli organismi fotosintetici, pertanto, ci si aspetta che mutanti che sopravvivono in presenza di norflurazon siano o in grado di sovraesprimere carotenoidi o di non subire l'inibizione in seguito alla mutagenesi. Con questo tipo di selezione, quindi, si potrebbero ottenere mutanti con una più elevata concentrazione di carotenoidi. Alla concentrazione scelta per lo studio il norflurazon è letale per il ceppo *wild-type*. La selezione dei mutanti avviene in luce continua con intensità pari a 100-130 μ E.

Tra le colonie sopravvissute alla selezione in terreno con inibitore ne è stata selezionata e studiata quella che appariva con un fenotipo più giallo, in quanto interessante per gli scopi di questa tesi (figura 4.16).

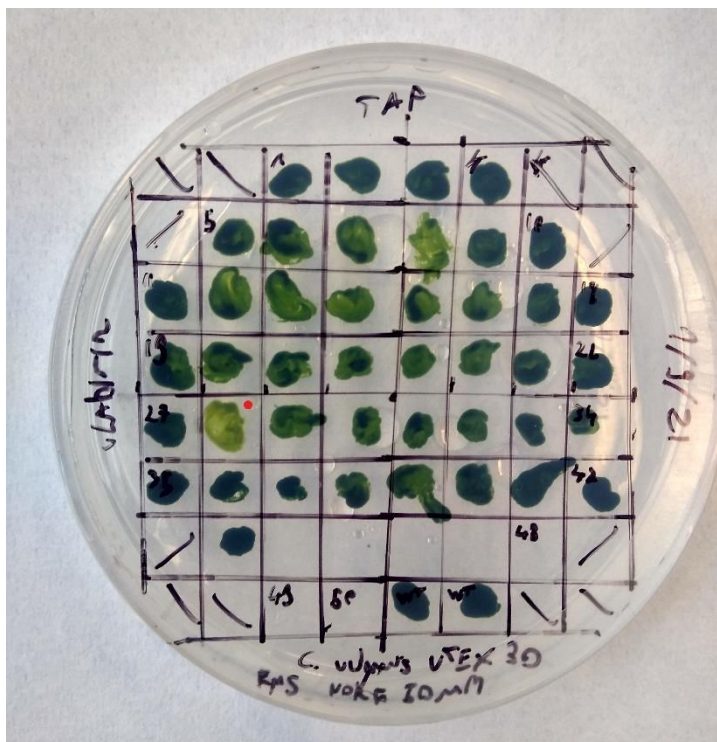


Figura 4.16: Colonie di *Chlorella vulgaris* selezionate positivamente dal norflurazon e trasferite su piastra di terreno TAP solido normale. Si nota la colonia #28 per il fenotipo empiricamente più chiaro rispetto agli altri mutanti e alle colonie wild-type in basso a destra

4.2.1. STUDIO DELLA CRESCITA DEL CEPPO MUTATO RISPETTO AL CONTROLLO *WILD TYPE*

Il ceppo con il fenotipo più chiaro e il ceppo *wild type* sono stati fatti crescere in terreno liquido TAP per cinque giorni a partire da un'OD₇₅₀ pari a 0,3. Un campione è stato fatto crescere al buio e uno a luce continua con intensità di 100-130 μE con i relativi controlli *wild-type* (figura 4.19). Sono state eseguite tre repliche per ciascuna condizione (figura 4.17, figura 4.18).

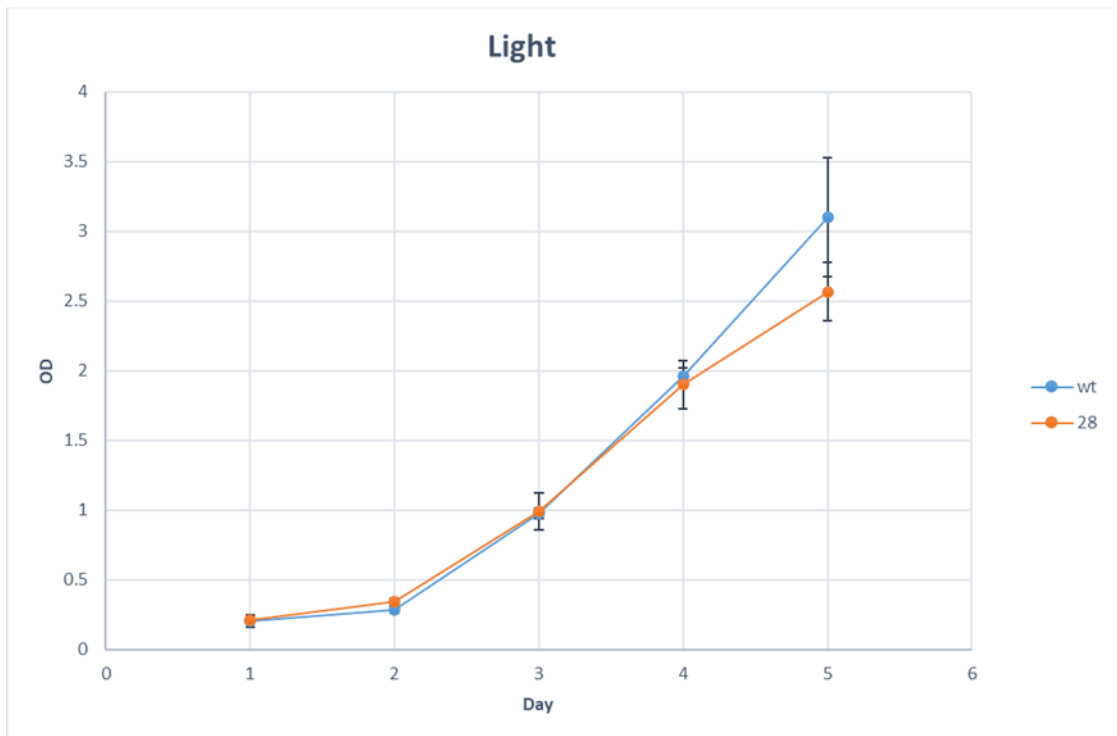


Figura 4.17: Cinetiche di crescita del ceppo *wild type* di *C. vulgaris* e del mutante #28 in presenza di luce continua

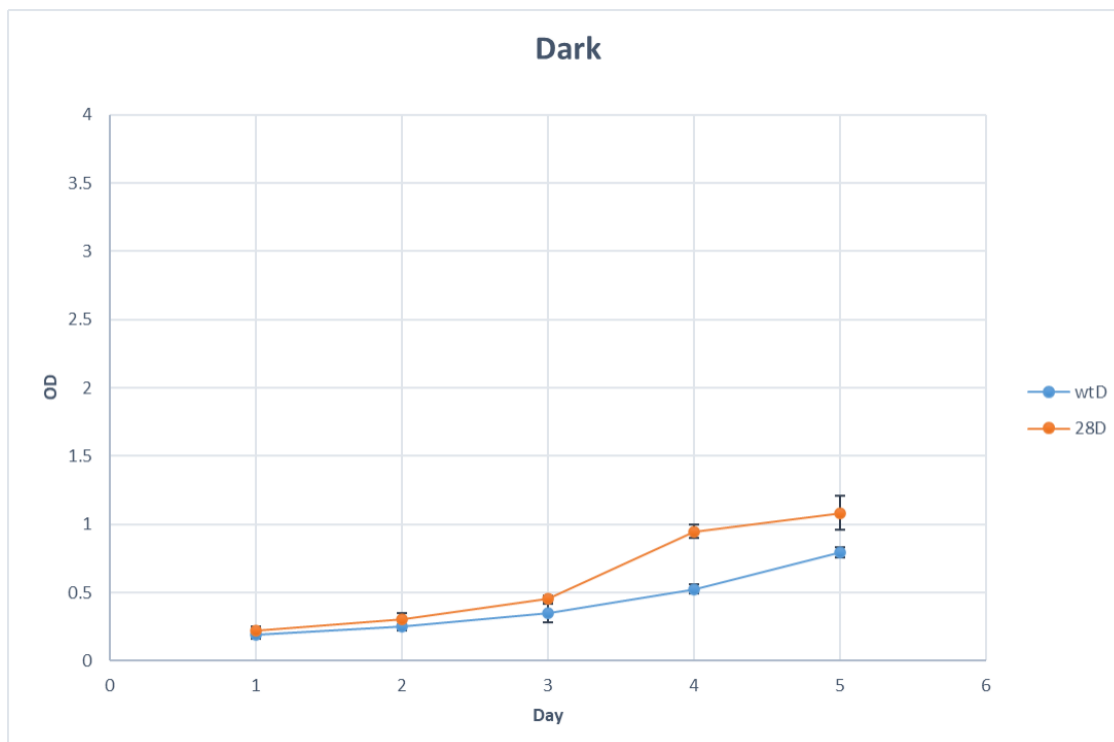


Figura 4.18: Cinetiche di crescita del ceppo *wild type* di *C. vulgaris* e del mutante #28 in assenza di luce

Lo studio delle curve di crescita è necessario per verificare se le mutazioni indotte dall'EMS compromettano la crescita nel ceppo mutato. Dai risultati ottenuti non si nota significativa differenza di crescita tra il ceppo *wild-type* ed il ceppo mutato, a indicare che la mutagenesi non ha condizionato geni coinvolti nella crescita del ceppo.

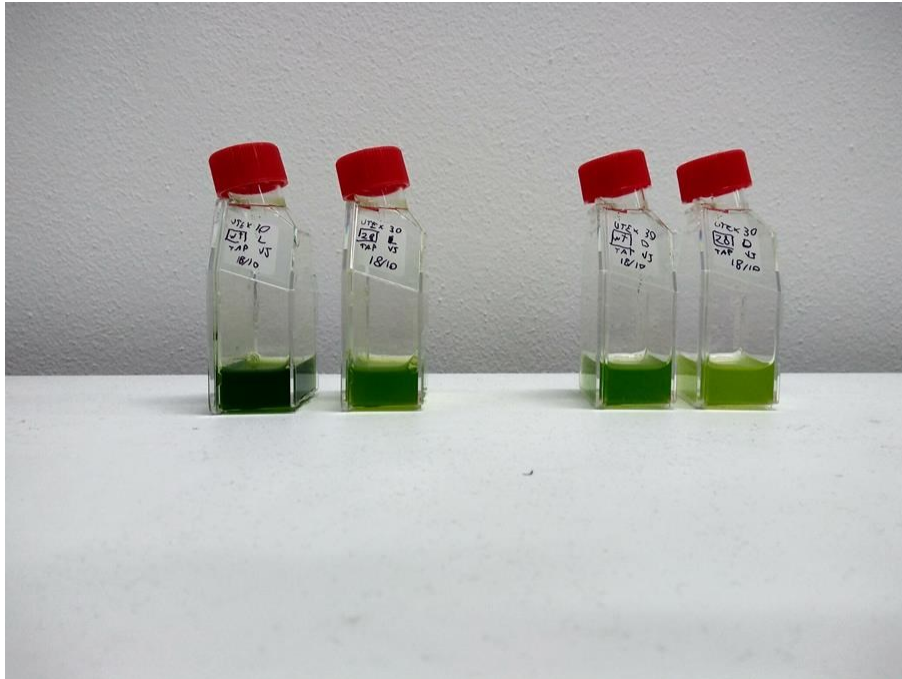


Figura 4.19: A sinistra, le due colture in terreno liquido con il ceppo *wild-type* (sinistra) e il mutante #28 (destra) nel terreno liquido in cui sono stati coltivati in presenza di luce per il calcolo delle curve di crescita e per l'estrazione dei pigmenti; a destra, le due colture in terreno liquido con il ceppo *wild-type* (sinistra) e il mutante #28 (destra) cresciuti in assenza di luce

4.2.2. ANALISI DEL CONTENUTO DI CLOROFILLE E CAROTENOIDI

L'obiettivo della mutagenesi del ceppo *Chlorella vulgaris* UTEX 30 era l'ottenimento di un mutante dal fenotipo più giallo e con un ridotto contenuto di clorofilla rispetto al ceppo *wild-type*. Al quinto giorno di crescita del mutante è stata eseguita l'estrazione con DMF dei pigmenti seguita dalla quantificazione delle clorofille e dei carotenoidi secondo i protocolli descritti nel capitolo "Materiali e metodi" (figura 4.20, figura 4.21, figura 4.22).

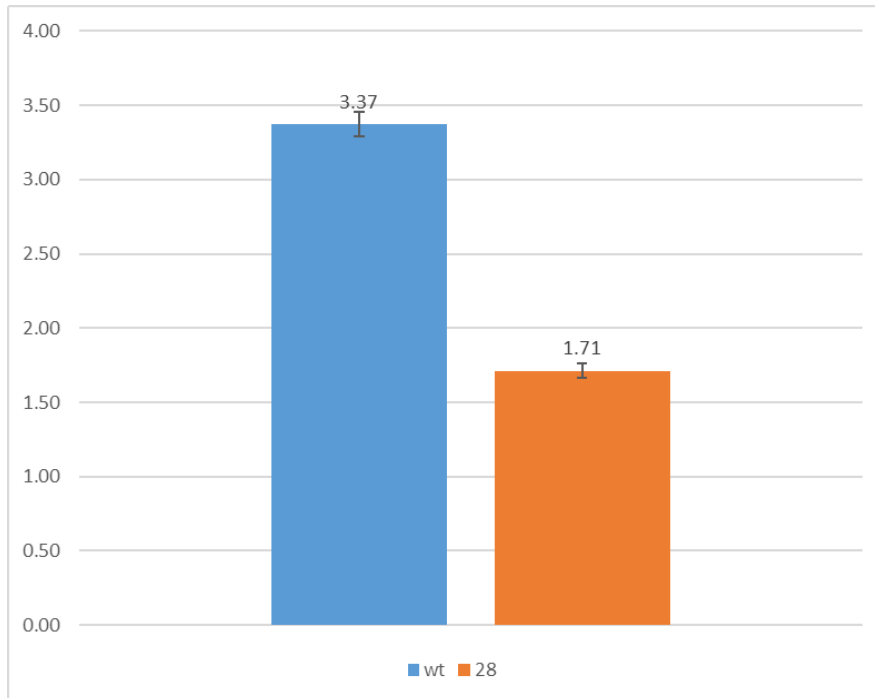


Figura 4.20: Quantificazione della clorofilla a totale. I valori sono riportati come contenuto medio di clorofilla a in $\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$ ($n=3$). Sono state individuate differenze statisticamente significative nel contenuto di clorofilla a del mutante #28 rispetto al *wild-type* (ANOVA, $p\text{-value} < 0.05$)

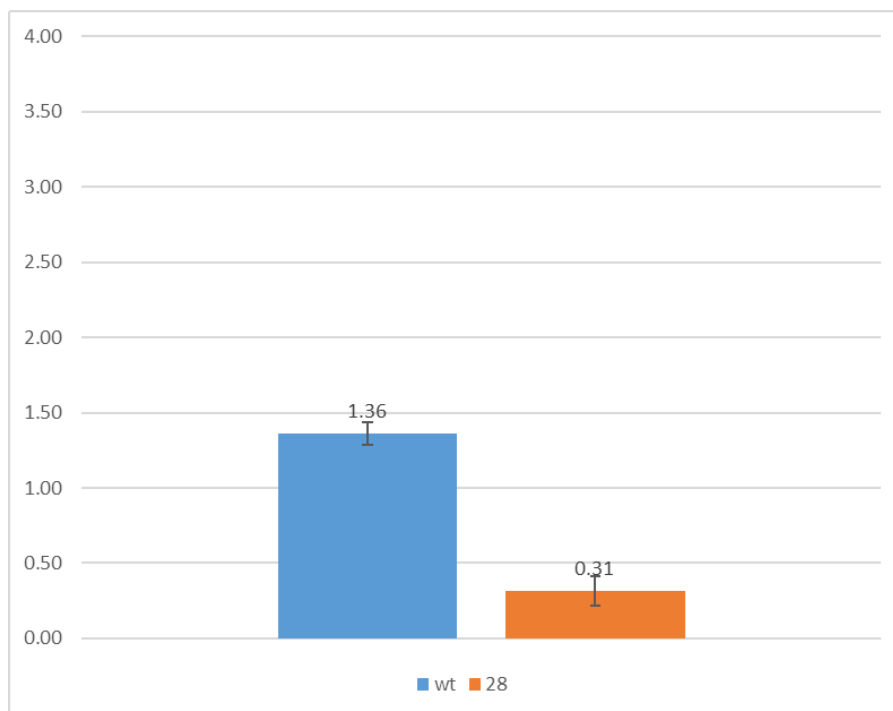


Figura 4.21: Quantificazione della clorofilla b totale. I valori sono riportati come contenuto medio di clorofilla b in $\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$ ($n=3$). Sono state individuate differenze statisticamente significative nel contenuto di clorofilla b del mutante #28 rispetto al *wild-type* (ANOVA, $p\text{-value} < 0.05$)

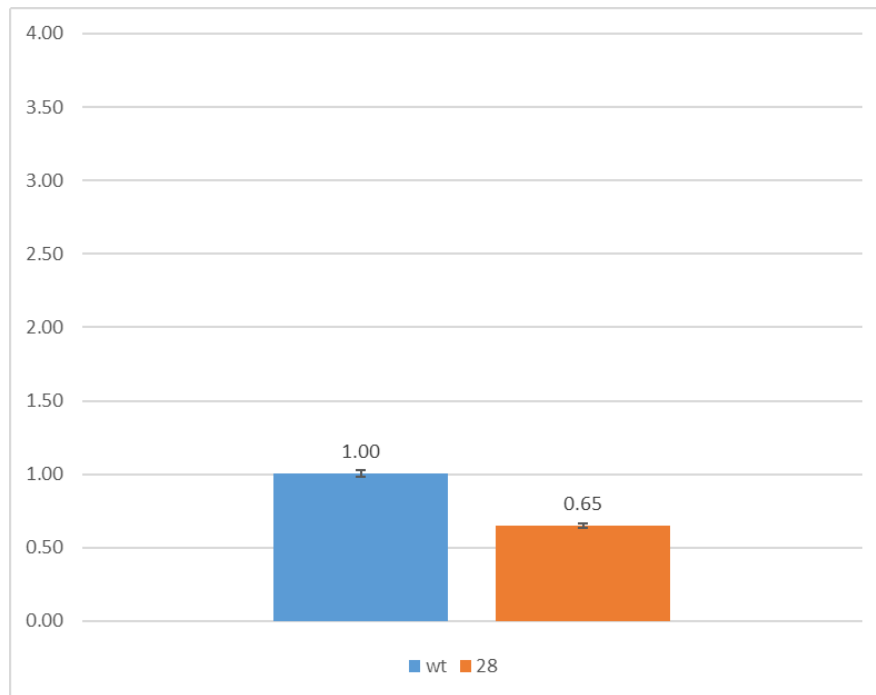


Figura 4.22: Quantificazione dei carotenoidi totali. I valori sono riportati come contenuto medio di carotenoidi in $\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$ ($n=3$). Sono state individuate differenze statisticamente significative nel contenuto di carotenoidi del mutante #28 rispetto al *wild-type* (ANOVA, $p\text{-value} < 0.05$)

Dai risultati ottenuti si nota che il contenuto di pigmenti fotosintetici nel ceppo mutato sia complessivamente inferiore rispetto al ceppo *wild-type*. In particolare, il contenuto di clorofilla a nel ceppo *wild-type* risulta due volte superiore rispetto al mutante e il contenuto di clorofilla b risulta quattro volte superiore nel ceppo *wild-type* in confronto al mutante con fenotipo chiaro. Il contenuto di carotenoidi nel mutante è circa $2/3$ del contenuto di carotenoidi nel ceppo UTEX 30 *wild-type*. Successivamente, è stato calcolato il rapporto carotenoidi/clorofille, per individuare differenze relative nel contenuto di pigmenti (figura 4.23).

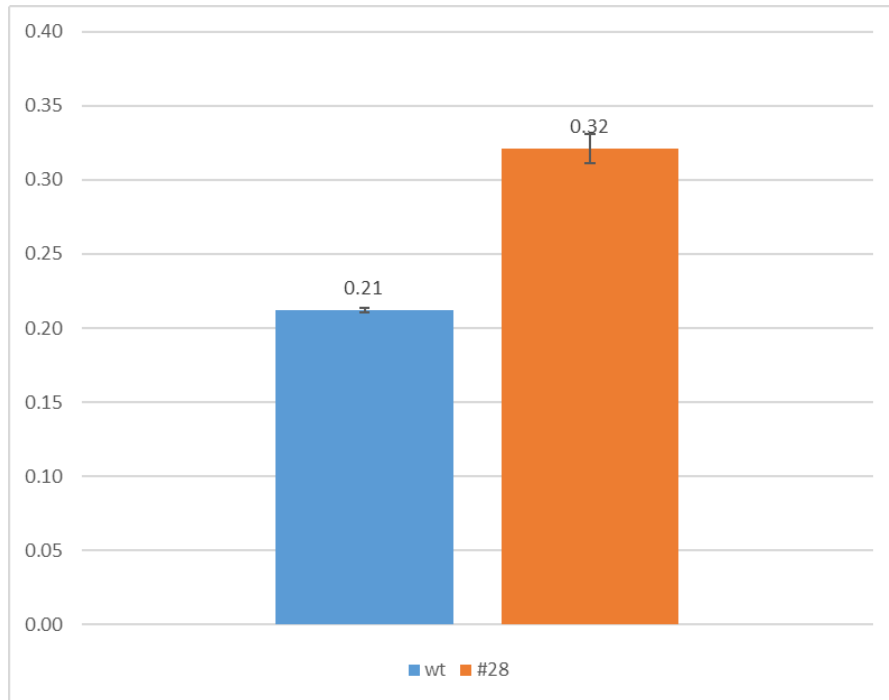


Figura 4.23: Rapporto carotenoidi / (clorofilla a + clorofilla b). I valori sono riportati come rapporto medio di clorofilla \pm SD (n=3). Sono state individuate differenze statisticamente significative nel contenuto di carotenoidi relativo al contenuto di clorofille nel mutante #28 rispetto al *wild-type* (ANOVA, p-value < 0.05)

Da quest'ultimo grafico si nota come il contenuto di carotenoidi in relazione alle clorofille totali sia superiore nel ceppo mutante in confronto alla coltura *wild-type*. Quest'ultimo dato spiega, inoltre, il colore piú giallo nel ceppo *wild-type*, dovuto al piú elevato contenuto relativo di carotenoidi.

Nonostante ci sia stato un calo della concentrazione di tutti i pigmenti, la sopravvivenza del mutante alla selezione in norflurazon è attribuibile al ridotto contenuto di clorofille, le quali, in condizioni di stress luminoso e in assenza dell'effetto fotoprotettivo dei carotenoidi, mediano la formazione di ROS. Il ridotto contenuto di clorofille e il relativamente elevato contenuto di carotenoidi sono le caratteristiche fenotipiche che, presumibilmente, hanno permesso la sopravvivenza del mutante alla selezione, conferendogli, inoltre le caratteristiche fenotipiche d'interesse per il presente studio.

5. DISCUSSIONE

5.1. STUDI DI CRESCITA DI *CHLORELLA SOROKINIANA* IN MIXOTROFIA A DIVERSE CONDIZIONI

Chlorella sorokiniana è una specie dulcicola il cui utilizzo su scala industriale risulta promettente a causa della sua capacità di crescere in condizioni di mixotrofia in presenza di diverse fonti di carbonio organico.

Nel presente studio si è analizzata la produttività ottenibile dalla coltivazione mixotrofica a diverse condizioni di concentrazione dei componenti del terreno e concentrazione di biomassa.

Le colture sono state mantenute in un sistema semicontinuo, con tre diluizioni a settimana, per poter mantenere la crescita della biomassa in una continua fase esponenziale. Sono stati raccolti quattro o cinque dati di crescita tra una condizione testata e la successiva per verificare la produttività delle colture mixotrofiche e tentare di ottimizzarla. Nel corso degli esperimenti si sono allestite una coltura controllo in sola fotoautotrofia e due colture mixotrofiche a concentrazioni di glucosio pari a 0,3% m/V e 0,6% m/V per valutare le differenze di crescita a diverse concentrazioni di substrato organico.

All'inizio degli esperimenti si è notata una significativa differenza di crescita tra il controllo in fotoautotrofia e le due colture in mixotrofia, ma poca differenza di crescita tra le due colture in mixotrofia, nonostante la concentrazione di glucosio fosse doppia in una coltura rispetto all'altra. Le produttività ottenute in mixotrofia risultano $0,59 \pm 0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ per la coltura con concentrazione di glucosio pari a 0,3% m/V e $0,66 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ per la coltura con 0,6% m/V di glucosio, mentre la coltura in fotoautotrofia presenta una produttività di $0,05 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (figura 4.3). Questo dato corrisponde ai dati riscontrati nella letteratura scientifica per le specie del genere *Chlorella* coltivate in mixotrofia, dove, nel caso di Ip et. al (2004), si rileva una crescita di dieci volte superiore a concentrazioni di glucosio di 5 g/L (pari a 0,5 % m/V) per la specie *Chlorella zofigiensis*.

L'ottimizzazione della produttività richiede necessariamente che il consumo del substrato organico sia il maggiore possibile e corrisponda alla produttività più elevata possibile, pertanto, modificando le condizioni di crescita si è tentato di ottenere una crescita più efficiente, ovvero una maggiore produttività a parità di concentrazione di substrato organico.

L'aumento della concentrazione di biomassa a un OD₇₅₀ pari a 1 a cui si diluivano le colture mixotrofiche ha portato ad una diminuzione della produttività, presumibilmente a causa del fenomeno del *self-shading*, più rilevante a concentrazioni di biomassa elevate, e alla presenza di uno o più fattori limitanti (figura 4.5).

L'aumento della concentrazione di NaNO₃ nel mezzo di crescita BG11 da 1,5 g/L a 3 g/L ha portato ad un significativo aumento della produttività nelle due colture

mixotrofiche, tuttavia, considerando le deviazioni standard relative alle produttività, senza differenze statisticamente significative tra le due (figura 4.7). Infine, per ovviare al problema della presenza di fattori limitanti si è aumentata la concentrazione di tutti i componenti del terreno. In questo caso, si è ottenuta la produttività più elevata tra tutte le condizioni studiate e una sovrapposizione tra le due colture in mixotrofia ad indicare che la concentrazione di glucosio di 0,3% m/V risulta saturante, come in tutti gli esperimenti precedenti. Tra le due colture con concentrazione di substrato organico pari a 0,6% m/V cresciute, rispettivamente, in terreno BG11 con concentrazione di NaNO₃ di 3 g/L e in terreno BG11 con concentrazione doppia di tutti i componenti del mezzo, si è notata una parziale sovrapposizione della produttività, considerando le deviazioni standard. Infatti, nel caso della coltura cresciuta in concentrazioni di NaNO₃ pari a 3 g/L la produttività ottenuta era $0,80 \pm 0,34 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mentre nella coltura con tutti i componenti del terreno a concentrazione raddoppiata era $1,14 \pm 0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Lo stesso fenomeno si è individuato tra le due colture cresciute in concentrazione di glucosio pari a 0,3% m/V. In questo caso la coltura cresciuta a concentrazioni di NaNO₃ aumentate ha dato una produttività media di $0,74 \pm 0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mentre la coltura in terreno con i componenti a concentrazioni raddoppiate ha dato una produttività di $0,95 \pm 0,20 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (figura 4.7, figura 4.11).

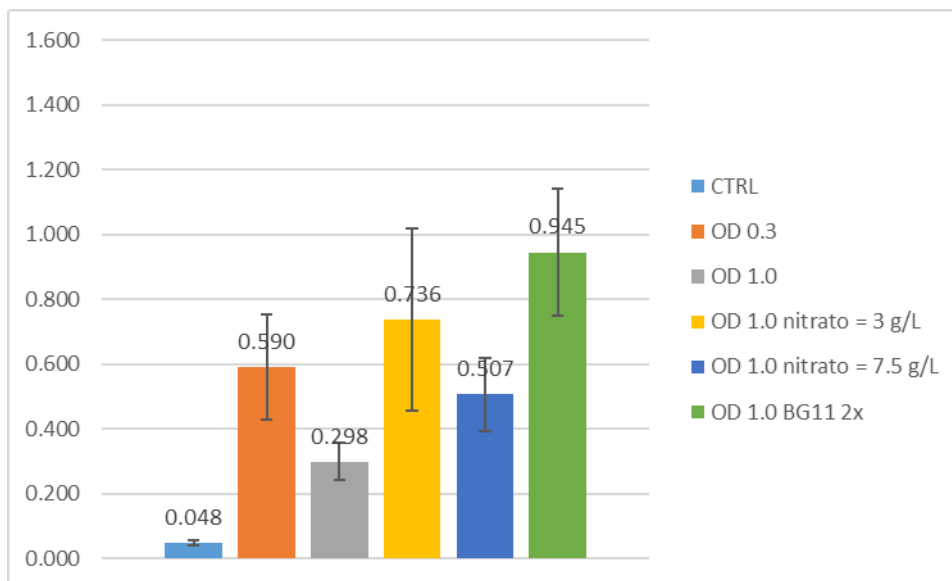


Figura 5.1: Confronto tra le diverse condizioni studiate con concentrazione di glucosio pari a 0,3% m/V. I valori sono riportati come produttività media in g L⁻¹ d⁻¹ ± SD (n=5). Sono state individuate differenze statisticamente significative tra le singole colture mixotrofe in relazione a quella di controllo (ANOVA, p-value < 0.05)

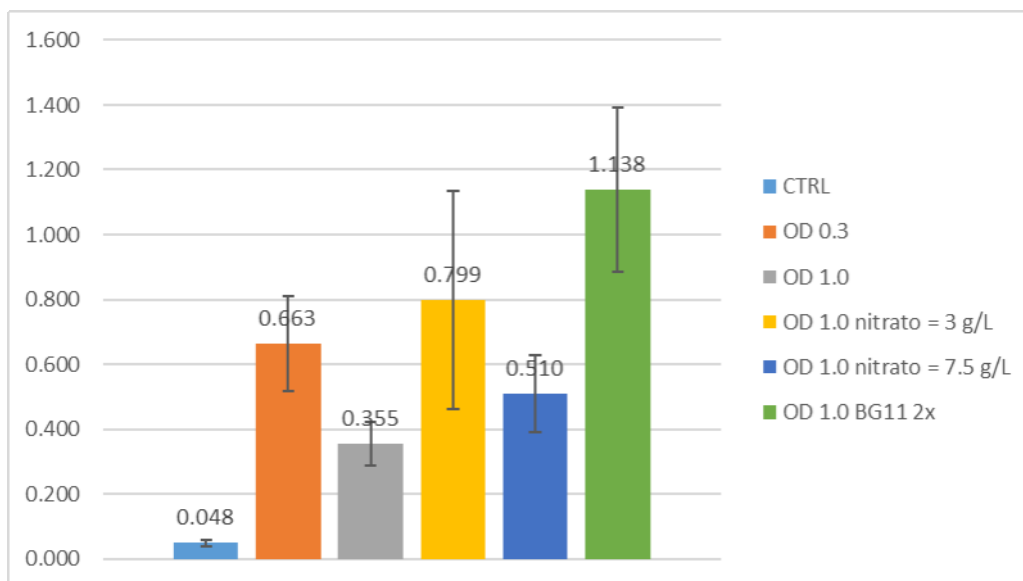


Figura 5.2: Confronto tra le diverse condizioni studiate con concentrazione di glucosio pari a 0,6% m/V. I valori sono riportati come produttività media in g L⁻¹ d⁻¹ ± SD (n=5). Sono state individuate differenze statisticamente significative tra le singole colture mixotrofe in relazione a quella di controllo (ANOVA, p-value < 0.05)

Infine, confrontando la produttività ottenuta in tutte le condizioni diverse testate e a parità di concentrazione, si è notato, che, ad eccezione dell'ultima condizione testata, la produttività ottenuta per le colture a OD₇₅₀ standard pari a 1 si presentano statisticamente sovrapposte con quella a OD₇₅₀ di 0,3, dimostrando la presenza di uno o più fattori limitanti. Inoltre, tra la prima condizione studiata, ovvero in terreno

BG11 normale ad una concentrazione di biomassa di 0,14 g/L (OD = 0,3), e l'ultima condizione studiata, ovvero in terreno BG11 con tutti i componenti a concentrazione doppia e concentrazione di biomassa standard di 0,45 g/L (OD = 1), c'è una statisticamente significativa differenza di produttività (p-value < 0,05, tra le due condizioni in terreno normale e arricchito, sia per le colture a concentrazione di substrato pari a 0,3% m/V, sia 0,6% m/V). Quest'ultimo dato dimostra che è la crescita a densità di biomassa più elevata è limitata da componenti del terreno di crescita. Sono necessari ulteriori studi per l'individuazione precisa dei componenti coinvolti e delle concentrazioni di questi componenti necessarie per un'ottimale crescita di *C. sorokiniana* in condizioni di mixotrofia. Il confronto tra le diverse condizioni testate è stato eseguito per, rispettivamente, tutte le colture a concentrazione di substrato organico di 0,3% m/V e 0,6% m/V. (figura 5.1, figura 5.2).

5.2. STUDI DI CRESCITA DI *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* IN MIXOTROFIA A DIVERSE CONDIZIONI

Phaeodactylum tricornutum è una specie di microalga marina particolarmente interessante a livello industriale per la sua capacità di produrre acidi grassi polinsaturi, per il suo utilizzo nella produzione di biocarburanti e per la capacità di utilizzare glicerolo come fonte di substrato organico, in quanto il glicerolo è un *by-product* nella produzione di biocarburanti.

Nel presente lavoro si sono studiate la crescita e la produttività di tre colture di *P. tricornutum*, una in fotoautotrofia con la funzione di controllo e due in mixotrofia a diverse concentrazioni di glicerolo e in un sistema semicontinuo con tre diluizioni a settimana. I diversi esperimenti sono stati eseguiti in modo tale da ottimizzare la produttività della specie in mixotrofia e tentando di individuare fattori che influenzassero la crescita della biomassa.

Nel primo esperimento le colture sono state allestite in beute da 100 mL in terreno F/2 e l'OD₇₅₀ standard a cui si riportavano le concentrazioni di biomassa ad ogni diluizione era pari a 0,3, con le concentrazioni di glicerolo nelle due colture in mixotrofia pari a 0,1% m/V e 0,3% m/V. Dallo studio delle cinetiche di crescita, in questa prima prova, si è notata una bassa differenza di crescita tra il controllo e le colture in mixotrofia, con un minimo di concentrazione di biomassa di 0,34 g/L (OD₇₅₀=0,45) al giorno 3 e massimo di concentrazione di biomassa di 0,53 g/L (OD₇₅₀=0,7) al giorno 8 della coltura mixotrofica con la concentrazione di glicerolo pari a 0,3% m/V e un minimo di concentrazione di biomassa pari a 0,29 g/L (OD₇₅₀=0,38) al giorno 3 e un massimo di concentrazione di biomassa pari a 0,34 (OD₇₅₀=0,44) al giorno 5 per la coltura in fotoautotrofia (figura 4.12). La bassa crescita ottenuta da questa prima prova ha portato a ipotizzare che il terreno presentasse fattori limitanti per una crescita adeguata delle colture mixotrofiche e

che fosse insufficiente per determinare effettive differenze di crescita tra il controllo in fotoautotrofia e le colture mixotrofiche. Si è pertanto deciso di utilizzare un terreno F/2 PLUS, il quale presenta maggiori concentrazioni dei componenti, rispetto al terreno F/2 standard. Dai dati ottenuti nel corso del lavoro, si è generalmente notata una scarsa crescita della coltura in fotoautotrofia in terreno F/2. La scarsa crescita del controllo influenza l'efficienza pratica delle diluizioni periodiche e la rilevanza dei risultati ottenuti in mixotrofia, condizionata da un controllo stabile. Pertanto, le problematiche pratiche legate ad una crescita efficiente della specie sono state ovviate aumentando l'OD standard a 0,6, corrispondenti ad una concentrazione di biomassa di 0,57 g/L.

Si sono eseguiti due esperimenti successivi aumentando la concentrazione di biomassa delle colture in mixotrofia ad un OD₇₅₀ di 0,6 e della coltura in fotoautotrofia a 0,5 per tentare di ottimizzare il consumo dei nutrienti e del substrato organico in modo da ottenere un incremento di crescita.

Nel primo di questi esperimenti è stata mantenuta la concentrazione di, rispettivamente, 0,1% m/V e 0,3% m/V di glicerolo delle colture in mixotrofia, mentre nel secondo esperimento è stata aumentata la concentrazione di substrato organico a 0,3% m/V e 0,6% m/V. Nel secondo esperimento si è aumentata la concentrazione di glicerolo per verificare se concentrazioni superiori dessero aumenti rilevanti di crescita e se la concentrazione di 0,1% m/V fosse effettivamente saturante.

Dal calcolo delle produttività medie delle colture si nota un leggero aumento della produttività all'aumentare della concentrazione di glicerolo, tuttavia, questo non risulta statisticamente significativo prendendo in considerazione le deviazioni standard, infatti, la produttività media della coltura con la concentrazione di glicerolo di 0,1% m/V risulta essere $0,15 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mentre quella alla concentrazione 0,6% m/V è $0,19 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, dimostrando come il substrato organico alla concentrazione di 0,1% m/V sia saturante, nonostante la concentrazione sia sei volte superiore nel secondo caso, rispetto al primo (figura 4.16). C'è, tuttavia, un significativo aumento di produttività nelle colture mixotrofiche rispetto alla produttività media della coltura cresciuta esclusivamente in fotoautotrofia, che corrisponde a $0,049 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Si ha, perciò, una produttività quasi tre volte superiore nella mixotrofia con glicerolo rispetto alla coltivazione in sola autotrofia, indicando l'efficacia, statisticamente significativa, della coltivazione mixotrofica di *P. tricornutum*.

Il dato ottenuto nel presente lavoro corrisponde a ciò che si riscontra nella letteratura scientifica, per esempio, nel caso di Min et al. (2020) in cui si è individuato un aumento della produttività da 1,28 fino a 1,6 volte nelle colture mixotrofiche rispetto alla fotoautotrofia. Le differenze di produttività sono da attribuire da un diverso set-up dell'esperimento, ovvero: il diverso ceppo utilizzato, l'utilizzo di F/2 standard e l'inferiore intensità luminosa (50 µE).

In un altro studio (Garcia et al., 2005) si sono riscontrati valori paragonabili a quelli ottenuti nel presente studio, ovvero: sono state individuate produttività di $0,17 \text{ g L}^{-1}$

¹ d⁻¹ per campioni cresciuti in mixotrofia con glicerolo alla concentrazione di 0,01 M (0,09 % m/V) e non sono state individuate significative differenze di crescita rispetto alle colture cresciute in glicerolo alla concentrazione di 0,02 M (0,18 % m/V).

5.3. OTTENIMENTO DI UN MUTANTE DI *CHLORELLA VULGARIS* CON FENOTIPO GIALLO MEDIANTE MUTAGENESI CHIMICA *RANDOM*

Chlorella vulgaris è una specie utilizzata nell'industria alimentare e l'ottenimento di ceppi con caratteristiche d'interesse è un lavoro necessario ai fini di una migliore commerciabilità del prodotto sul mercato, in quanto la clorofilla influenza le caratteristiche organolettiche del prodotto finale.

L'obiettivo degli esperimenti riguardanti *C. vulgaris* è stato l'ottenimento di un mutante con un ridotto contenuto di clorofilla.

La mutagenesi è stata eseguita secondo il protocollo descritto in "Materiali e metodi": in seguito ad una conta cellulare eseguita mediante lo strumento Cellometer, è stata effettuata una diluizione proporzionata in modo tale da ottenere $15 \cdot 10^6$ cellule per 500 μ L di coltura. Le cellule sono state trattate con l'agente mutageno EMS, che determina una mortalità del 90% delle microalghe e che induce mutazioni casuali puntiformi nella restante porzione di cellule.

La selezione è avvenuta in terreno solido TAP in presenza di norflurazon alla concentrazione di 50 μ M, un inibitore della fitoene-desaturasi, un enzima della sintesi di carotenoidi che, alla concentrazione utilizzata, risulta letale per il ceppo *wild-type*. La selezione con norflurazon avviene in presenza di luce continua con intensità di 100-130 μ E, che, inducendo stress luminoso, permette la selezione positiva delle cellule in grado di superare l'ostacolo indotto dalla presenza dell'inibitore. L'obiettivo della selezione è l'ottenimento di cellule che riescano a sovrapprodurre carotenoidi, by-passando così l'inibizione indotta da norflurazon.

La selezione avviene in piastre terreno TAP solido, metodo che ha il vantaggio di ottenere colonie separate a partire dalle singole cellule piastrate.

Alla selezione su piastra sono sopravvissute 43 colonie, successivamente trasferite e numerate su una piastra terreno TAP solido normale. Delle 43 colonie mutanti ottenute, il mutante #28 è stato individuato come quello con il fenotipo empiricamente più chiaro, pertanto, si sono svolti successivi studi di questo mutante per valutarne la crescita e il contenuto di pigmenti in relazione al ceppo *wild-type* (figura 4.18).

Sono stati svolti inizialmente studi di crescita per verificare se le mutazioni indotte da EMS avessero portato a modifiche metaboliche che influenzassero la crescita del mutante. Sono state allestite una coltura in liquido in terreno TAP con il ceppo *wild-type* e una con il mutante e poste ad una densità di biomassa di $OD_{750}=0,2$ e sono

state fatte crescere per cinque giorni. Ogni giorno è stato rilevato l'OD₇₅₀ e con i dati raccolti si sono ottenute le curve di crescita del mutante #28 e del ceppo *wild-type*. L'esperimento è stato condotto sia in presenza di luce continua ad un'intensità di 100-130 μE , sia al buio e per ciascun esperimento sono state eseguite tre repliche. Dalle curve ottenute si nota che non vi è differenza di crescita significativa del ceppo mutante rispetto al *wild-type*, confermando che la mutagenesi non ha inibito la crescita nel mutante (figura 4.19, figura 4.20).

La seconda parte dello studio della colonia mutante #28 è consistita nell'estrazione dei pigmenti con DMF e la successiva quantificazione, eseguendo uno spettro nel range del visibile (da 350 a 750 nm) in tre repliche per entrambi, il ceppo *wild-type* e il ceppo mutante #28. Si sono successivamente eseguiti i calcoli per determinare il contenuto di pigmenti in $\mu\text{g/mL}$ a partire dai dati ottenuti dagli spettri come descritto nei "Materiali e metodi".

Sono state determinati i contenuti di clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi dei due ceppi e il rapporto [carotenoidi / (clorofilla a + clorofilla b)].

Dai dati ottenuti si nota una significativa diminuzione di tutti e tre i pigmenti studiati nel ceppo mutante, dato che spiega il colore generalmente più chiaro del mutante in confronto al *wild-type*. In particolare, il contenuto di clorofilla a è risultato essere $1,71 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ nel ceppo mutante contro $3,37 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ del *wild-type*, ovvero la metà. Il contenuto di clorofilla b è risultato $0,31 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ nel mutante contro gli $1,36 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ del *wild-type*, ovvero 0,2 volte quello del *wild-type*. Infine, il contenuto di carotenoidi nel mutante #28 è risultato essere 0,65 volte quello del ceppo *wild-type*, ovvero $0,65 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ contro $1,00 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ (figura 4.22, figura 4.23, figura 4.24).

Si è, successivamente, calcolato il rapporto carotenoidi / clorofille per determinare se ci fosse una diminuzione del contenuto di clorofille relativa nel mutante #28. Si rileva, in questo caso, un rapporto 1,5 volte superiore nel mutante rispetto al *wild-type*, ad indicare un'effettiva riduzione del contenuto di clorofilla in seguito all'esperimento di mutagenesi (figura 4.25).

6. CONCLUSIONI

Gli obiettivi del presente lavoro di tesi sono stati l'ottimizzazione della produttività di colture micoralgali d'interesse industriale in condizioni di mixotrofia e l'ottenimento di un ceppo mutante di *Chlorella vulgaris* con un fenotipo più chiaro rispetto al *wild-type*.

Si è notato un significativo aumento della produttività delle colture di *Chlorella sorokiniana* cresciute in mixotrofia rispetto alla sola fotoautotrofia, tuttavia, ponendo le colture a diverse concentrazioni di substrato organico non si è rilevata una significativa differenza di crescita, nonostante siano state modificate le condizioni di crescita in diversi esperimenti, in particolare modificando le concentrazioni dei componenti del terreno di coltura. Il risultato ottenuto può essere dovuto alla presenza di fattori limitanti non individuati. Per determinare la causa della limitata produttività nella coltura a più elevata concentrazione di substrato sono necessari ulteriori esperimenti.

Phaeodactylum tricornutum presenta una superiore produttività se posto in condizioni di mixotrofia rispetto alla sola fotoautotrofia, in particolare in terreni arricchiti e a concentrazioni di biomassa più elevate che superino l'effetto dovuto alla comparsa di fattori limitanti. Tuttavia, anche nel caso delle colture di *P. tricornutum*, si nota che la più bassa concentrazione di substrato risulta già saturante alle condizioni studiate. Si ipotizza che la poca crescita in presenza di glicerolo possa essere dovuta al fatto che, alle condizioni testate di composizione de terreno e concentrazione di biomassa, sia stato raggiunto il limite di produttività ottenibile e che siano necessari ulteriori studi per ottimizzare la produttività della specie. Il glicerolo, inoltre, rispetto al glucosio, utilizzato come substrato per gli esperimenti di mixotrofia con *C. sorokiniana*, rappresenta una fonte di carbonio organico meno ideale.

Infine, la mutagenesi chimica random con selezione in presenza di luce continua si è dimostrata una tecnica efficace per l'ottenimento di mutanti con minor contenuto di clorofilla. Sono stati, infatti, ottenuti più mutanti, tra i quali uno in particolare che presentasse il fenotipo d'interesse. La quantificazione dei pigmenti fotosintetici del mutante contro il ceppo *wild-type* ha dimostrato come ci sia stato una significativa diminuzione del contenuto di pigmenti, in particolare della clorofilla a e b, con un aumento del rapporto tra carotenoidi e clorofille. Dallo studio delle curve di crescita del mutante si è, inoltre, notato che la mutagenesi e la differenza nel contenuto di pigmenti fotosintetici non ha significativamente influenzato la crescita del ceppo. Il mutante ottenuto può essere utilizzato per ulteriori esperimenti di mutagenesi in modo da ottimizzarne ulteriormente il fenotipo.

BIBLIOGRAFIA

Abbate, M., Bordone, A., Cerrati, G., Di Festa, T., Melchiorre, N., Pastorelli, A.M., Peirano, A., Petruzzelli, M.R., Ungaro, N. (2012) "A New Method for Sampling Potentially Toxic Benthic Dinoflagellates," *Cryptogamie, Algologie*, 33 (2), 165-170 doi:10.7872/crya.v33.iss2.2011.153.

Aziz, M.M.A., Kassim, K.A., Shokravi, Z., Jakarni, F.M., Liu, H.Y., Zaini, N., Tan, L.S., Islam, A.B.M.S., Shokravi, H. (2020) "Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, doi:10.1016/j.rser.2019.109621.

Batista, A.P., Niccolai, A., Fradinho, P., Fragoso, S., Bursic, I., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M.R., Sousa, I., Raymundo, A. (2017) "Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility," *Algal Research*, 26, 161–171. doi:10.1016/j.algal.2017.07.017.

Beacham, T. A., Macia, V. M., Rooks, P., White, D. A. & Ali, S. T. (2015) "Altered lipid accumulation in *Nannochloropsis salina* CCAP849/3 following EMS and UV induced mutagenesis," *Biotechnol. Reports*, 7, 87–94, doi:10.1016/j.btre.2015.05.007.

Behera, S., Singh, R., Arora, R., Sharma, N.K., Shukla, M., Kumar, S. (2015) "Scope of Algae as Third Generation Biofuels" *Bioeng. Biotechnol.* 2, 1–13, doi.org/10.3389/fbioe.2014.00090.

Benedetti, M., Vecchi, V., Barera, S., Dall'Osto, L. (2018) "Biomass from microalgae: The potential of domestication towards sustainable biofactories," *Microbial Cell Factories*, 17(1). doi:10.1186/s12934-018-1019-3.

Bleakley, S. and Hayes, M. (2017) "Algal proteins: Extraction, application, and challenges concerning production," *Foods*, 6(5), 1–34, doi:10.3390/foods6050033.

Brennan, L. & Owende, P. (2010) "Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products," *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 557 – 577, doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009.

Canelli, G., Tarnutzer, C., Carpine, R., Neutsch, L., Bolten, C.J., Dionisi, F., Mathys, A. (2020) "Biochemical and Nutritional Evaluation of *Chlorella* and

Auxenochlorella Biomasses Relevant for Food Application,” *Frontiers in Nutrition*, 7. doi:10.3389/fnut.2020.565996.

Caporgno, M.P. and Mathys, A. (2018) “Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits,” *Frontiers in Nutrition*. Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fnut.2018.00058.

Cerón García, M.C., Sánchez Mirón, A.J., Fernández Sevilla, M., Molina Grima, E., García Camacho, F. (2005) “Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition,” *Process Biochemistry* 40, 297–305, doi:10.1016/j.procbio.2004.01.016.

Cerón-García, M.C., García-Camacho, F., Sánchez-Mirón, A., Fernández-Sevilla, J.M., Chisti, Y., & Molina-Grima, E. (2006) “Mixotrophic Production of Marine Microalga *Phaeodactylum tricornutum* on Various Carbon Sources”, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(5), 689-694, doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.092.

Cerón-García, M.C., Fernández-Sevilla, J.M., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Contreras-Gómez, A., & Molina-Grima, E. (2013). “Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on fructose and glycerol in fed-batch and semi-continuous modes,” *Bioresource Technology*. 147, 569-576, doi:10.1016/j.biortech.2013.08.092.

Cheirsil, B., & Torpee, S. (2012), “Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation” *Bioresource Technology*. 110, 510-516. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.125.

Chen, H. H. & Jiang, J. G. (2017) “Lipid Accumulation Mechanisms in Auto- and Heterotrophic Microalgae” *J. Agric. Food Chem.* 65, 8099–8110, doi:10.1021/acs.jafc.7b03495.

Daneshvar, E., Ok, Y.S., Tavakoli, S., Sarkar, B., Shaheen, S.M., Hong, H., Luo, Y., Rinklebe, J., Song, H., Bhatnagar, A. (2021) “Insights into upstream processing of microalgae: A review,” *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.biortech.2021.124870.

Dasan, Y.K., Lam, M.K., Yusup, S., Lim, J.W., & Lee, K.T. (2019) “Life cycle evaluation of microalgae biofuels production: Effect of cultivation system on energy, carbon emission and cost balance analysis”, *Science of the Total Environment*. 688, 112 –128. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.181.

De-Bashan, L.E., Trejo, A., Huss, V.A.R., Hernandez, J.P, Bashan, Y. (2008) “*Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater,” *Bioresource Technology*, 99, 4980–4989, doi:10.1016/j.biortech.2007.09.065.

De Martino, A., Meichenin, A., Shi, L., Pan, K., & Bowler, C. (2007) “Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions”, *Journal of Phycology*, 43, 992–1009, doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00384.

De Martino, A., Bartual, A., Willis, A., Meichenin, A., Villazán, B., Maheswari, U., & Bowler, C. (2011) “Physiological and Molecular Evidence that Environmental Changes Elicit Morphological Interconversion in the Model Diatom *Phaeodactylum tricornutum*” *Protist*. 162, 462-481 doi:10.1016/j.protis.2011.02.002.

Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N., Sukhikh, S. (2020) “Microalgae: A promising source of valuable bioproducts,” *Biomolecules*. MDPI AG, 1–24. doi:10.3390/biom10081153.

Gouveia, L., Oliveira, A.C. (2009) “Microalgae as a raw material for biofuels production”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (2), 269 – 274, doi:10.1007/s10295-008-0495-6.

Hariskos, I., & Posten, C. (2014) “Biorefinery of microalgae - opportunities and constraints for different production scenarios,” *Biotechnology Journal*, 9(6), 739–752, doi:10.1002/biot.201300142.

Ip P., Wong K., Chen F. (2004) “Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture,” *Process Biochemistry*, 39, 1761–1766, doi:10.1016/j.procbio.2003.08.003.

Khan, M.I., Shin, J.H. and Kim, J.D. (2018) “The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products,” *Microbial Cell Factories*. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/s12934-018-0879-x.

Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cai, Z., & Hu, Z. (2009). Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*. 21, 239 – 246. doi:10.1007/s10811-008-9355-z.

Lizzul, A.M., Lekuona-Amundarain, A., Purton, S., Campos, L.C. (2018) “Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230”, *Biology* 2018, 7(2), 25, doi:10.3390/biology7020025.

Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, N.S. (2010) “Microalgae for biodiesel production and other applications: A review,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 217–232, doi:10.1016/j.rser.2009.07.020.

Matsukawa, R., Hotta, M., Masuda, Y., M. Chihara, M., Karube, I. (2000) “Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*”, *Journal of Applied Phycology*, 12, 263–267, doi:10.1023/A:1008141414115

Molino, A., Iovine, A., Casella, P., Mehariya, S., Chianese, S., Cerbone, A., Rimauro, J., Musmarra, D. (2018) “Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals,” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(11), doi:10.3390/ijerph15112436.

Morais, K.C.C., Ribeiro, R.L.L., Santos, K.R., Taher, D.M., Mariano, A.B., & Vargas J.V.C. (2009), “*Phaeodactylum tricornutum* microalgae growth rate in heterotrophic and mixotrophic conditions,” *Engenharia Térmica (Thermal Engineering)*. 8(1), 84-89, doi:10.5380/reterm.v8i1.61887

Pasqua, G., Abbate, G., & Forni, C. (2011) “Botanica generale e diversità vegetale,” Piccin Ed., Padova, 592.

Perez-Garcia, O., Bashan, Y. (2015) “Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: From metabolic routes to techno-economics,” *Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design. Springer International Publishing*, 61–131, doi:10.1007/978-3-319-20200-6_3.

Philp, J. (2018) “The bioeconomy, the challenge of the century for policy makers,” *New Biotechnology*. 40, 11–19. doi:10.1016/j.nbt.2017.04.004.

Porra, R.J., Thompson, W.A. & Kriedemann, P.E. (1989) “Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy,” *Biochimica et Biophysica Acta*. 975, 384–394, doi:10.1016/S0005-2728(89)80347-0.

Ruiz, J., Olivieri, G., de Vree, J., Bosma, R., Willems, P., Reith, J.H., Eppink, M.H.M., Kleinegris. D.M.M., Wijffels, R.H., Barbosa M.J. (2016) “Towards

industrial products from microalgae,” *Energy and Environmental Science*. Royal Society of Chemistry, 3036–3043. doi:10.1039/c6ee01493c.

Safi, C. Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C. (2019) “Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35, 265-278 doi:10.1016/j.rser.2014.04.007i.

Su, M., D’Imporzano, G., Veronesi, D., Afric, S., Adani F. “*Phaeodactylum tricornutum* cultivation under mixotrophic conditions with glycerol supplied with ultrafiltered digestate: A simple biorefinery approach recovering C and N,” *Journal of Biotechnology*, 323, 73 – 81, doi:10.1016/j.jbiotec.2020.07.018.

Tan, X.B., Lam, M.K., Uemura, Y., Lim, J.W., Wong, C.Y., Lee, K.T (2018) “Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing,” *Chinese Journal of Chemical Engineering. Chemical Industry Press*, 17–30, doi:10.1016/j.cjche.2017.08.010.

Wu, X., Ruan, R., Du, Z., & Liu, Y. (2012) “Current Status and Prospects of Biodiesel Production from Microalgae” *Energies*, 5, 2667-2682, doi.org/10.3390/en5082667.

Wellburn A.R. (1994) “The Spectral Determination of Chlorophylls A and B, as Well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution” *Plant physiology* 144, 307–13, doi:10.1016/S0176-1617(11)81192-2.

Xu, L., Weathers, P.J., Xiong, X.-R., Liu, C.-Z. (2009) “Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities,” *Engineering in Life Sciences*, 178–189, doi:10.1002/elsc.200800111.

Zhan, J., Rong, J., & Wang, Q. (2017) “Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect,” *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 8505-8517, doi/10.1016/j.ijhydene.2016.12.021.