

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



**Effetto del tempo di buio e del cammino ottico sulla  
coltivazione in continuo di *Arthrospira maxima* in  
regime di luce pulsata**

Relatore: Prof.ssa Eleonora Sforza  
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Correlatore: Dr.ssa Lisa Borella  
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Controrelatore: Prof. Alessandro Alboresi  
Dipartimento di Biologia

Laureando: Adriano Porcelli

Anno Accademico 2022/2023



## ABSTRACT

In questo lavoro di tesi, il cianobatterio *Arthrospira maxima* è stato coltivato in fotobioreattori in continuo illuminati da LED a spettro ottimizzato e con luce pulsata ad alta frequenza.

Fra i vantaggi dell'utilizzo di luce pulsata vi sono l'attenuazione dei fenomeni di *self shading*, fenomeno per cui la biomassa in prossimità della fonte luminosa impedisce alla luce di raggiungere gli strati più profondi della coltura ed il *flashing light effect* (FLE), fenomeno poco caratterizzato e grazie al quale si potrebbe ottenere una maggiore produttività di biomassa rispetto all'illuminazione con luce continua, a parità di intensità media. Lo scopo di questa tesi è quello di indagare l'effetto del tempo di buio sulla crescita, basandosi sui tempi caratteristici della fotosintesi e della catena di trasporto degli elettroni. Si è preso in considerazione lo step limitante, ovvero la re-ossidazione del pool di chinoni. Il fine è quello di sfruttare il FLE, ottimizzando l'utilizzo della luce.

Si è, inoltre, indagato in modo preliminare l'effetto dello spessore del fotobioreattore: impulsi di luce ad alta intensità, infatti, permettono una migliore penetrazione della stessa nel reattore, aumentando lo spessore utile per le reazioni fotosintetiche, e quindi potenzialmente semplificando la geometria dei reattori.

L'ottimizzazione delle condizioni sperimentali è stata effettuata anche attraverso test respirometrici, ovvero tramite la misura del profilo di produzione e di consumo di ossigeno in cicli luce-buio: in particolare, è stato messo a punto un protocollo respirometrico *ad hoc* per le luci pulsate.

Grazie a questo protocollo, è stato individuato un tempo di luce ottimale, compreso nel range tra 50  $\mu$ s e 100  $\mu$ s. L'indagine sul tempo di buio, inoltre, ha portato alla supposizione di un tempo di buio minimo affinché i fotosistemi non vadano incontro a saturazione. Questo è risultato essere di circa 5 ms, dato validato anche da indagini sperimentali tramite reattori continui.

Lo studio preliminare sullo spessore, infine, ha dimostrato l'efficacia delle luci pulsate se utilizzate su reattori a spessore crescente.



# INDICE

<b>CAPITOLO 1 – Stato dell’arte</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Microalghe</b>	<b>2</b>
1.1.1 Arthrospira maxima	2
1.1.2 Pigmenti	3
1.1.2.2 Carotenoidi	4
1.2.2.3 Ficobiline	4
<b>1.2 Metodi di coltura</b>	<b>5</b>
1.2.1 Sistemi aperti	5
1.2.2 Sistemi chiusi	6
1.2.3 Coltivazione in continuo	7
<b>1.3 Fotosintesi</b>	<b>9</b>
1.3.1 Radiazione luminosa	9
1.3.2 Fase luminosa	10
1.3.2.1 Antenne per la cattura della luce	11
1.3.2.2 Fotosistema II	12
1.3.2.3 Plastochinoni, citocromo b <sub>6</sub> f e plastocianina	12
1.3.2.4 Fotosistema I	13
1.3.2.5 ATP sintasi	13
1.3.3 Fase oscura	13
<b>1.4 Illuminazione artificiale nelle colture microalgali</b>	<b>13</b>
1.4.1 Acclimatazione alla luce in cianobatteri	14
1.4.2 Tecnologie di illuminazione: Light Emitting Diodes (LED)	15
1.4.3 Spettro ottimizzato	16
1.4.4 Luce pulsata	17
1.4.4.1 Effetto dello spessore	21
<b>1.5 Modello di Zarmi: razionalizzazione del pulse basata sui centri di reazione</b>	<b>21</b>
<b>1.6 Scopo della tesi</b>	<b>24</b>

<b>CAPITOLO 2 – Materiali e metodi</b>	<b>25</b>
2.1 Specie e condizioni di crescita	25
2.2 Coltivazione in fotobioreattori	26
2.2.2 Sistema di illuminazione	27
2.3 Condizioni operative	29
2.3.1 Studio dell'effetto del tempo di buio e dell'intensità del <i>pulse</i>	30
2.3.2 Studio dell'effetto dello spessore	30
2.4 Metodi analitici	31
2.4.1 Densità ottica (OD)	31
2.4.2 Peso secco	32
2.4.3 Clorofilla e carotenoidi	32
2.5 Bilanci di materia ed energia	33
2.5.1 Produttività volumetrica ed areale	33
2.5.2 Efficienza fotosintetica	34
2.6 Protocollo respirometrico in luce pulsata	34
2.7 Modello di Zarmi	38
2.8 Analisi statistica	38
<b>CAPITOLO 3 – Messa a punto dei protocolli respirometrici</b>	<b>39</b>
3.1 Dati preliminari di protocolli respirometrici con <i>A. maxima</i> in luce continua	39
3.2 Messa a punto del protocollo respirometrico in luce pulsata	40
3.2.1 Risultati con variazione del tempo di luce	42
3.2.2 Risultati con variazione del tempo di buio	44
3.2.3 Considerazioni finali	47
<b>CAPITOLO 4 - Luce pulsata: risultati e discussione</b>	<b>48</b>
4.1 Esperimenti preliminari: studio dell'intensità di luce e del <i>pulse</i> , del tempo di luce e del tempo di permanenza	48

4.1.1 Effetto dell'intensità di luce -----	48
4.1.2 Effetto del tempo di luce, dell'intensità del <i>pulse</i> e del tempo di permanenza -----	50
<b>4.2 Studio dell'effetto della variazione del tempo di buio -----</b>	<b>54</b>
4.2.1 Studio dell'efficienza fotosintetica in luce pulsata -----	57
4.2.2 Analisi dei pigmenti fotosintetici -----	60
<b>4.3 Studio preliminare dell'effetto dello spessore -----</b>	<b>64</b>
<b>4.4 Razionalizzazione delle condizioni in luce pulsata: applicazione di modelli matematici -----</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSIONI -----</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAFIA -----</b>	<b>70</b>





## CAPITOLO 1 – Stato dell’arte

La crisi energetica, lo sfruttamento intensivo del suolo e il sempre crescente riscaldamento globale sono solo alcune delle difficoltà che l’uomo sta affrontando negli ultimi decenni e la costante crescita demografica ne sta creando sempre di nuove. Con l’aumento della popolazione, infatti, si registra un conseguente aumento della domanda di cibo, che implica a sua volta un maggior sfruttamento del suolo e ad un aumento della deforestazione.

L’emissione di gas serra riconducibili all’industria alimentare è di  $17,15 \pm 1,76$  Tg CO<sub>2</sub> eq/yr. Di questi il 58% sono prodotti dagli allevamenti e il 29% dalla produzione di cibi di derivazione vegetale (Xu et al., 2021).

È lampante che un immediato cambio di rotta sia necessario. Il mondo della ricerca da anni si impegna a trovare alternative sostenibili a processi inquinanti e dannosi per l’ecosistema. A tal proposito, lo studio delle microalghe, delle loro caratteristiche e dei possibili processi produttivi potrebbe rappresentare una possibile soluzione. Questi microrganismi fotosintetici, infatti, possono essere utilizzati per la produzione di molecole ad alto valore aggiunto, utili nella nutraceutica, per l’alimentazione umana ed animale grazie all’alto contenuto proteico o per la produzione di biocombustibili. Uno dei principali vantaggi è quello di poter essere coltivate su larga scala con un ridotto consumo di suolo sottraendo, simultaneamente, anidride carbonica dall’atmosfera.

Tuttavia, lo scale-up per la produzione industriale di microalghe è ancora molto difficile e dispendioso. I costi associati alla loro coltivazione sono elevati, soprattutto se si utilizzano fotobioreattori che necessitano di luce artificiale, e, con le attuali tecnologie, è difficile mantenere rese costanti e ottimali, a causa delle innumerevoli variabili che sono intrinseche nella coltivazione di questi microrganismi.

Dunque, viste le grandi potenzialità di questi microrganismi e le problematiche legate alla loro coltivazione, la ricerca futura dovrebbe concentrarsi sullo sviluppo di tecnologie che ne rendano la produzione economicamente sostenibile, in modo che le microalghe possano inserirsi in maniera competitiva sul mercato internazionale.

## 1.1 Microalghe

Le microalghe formano il più vasto e variegato gruppo di microrganismi fotosintetici, anche grazie alla loro spiccata biodiversità (Fu et al., 2017).

Le divergenze tra le varie specie partono dalle dimensioni, che variano tra i 5µm di *Chlorella* sp. e i 100µm di *Spirulina* sp. (Becker, 2013), fino ad arrivare alla stessa classificazione. A seconda delle specie, infatti, si possono osservare microalghe eucariotiche e microalghe procariotiche come cianobatteri (Fu et al., 2017).

Questi organismi sono di forte interesse industriale dato che sono in grado di sintetizzare numerosi composti attivi utilizzabili in medicina, per l'alimentazione, per la cosmesi e nella produzione di energia (de Morais et al., 2015). Grazie alla loro capacità fotosintetica, sono responsabili della sintesi del 50% dell'ossigeno atmosferico (Metting, 1996).

### 1.1.1 *Arthrospira maxima*

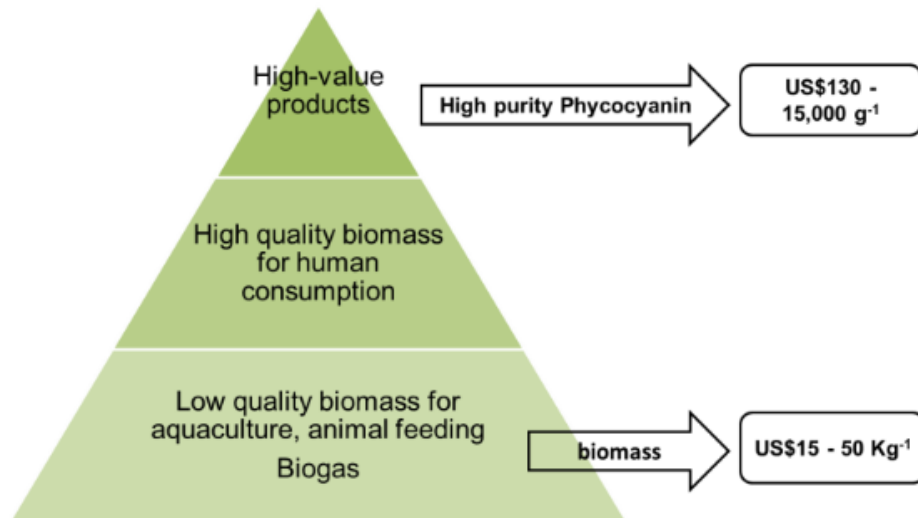
*Arthrospira maxima* è un cianobatterio filamentoso che predilige habitat ricchi di carbonati e bicarbonati e caratterizzati da elevato pH (9-11). È riconoscibile dalla particolare organizzazione elicoidale dei suoi tricomi cilindrici multicellulari (Vonshak, 1997).

Questo microrganismo è considerato un'importante fonte di biomolecole grazie al suo alto contenuto proteico (50% – 70%), alla presenza di carboidrati (15% - 25%), di acidi grassi essenziali (18%) e di vari pigmenti come clorofilla *a*, carotenoidi e ficobiline (García-López et al., 2020)

La presenza di queste biomolecole ne conferisce importanti valori nutrizionali e documentate attività antiossidanti, antidiabetiche, antitumorali e antiinfiammatorie, facendo sì che *A. maxima* sia dichiarata dalla World Health Organization un "superfood" (Kulshreshtha et al., 2008).

Anche *Arthrospira* sp., però, risente degli importanti costi di produzione legati alla sua coltivazione su scala industriale. Difatti, in questi contesti si tendono ad usare approcci che valorizzino il più possibile la biomassa, cercando di sfruttarne al meglio le potenzialità. Un esempio è quella di puntare sulla produzione di molecole ad alto valore aggiunto come le ficocianine, questo renderebbe giustificabili gli alti investimenti per la costruzione degli impianti di produzione (García-López et al.,

2020). Un'alternativa è la produzione integrata all'interno di una bioraffineria in cui il cianobatterio è coltivato utilizzando acqua di mare e digestati provenienti dal trattamento anaerobico di rifiuti animali. In questo modo si producono, però, composti a basso valore, come il biogas prodotto dai rifiuti animali (Olguín, 2012) (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Piramide del valore di *A. maxima* (García-López et al., 2020).

## 1.1.2 Pigmenti

Le microalghe sono una fonte molto importante di molecole ad alto valore aggiunto con diverse proprietà. Le più rilevanti, anche dal punto di vista economico, sono sicuramente i pigmenti prodotti. Oltre al loro utilizzo come coloranti, è stato dimostrato come queste molecole abbiano effetti benefici sulla salute (Rodrigues et al., 2015).

Nelle microalghe si trovano tre classi di pigmenti: clorofille (0,5% - 1% del peso secco), carotenoidi (dallo 0,1% fino al 14% del peso secco) e le ficobiliproteine (rappresentanti fino al 60% delle proteine totali) (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016; Kannaujiya et al., 2011).

### 1.1.2.1 Clorofille

Le clorofille sono pigmenti fotosintetici, formati da tetrapirroli con un magnesio centrale. Grazie alle loro proprietà coloranti e biologiche hanno diverse applicazioni nel campo alimentare, cosmetico e farmaceutico (Koyande et al., 2019). Esistono diverse strutture di clorofilla ma in natura predominano la clorofilla *a* (con picchi

di assorbimento a 430 nm e a 680 nm) e *b*, mentre la *c*, la *d*, la *e* e la *f* si trovano esclusivamente in alcune classi di microalghe e batteri fotosintetici (Nürnberg et al., 2018; Queiroz Zepka et al., 2019).

#### **1.1.2.2 Carotenoidi**

I carotenoidi sono strutture formate da unità isopreniche e possono avere colori che spaziano dal rosso e marrone fino al giallo e all'arancione. Si dividono in caroteni (con struttura puramente carboniosa) e xantofille (con atomi di ossigeno nella loro struttura) (Gong & Bassi, 2016). Anche i carotenoidi sono utilizzati come colorante alimentare e sono importanti molecole per la nutraceutica, per la cosmesi e per l'alimentazione animale (Silva et al., 2020). Fisiologicamente, il loro ruolo principale è quello di assorbire la luce che giunge ai fotosistemi ed eventualmente fungere da *quencher* nel momento in cui questa dovesse risultare eccessiva, evitando così il danneggiamento dei fotosistemi (Gong & Bassi, 2016).

#### **1.2.2.3 Ficobiline**

Le ficobiliproteine sono pigmenti accessori che fanno parte delle *Light-harvesting proteins* (LHP) nei cianobatteri e nelle alghe rosse. Queste proteine, collocate sulla membrana tilacoidale esterna all'interno di macrostrutture chiamate ficobilisomi, si classificano in tre classi principali: ficocianine (pigmenti blu con spettro di assorbimento a 620 nm), alloficocianine (pigmenti azzurri) e ficoeritrine (pigmenti rossi con spettro di assorbimento a 550 nm) che differiscono per struttura chimica e spettro di assorbimento. Questi pigmenti sono composti da un cromoforo legato ad un polipeptide con subunità  $\alpha$  e  $\beta$  (Hohmann-Marriott & Blankenship, 2011; Pagels et al., 2019).

La ficocianina è uno dei prodotti ad alto valore aggiunto estratti da *A. maxima* e, oltre al suo utilizzo come colorante alimentare, trova diverse applicazioni nell'industria farmaceutica, nella cosmesi e viene utilizzata come marker fluorescente (Pagels et al., 2019).

## 1.2 Metodi di coltura

Una delle sfide principali nel settore della coltivazione delle microalghe è quello dello scale-up. Se, difatti, un processo su scala laboratoriale comporta relativamente poche complicazioni, la coltivazione di microalghe a livello industriale presenta diverse problematiche.

Innanzitutto, è difficile, con grandi volumi, fornire una luce uniforme a tutta la coltura e garantire un mixing adeguato e, di conseguenza, è difficile ottimizzare la produttività della coltura. Un ulteriore problema è presentato dallo scambio gassoso: bisogna infatti eliminare l'ossigeno prodotto e fornire anidride carbonica in quantità sufficiente perché possa essere utilizzata nella fotosintesi (Jerney & Spilling, 2020).

Infine, anche alcuni metaboliti prodotti dalle stesse microalghe possono rappresentare un ostacolo allo scale-up di questo processo, in quanto possono inibire la crescita della biomassa o, ad esempio, rendere complesso il downstream (Zhuang et al., 2016).

I sistemi di coltivazione su larga scala sono divisi principalmente in sistemi chiusi e sistemi aperti.

### 1.2.1 Sistemi aperti

I sistemi aperti di coltivazione consistono nell'utilizzo dei cosiddetti "*open ponds*" e sono i sistemi più utilizzati per le coltivazioni che sfruttano la luce solare, come quelle di alghe e cianobatteri (Chisti, 2016; Pruvost et al., 2016).

Nello specifico i "*raceway ponds*" sono stagni poco profondi con una ruota a pale che permette la circolazione delle alghe e delle sostanze nutritive (Khan et al., 2022).

I principali vantaggi di questi sistemi di coltivazione sono la loro economicità e la facilità di manutenzione (Becker E.W., 1994), tuttavia non mancano gli aspetti negativi: (1) parametri importanti per la crescita microalgale, come il pH, la temperatura, il mixing, e la disponibilità di luce, non possono essere controllati e regolati in maniera ottimale; (2) l'anidride carbonica fornita, avendo bassa solubilità, viene facilmente persa dal mezzo acquoso; (3) le variazioni stagionali comportano una resa non costante; (4) in periodi caldi c'è un'alta perdita d'acqua a

causa dell'evaporazione; (5) c'è un alto rischio di contaminazioni da parte di microrganismi indesiderati che possono comportare una minore resa o la morte della specie coltivata (Jerney & Spilling, 2020).

D'altra parte, nel caso della produzione di composti a basso valore, è possibile mantenere bassi i costi operativi adottando alcune strategie come: l'utilizzo di acque reflue, il riciclo di acqua e nutrienti e l'ottimizzazione dei sistemi di raccolta (Jerney & Spilling, 2020).

### **1.2.2 Sistemi chiusi**

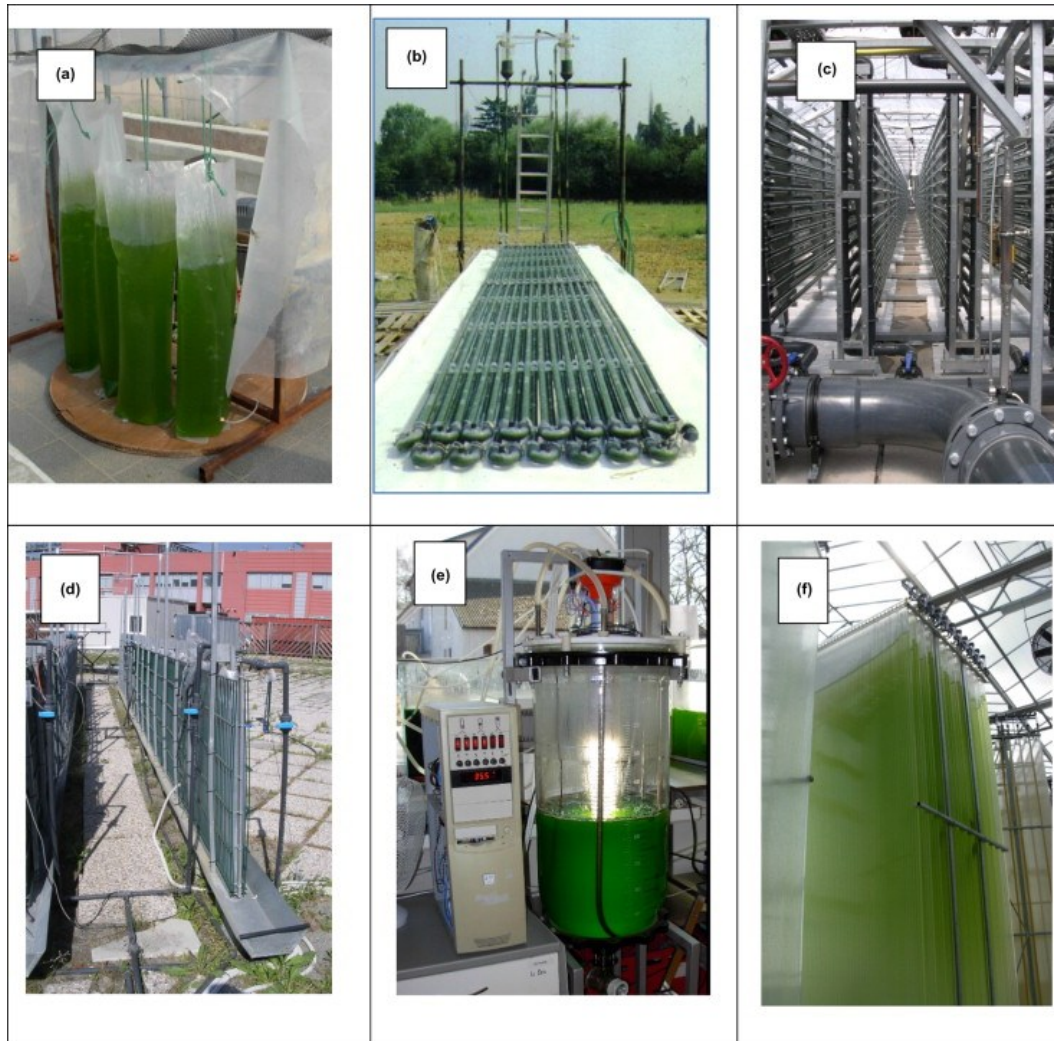
I sistemi di coltivazione chiusi (Figura 1.2) sono diversi, e variano principalmente per la forma. Essi, infatti, possono essere composti da sacche di plastica, tubulari (b, c) o laminari (d) (chiamati *flat panel*) (Kumar et al., 2010). Con questi sistemi si può sfruttare sia la luce solare che quella artificiale.

A causa degli alti costi per la costruzione e la manutenzione degli impianti, essi sono utilizzati principalmente per la produzione di prodotti ad alto valore aggiunto, ad esempio sono utilizzati in cosmesi ed in nutraceutica (Jerney & Spilling, 2020).

I sistemi chiusi, al contrario di quelli aperti, offrono un maggiore controllo dei parametri di crescita, grazie all'isolamento dall'ambiente circostante che, ad esempio, riduce il rischio di contaminazione da parte di organismi indesiderati.

Permettono, inoltre, una produttività maggiore (A. P. Carvalho et al., 2006).

Anche questi sistemi, tuttavia, hanno alcuni svantaggi. Il principale è legato agli scambi gassosi. In questi sistemi chiusi, infatti, è difficile mantenere un giusto rapporto tra anidride carbonica e ossigeno. Bisogna, inoltre, considerare che l'*uptake* di anidride carbonica da parte delle microalghe causa un innalzamento del pH che può essere critico (Jerney & Spilling, 2020).



**Figura 1.2** Esempi di fotobioreattori per la coltivazione di microalghe: (a) sacche di plastica; (b) e (c) reattori tubulari; (d) flat panel; (e) reattore cilindrico; (f) flat plate (Masojídek & Torzillo, 2008).

### 1.2.3 Coltivazione in continuo

La coltivazione in sistemi in continuo consiste nel fornire al fotobioreattore un volume costante di terreno di crescita e, contemporaneamente, permettere la fuoriuscita di *medium* e di biomassa dal reattore (Coelho et al., 2014). Il tempo necessario a riempire il volume del reattore con una portata costante di *medium* è definito “tempo di permanenza” ( $\tau$ ) ed è una variabile operativa importante per la crescita della biomassa. Con questa modalità la coltura può raggiungere uno “stato stazionario” in cui la concentrazione di biomassa e la sua composizione macromolecolare rimangono costanti (Figura 1.3).

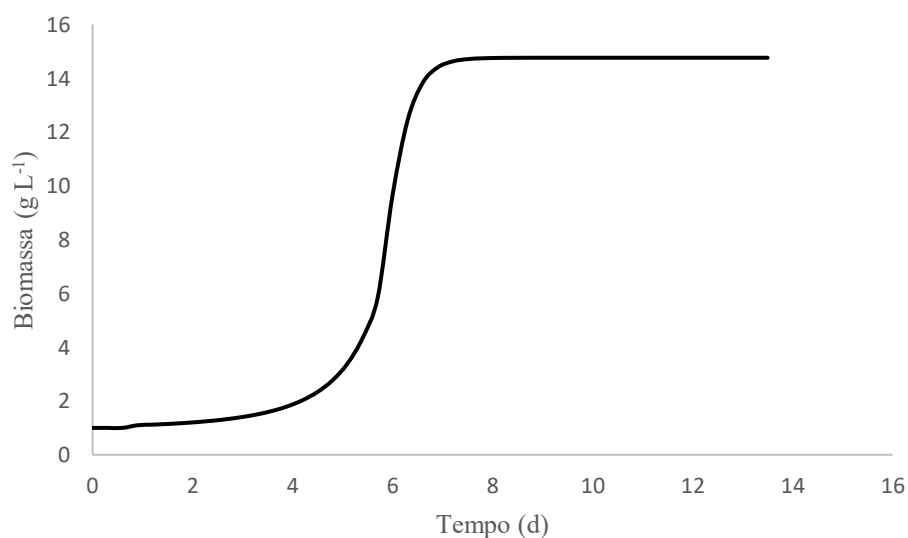
Questo sistema di coltivazione è vantaggioso rispetto ai più diffusi sistemi in batch che consistono nell’inserimento di terreno di coltura solo all’inizio del processo, il

quale continua fino al raggiungimento di una elevata densità cellulare, a seconda della disponibilità di nutrienti, prima del declino della crescita cellulare (Mathimani et al., 2019). Uno degli svantaggi principali di quest'ultima modalità consiste proprio negli alti costi operativi che devono essere affrontati ogni volta che si inizia un nuovo processo (Peter et al., 2022), oltre alle difficoltà nel mantenere costanti l'irradiazione e i livelli dei nutrienti (Zhu, 2015); problemi che verrebbero risolti lavorando in modalità continua.

I vantaggi dei processi in continuo, difatti, sono numerosi: una volta raggiunto lo stato stazionario, permettono un controllo più fine di tutte le variabili operative come quantità di CO<sub>2</sub> e intensità luminosa, proprio grazie alla concentrazione costante della biomassa (Egloff et al., 2018).

Ulteriori benefici di questa modalità di coltivazione consistono nella quasi totale eliminazione di tempi morti impiegati per la raccolta della biomassa, in quanto questa è costantemente rimossa dal bioreattore (Peter et al., 2022) e nell'eliminazione della fase di lag della crescita, consentendo una produzione maggiore e costante nel tempo (Y. H. Lee & Li, 2017).

La modalità di coltivazione in continuo non è priva di problematiche: l'installazione degli impianti, difatti, comporta costi e tempo maggiori e, a causa dei tempi di coltivazione dilatati nel tempo, aumenta la probabilità di contaminazione da parte di microrganismi indesiderati (Zhu, 2015).



**Figura 1.3** Profilo tipico della concentrazione di biomassa in un reattore in continuo.



## 1.3 Fotosintesi

Una delle caratteristiche essenziali delle microalghe è quella di essere organismi autotrofi, ovvero di sfruttare il processo della fotosintesi per la propria crescita.

La fotosintesi è un processo che prevede lo svolgersi di diverse reazioni di ossidoriduzione guidate dalla radiazione luminosa e volto alla conversione di anidride carbonica in carboidrati con il rilascio di ossigeno come prodotto di scarto (Masojídek et al., 2013).

I primi organismi capaci di convertire energia luminosa in composti organici sono comparsi circa 3 miliardi di anni fa, tuttavia questi non utilizzavano processi ossigenici. Solo in seguito sono comparsi organismi fotosintetici ossigenici come i cianobatteri e le microalghe eucariotiche (Masojídek et al., 2013).

Questo processo viene tradizionalmente suddiviso in due fasi, una prima fase di reazioni dipendenti dalla luce (fase luminosa) ed una seconda fase formata da reazioni indipendenti dalla luce (fase oscura). Nelle reazioni dipendenti dalla luce, che avvengono a livello delle membrane fotosintetiche, l'energia luminosa viene convertita in energia chimica, fornendo  $\text{NADPH}_2$  e ATP alle cellule. Nelle reazioni indipendenti dalla luce, che avvengono, ove presente, nello stroma,  $\text{NADPH}_2$  e ATP sono utilizzati nella riduzione biochimica dell'anidride carbonica in carboidrati (Masojídek et al., 2013).

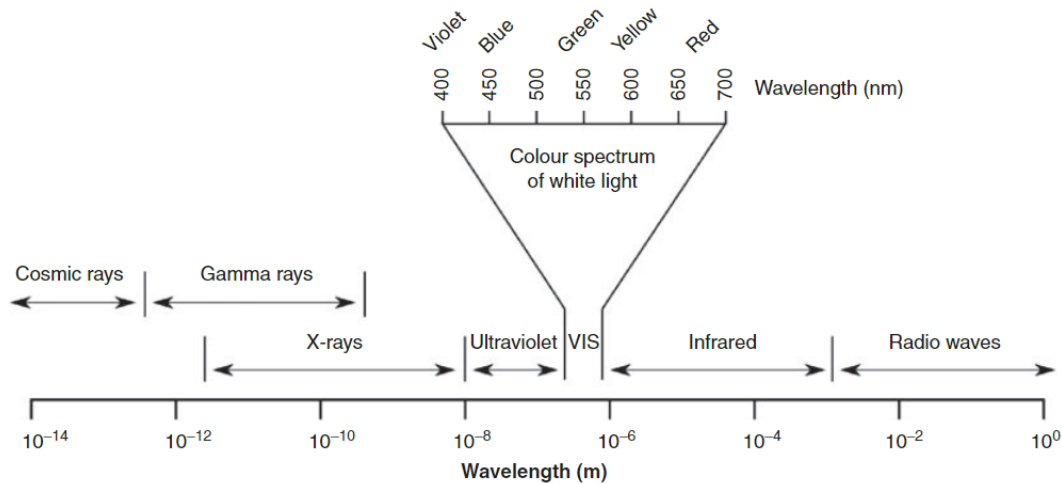
### 1.3.1 Radiazione luminosa

L'energia necessaria per la fotosintesi è fornita dalla luce. Questa è una radiazione elettromagnetica che può essere divisa in varie frazioni a seconda della lunghezza d'onda. La luce visibile è compresa tra i 380 nm e i 750 nm ed in questo range ricade anche la radiazione utilizzata per la fotosintesi che prende il nome di *Photosynthetically Active Radiation* (PAR) (Figura 1.4) (Masojídek et al., 2013).

L'energia luminosa è fornita sotto forma di quanti di energia, chiamati fotoni, che vengono assorbiti dai pigmenti fotosintetici e indirizzati ai centri di reazione dove vengono utilizzati per le reazioni fotochimiche (Jurić et al., 2013).

Anche le ficobiliproteine svolgono un ruolo nei processi di assorbimento della luce. Diversi esperimenti (Maksimov et al., 2011) hanno infatti dimostrato come questi pigmenti aumentino significativamente il valore di fluorescenza della *cross-section*,

ovvero l'area di assorbimento dei fotoni, e l'efficienza di assorbimento dei complessi di assorbimento fotosintetici nel cianobatterio *Synechocystis*. La presenza di queste strutture permette ai cianobatteri di ampliare la *cross-section* della clorofilla da 83 a 896 Å<sup>2</sup> (Maksimov et al., 2011).



**Figura 1.4** Spettro della radiazione elettromagnetica. Maggiore attenzione è posta sulle lunghezze d'onda della luce visibile (Masojídek et al., 2013).

### 1.3.2 Fase luminosa

Le reazioni della fase luminosa avvengono nelle membrane tilacoidali. Queste sono composte da un doppio strato lipidico al cui interno sono disposte varie proteine (Singer & Nicolson, 1972).

Nei cianobatteri le lamelle fotosintetiche non sono raggruppate, probabilmente a causa della presenza dei ficobilisomi idrofili. Nelle alghe, invece, sono organizzate in gruppi da tre (Masojídek et al., 2013).

Le membrane dei tilacoidi contengono cinque complessi principali: le antenne per la cattura della luce, il fotosistema II (PS II), il fotosistema I (PS I) (entrambi contenenti un centro di reazione), il citocromo b6/f e l'ATP sintasi (Figura 1.5) (Jurić et al., 2013).

Il ruolo principale delle reazioni che avvengono in questa fase è quello di fornire NADPH<sub>2</sub> e ATP per l'assimilazione del carbonio inorganico. L'energia luminosa viene convogliata in due reazioni fotochimiche svolte dal PS II e dal PS I (Masojídek et al., 2013).

I due fotosistemi operano in serie e sono connessi tra loro da una catena di trasporto degli elettroni rappresentata dal cosiddetto "schema a Z" (Hill & Bendall, 1960).

Grazie alla radiazione luminosa vengono estratti due elettroni da una molecola d'acqua in un processo chiamato "evoluzione dell'ossigeno". Questi vengono trasferiti lungo la catena di trasporto degli elettroni per produrre  $\text{NADPH}_2$  e per permettere il passaggio di protoni dallo spazio esterno all'interno delle membrane tilacoidali in modo da formare un gradiente di pH. Questo gradiente permette, poi, la formazione di ATP grazie all'azione dell'ATP sintasi (Masojídek et al., 2013).

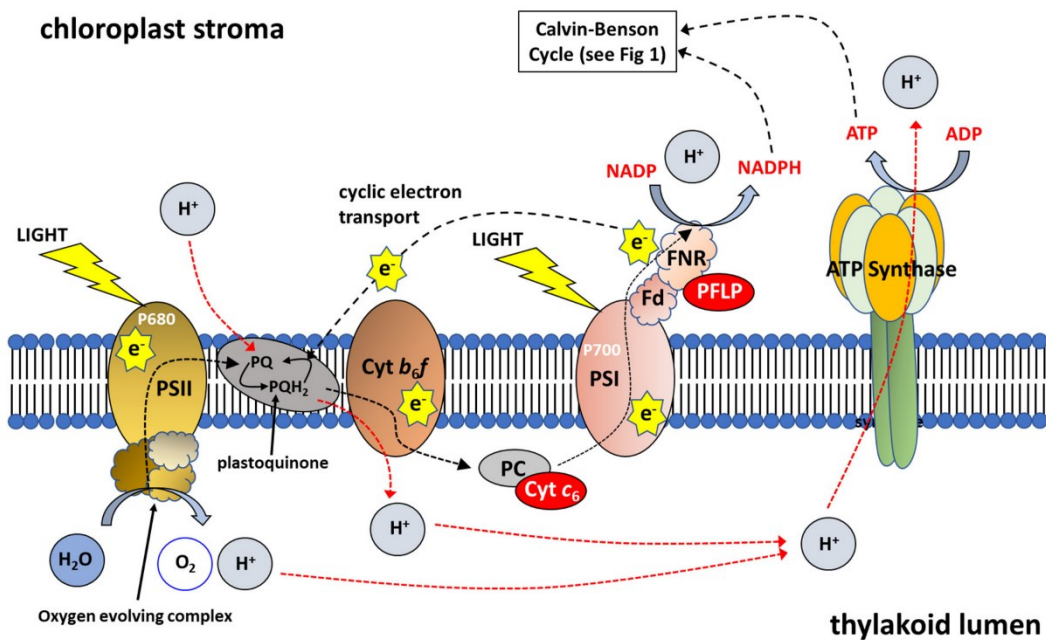


Figura 1.5 Schema dei complessi fotosintetici (Simkin, 2019).

### 1.3.2.1 Antenne per la cattura della luce

La funzione primaria dei complessi antenna è quella di raccogliere la luce e trasferire l'energia ai centri di reazione fotosintetici, processo che avviene in un tempo dell'ordine dei ps (Masojídek et al., 2013).

Le classi principali dei complessi antenna sono le ficobiliproteine idrofiliche, presenti esclusivamente nei cianobatteri e i complessi idrofobici LHC II e LHC I contenenti clorofilla *a*, *b* e carotenoidi, comuni a tutte le microalghe (Masojídek et al., 2013).

### **1.3.2.2 Fotosistema II**

Il fotosistema II è un complesso multimerico situato nella membrana tilacoidale composto da più di 20 subunità. È formato dal centro di reazione, dal centro di evoluzione dell'ossigeno e dalle antenne interne. Il centro di reazione, a sua volta, è formato dal donatore di elettroni primario (P680) e dai due accettori: i plastochinoni A e B (Jurić et al., 2013).

### **1.3.2.3 Plastochinoni, citocromo $b_6f$ e plastocianina**

Il trasporto degli elettroni tra PS II e PS I è legato al citocromo  $b_6f$  ed è assistito da due trasportatori mobili: i plastochinoni e la plastocianina. I primi sono dei benzochinoni lipofili con una catena isoprenoide che permettono il trasporto degli elettroni dal PS II al citocromo  $b_6f$  e, parallelamente, traslocano due protoni dallo stroma al lume (Masojídek et al., 2013).

La plastocianina, una proteina contenente rame situata nel lume, permette il trasferimento degli elettroni dal citocromo  $b_6f$  al PS I ( $\mu s$ ) (Masojídek et al., 2013).

Il citocromo  $b_6f$  permette il passaggio da una molecola che lega due elettroni (il plastoidrochinone) ad una che ne lega solo uno (la plastocianina). Questo trasporto è chimicamente complesso ed è possibile grazie alla presenza del cosiddetto “ciclo Q”. Il citocromo, infatti, cede un solo elettrone alla plastocianina, mentre il secondo è riciclato e torna al plastochinone (Bernát & Rögner, 2011).

Questo ciclo ha due funzioni principali: (1) come abbiamo appena detto è essenziale per convertire un processo che genera due elettroni, ovvero l'ossidazione del plastoidrochinone, in due riduzioni sequenziali della plastocianina, che può trasportare un solo elettrone; (2) è fondamentale anche per la creazione del gradiente protonico tra le membrane (Jurić et al., 2013).

Questi passaggi rappresentano lo step più lento nella cinetica di trasferimento degli elettroni. In particolare il “collo di bottiglia” è rappresentato dalla reazione di riossidazione dei plastochinoni che ossidandosi da plastoidrochinone a plastochinoni permettono il trasferimento degli elettroni al citocromo. Questo step, infatti, impiega un tempo stimato tra i 5 ms e i 10 ms, ovvero tempi di diversi ordini di grandezza superiori rispetto ai rimanenti step della catena di trasporto degli elettroni (Schulze et al., 2017; Zarmi et al., 2020).

#### **1.3.2.4 Fotosistema I**

Il fotosistema I è un complesso di membrana multi-subunità composto da circa 100 molecole di clorofilla e 10 proteine. Questo fotosistema è responsabile della reazione fotochimica che genera il potenziale ossidoriduttivo necessario per ridurre la ferridossina e, successivamente, per generare NADPH<sub>2</sub> (Masojídek et al., 2013).

#### **1.3.2.5 ATP sintasi**

L'ATP sintasi è un enzima transmembrana composto da due sottocomplessi multisubunità. Il complesso, alimentato dal gradiente di pH formatosi grazie al trasporto degli elettroni, catalizza la sintesi di ATP a partire da ADP e P<sub>i</sub> grazie al passaggio di 4 protoni attraverso i suoi sottocomplessi (Jurić et al., 2013)

### **1.3.3 Fase oscura**

In questa fase avviene la fissazione dell'anidride carbonica grazie all'NADPH<sub>2</sub> e all'ATP prodotti nella fase luminosa. Nello specifico, per fissare una molecola di CO<sub>2</sub> sono necessarie due molecole di NADPH<sub>2</sub> e tre molecole di ATP (Masojídek et al., 2013).

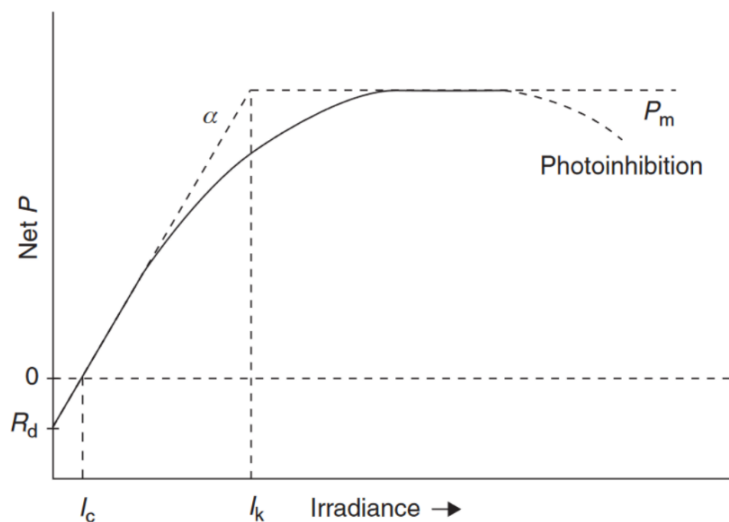
Questo processo avviene nel ciclo di Calvin – Benson che si compone di quattro fasi principali: (1) fase di carbossilazione, ad opera dell'enzima RuBisCO; (2) fase di riduzione; (3) fase di rigenerazione e (4) fase di produzione (Masojídek et al., 2013).

## **1.4 Illuminazione artificiale nelle colture microalgali**

Nella coltivazione di microalghe la luce rappresenta un parametro fondamentale per la crescita.

Nonostante la luce solare sia la fonte più conveniente di energia, questa non consente il raggiungimento di elevate produttività. L'illuminazione artificiale è ancora molto costosa e attualmente il suo utilizzo è possibile per la produzione di prodotti ad alto valore aggiunto (Schulze et al., 2014). L'utilizzo di luci artificiali, difatti, permette una fine regolazione del fotoperiodo, dell'intensità luminosa e dello spettro che si traduce in una maggiore quantità e qualità della biomassa (A. Carvalho et al., 2011).

Uno degli aspetti da considerare è la risposta delle microalghe alle varie intensità di luce, che viene ben esplicitata dalla *P/I curve* che analizza la risposta dell'apparato fotosintetico agli stimoli luminosi. Questa curva può essere divisa in tre parti principali: (1) una zona di luce limitante, in cui la fotosintesi aumenta con l'aumentare dell'irraggiamento; (2) una zona di saturazione, in cui la fotosintesi è indipendente dall'irraggiamento e (3) e una regione di fotoinibizione in cui la fotosintesi diminuisce con l'aumentare dell'irraggiamento (Figura 1.6) (Torzillo & Vonshak, 2013).



**Figura 1.6** Curva P/I in cui si distingue la zona di luce limitante, la zona di saturazione e la zona di fotoinibizione (Torzillo & Vonshak, 2013).

### 1.4.1 Acclimatazione alla luce in cianobatteri

Nella coltivazione di cianobatteri è importante tener conto del meccanismo di acclimatazione, messo in atto, ad esempio, per far fronte a nuove condizioni di luce. Nonostante il suo ruolo fondamentale nella fotosintesi, difatti, la luce può essere dannosa per gli organismi fotosintetici: quando l'energia luminosa assorbita supera quella consumata dai vari processi cellulari si ha la formazione di varie specie reattive dell'ossigeno (ROS) con conseguenti danni alle strutture cellulari. Se sottoposti a condizioni di alta luminosità, dunque, i cianobatteri hanno evoluto diverse strategie e risposte per equilibrare l'energia assorbita e quella consumata e per proteggere i fotosistemi dal fotodanno. Alcune di queste strategie sono, ad esempio, la down-regolazione dei fotosistemi e delle antenne come i ficobilisomi.

Di contro, c'è un'up-regolazione dei sistemi di fissazione della CO<sub>2</sub> e di altri pathway metabolici (Muramatsu & Hihara, 2011).

#### **1.4.2 Tecnologie di illuminazione: Light Emitting Diodes (LED)**

Con l'avanzare della ricerca nel campo della coltivazione delle microalghe si è anche sviluppata la necessità di utilizzare sistemi di illuminazione diversi dalla luce solare, come l'illuminazione artificiale. Questa, tradizionalmente, coinvolge lampade a fluorescenza, che hanno uno spettro di emissione molto ampio, in cui sono presenti anche lunghezze d'onda con un'attività fotosintetica bassa per la maggior parte delle microalghe (A. P. Carvalho et al., 2011).

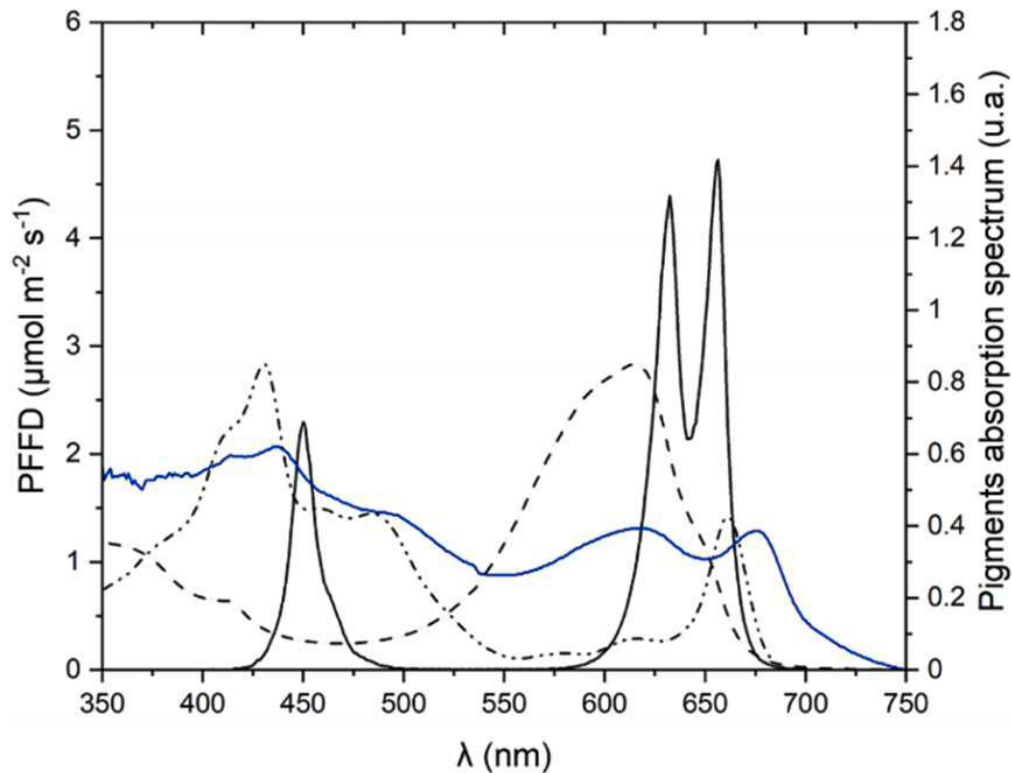
I *Light Emitting Diodes* (LED) si stanno affermando come una tecnologia efficacemente applicabile nel settore microalghe. Questa tipologia di lampade ha una lunga durata (50.000 h); esse sono prive di mercurio, hanno un tempo di risposta nell'ordine dei nanosecondi e, soprattutto, emettono luce sostanzialmente monocromatica a varie lunghezze d'onda (Olle et al., 2013).

Quest'ultima caratteristica è estremamente importante in quanto può essere utilizzata per studiare l'effetto sulla crescita microalgale di diverse lunghezze d'onda che rientrano nella PAR (Schulze et al., 2014).

Un aspetto di cui tener conto quando si utilizza illuminazione artificiale è l'efficienza di conversione energetica. In tutti i sistemi di illuminazione artificiale, difatti, avviene una perdita di energia causata dalla dissipazione termica. I LED ad alta efficienza minimizzano la perdita di energia, avendo un'efficienza fino all'80% (Borella et al., 2022).

### 1.4.3 Spettro ottimizzato

Come detto precedentemente, uno dei vantaggi dei LED è quello di poter adattare la luce emessa alle lunghezze d'onda maggiormente assorbite dall'apparato fotosintetico (Figura 1.7).



**Figura 1.7** Confronto tra emissione di una lampada LED con luce rossa e blu (linea nera continua) e spettro di assorbimento di clorofilla, carotenoidi (punto – linea) e ficocianina (linea tratteggiata) (Borella et al., 2021).

Confrontando lo spettro di emissione di un LED a luce rossa e blu e lo spettro di assorbimento dei pigmenti caratteristici di molte specie algali si può osservare come i picchi coincidano. Questo può essere sfruttato per ottimizzare lo spettro di emissione delle lampade utilizzate per la crescita delle microalghe in modo da utilizzare solo le lunghezze d'onda effettivamente assorbite dai microrganismi (Borella et al., 2021). La storia evolutiva delle microalghe ha contribuito a far sì che queste crescano meglio con luce blu (lunghezza d'onda di 420-470 nm) o rossa (lunghezza d'onda di 660 nm) (Keeling, 2013). Questa preferenza varia da specie a specie e riflette la presenza di determinati pigmenti all'interno delle *light-harvesting proteins* dei cloroplasti (Takaichi, 2011).



Le lunghezze d'onda assorbite dall'apparato fotosintetico hanno un diverso effetto sullo sviluppo cellulare. In particolare, lunghezze d'onda nel rosso permettono un alto tasso di crescita e lo sviluppo di cellule più piccole accelerando il ciclo cellulare (Schulze et al., 2014).

Le lunghezze d'onda nel blu, invece, influenzano l'espressione genica e diversi pathway metabolici. In diverse specie, inoltre, questa luce induce l'accumulo di pigmenti (Beel et al., 2012). Questo incremento può essere causato dalle caratteristiche della stessa luce blu: i fotoni a questa lunghezza d'onda, difatti, hanno un'energia più alta rispetto a quella necessaria alla fotosintesi (Kommareddy & Meeting, 2003) e questo può generare un *non-photochemical quenching* con la conseguente produzione di specie reattive dell'ossigeno (Fu et al., 2013). Di conseguenza, per proteggere l'apparato fotosintetico dallo stress ossidativo, gli organismi fotosintetici accumulano pigmenti fotoprotettivi (Schulze et al., 2014).

L'effetto della combinazione di luce rossa e blu sulla crescita di cianobatteri, ed in particolare di *A. maxima* è stato studiato da Park e Dinh (J. Park & Dinh, 2019) tramite l'utilizzo di colture batch e di una lampada LED con diverse percentuali delle due lunghezze d'onda. Questi autori hanno osservato che la crescita del cianobatterio risulta più alta con l'utilizzo di luce bianca e rossa, che stimola la crescita e la divisione cellulare, mentre la concentrazione di ficocianina aumenta con l'utilizzo di luce blu.

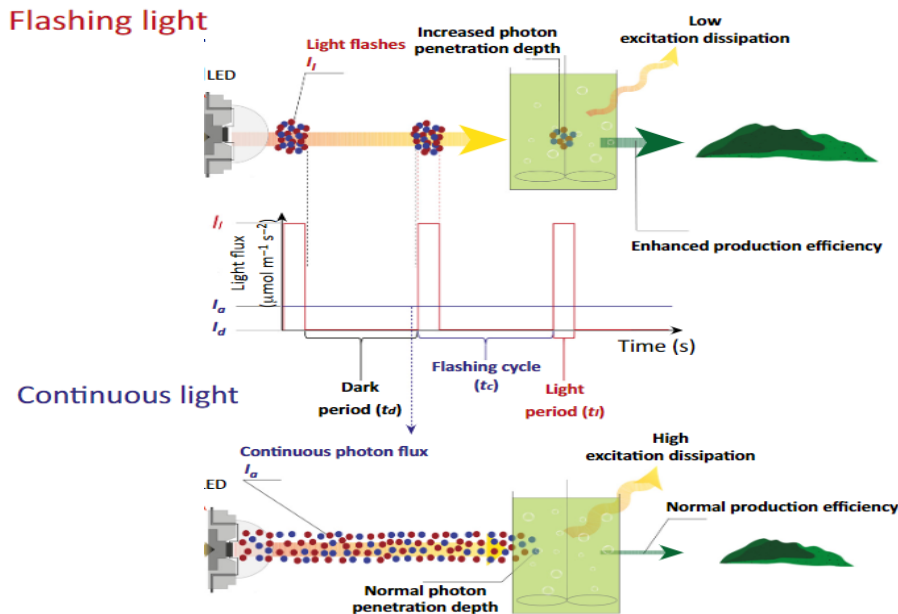
#### **1.4.4 Luce pulsata**

L'utilizzo di luci artificiali, pur risultando vantaggioso in termini di produzione, comporta un aumento nei costi di processo. Per questo è importante ottimizzare l'utilizzo della luce da parte della biomassa.

Una delle strategie è quella di ottimizzare l'erogazione della luce. A tal fine, diversi studi hanno proposto l'utilizzo di luce pulsata, ovvero luce intermittente che può fornire impulsi di luce ad alta intensità di breve durata (chiamata periodo di luce) alternandoli con periodi di buio (Schulze et al., 2017).

Essendo caratterizzata da alte intensità di luce, quando si lavora con luci pulsate è importante regolare finemente la ripetizione del ciclo luce-buio (ovvero la frequenza) e la corrispettiva proporzione del periodo di luce (ovvero il ciclo di lavoro). Grazie alle tecnologie di illuminazione di nuova generazione, queste

caratteristiche della luce pulsata possono anche essere proporzionali alla cinetica delle reazioni biologiche del processo fotosintetico (Figura 1.8) (Schulze et al., 2017).



**Figura 1.8** Confronto tra luce pulsata (caratterizzata da periodo di buio e di luce, permette una maggiore produttività) e luce continua (Schulze et al., 2017).

Diversi autori hanno osservato che la luce pulsata può portare a performance di crescita migliori a parità di energia luminosa fornita rispetto alla luce continua (Blanken et al., 2013), ma non è sempre chiaro quali siano i tempi di pulsazione e le intensità più appropriate da usare, ed in letteratura sono riportanti risultati discordanti (Borella et al., 2022; Schulze et al., 2020).

Il cosiddetto *flashing light effect* (Abu-Ghosh et al., 2016) si verifica, infatti, nel momento in cui l'apparato fotosintetico lavora vicino alla sua massima capacità.

A tal proposito, è stato osservato che con frequenze e cicli di lavoro troppo bassi (frequenze tra 1-10 Hz e cicli di lavoro maggiori di 0,5), questo fenomeno non si verifica e gli organismi fotosintetici estinguono l'energia in eccesso durante il periodo di luce. Questo si traduce in una minore crescita ed in perdita di biomassa (Abu-Ghosh et al., 2016).

Per provare a comprendere meglio questo fenomeno ci si può soffermare sul processo con il quale la luce fornisce energia all'apparato fotosintetico. Questo consiste nell'eccitazione delle molecole di clorofilla dal loro stato fondamentale ad uno stato eccitato di singoletto. L'energia di eccitazione è poi trasferita ai centri di

reazione causando una separazione di carica che permette il trasferimento di elettroni lungo la catena di trasporto (Varela et al., 2015).

In condizioni di alta intensità i centri di reazione si trovano sempre nello stato eccitato e vengono definiti “chiusi”. Nel momento in cui questo accade l’energia è dissipata sottoforma di calore o riemessa. Questi processi sono necessari per evitare la formazione di specie reattive dell’ossigeno (Varela et al., 2015).

Per evitare la formazione di queste specie e per resistere a periodi di buio prolungati gli organismi fotosintetici hanno sviluppato diversi metodi per immagazzinare energia: (1) meccanismi a breve termine come i pigmenti (con una scala temporale dell’ordine dei femto- o picosecondi) (Nelson & Junge, 2015); (2) meccanismi a medio termine (nell’ordine dei nano- o microsecondi) che consistono nelle componenti della catena di trasporto degli elettroni, come ad esempio i plastochinoni (Hüner et al., 2012); (3) meccanismi a lungo termine (nell’ordine dei millisecondi e dei secondi), ovvero equivalenti riducenti e ATP (Leakey et al., 2002).

Sulla base di questi meccanismi fisiologici, già Emerson e Arnold (Emerson & W Arnold, 1932) avevano dimostrato che un periodo di luce corto con un’adeguata intensità del flash può eccitare tutti i centri di reazione “aperti”, mentre un tempo di buio sufficientemente lungo permette agli stessi centri di reazioni di riaprirsi in modo che possano raccogliere la maggior parte dei fotoni proveniente dal successivo flash. Studi successivi (Radmer & B Kok, 1977) mostrano come l’apparato fotosintetico può usare solo una piccola porzione della luce ricevuta con luce continua.

Ricerche più recenti suggeriscono che la capacità di immagazzinamento dell’energia da parte dei plastochinoni svolge un ruolo fondamentale nella determinazione dei giusti parametri della luce pulsata per far sì che si verifichi il *flashing light effect* (Stitt & Zhu, 2014): Vejrazka et al. e Hüner et al. (Vejrazka et al., 2011) (Hüner et al., 2012) sostengono che se si genera un eccesso di plastoidrochinone (PQH<sub>2</sub>) ed il rapporto plastoidrochinone : plastochinone diviene troppo alto, si ha una over-riduzione del pool dei chinoni che non permette la riapertura del secondo centro di reazione. Questo sbilanciamento avviene se il flusso di energia da parte dei fotoni eccede l’utilizzo che l’organismo ne fa per i pathway metabolici che promuovono la crescita (Schulze et al., 2017).

Per evitare questo eccesso di plastoidrochinone, il tasso di riduzione dei plastochinoni dovrebbe essere simile al tasso di ossidazione del plastoidrochinone al citocromo b<sub>6</sub>f. Questo, tuttavia, è un obiettivo difficile da realizzare in quanto l'ossidazione del plastoidrochinone richiede tempi maggiori rispetto alla riduzione. Per questo la luce pulsata deve essere studiata *ad hoc* in modo da avere un periodo di luce brevissimo che permetta l'eccitazione del centro di reazione II senza innescare meccanismi di dissipazione dell'energia, e un periodo di buio più lungo, nell'ordine dei millisecondi, tale da permettere la riossidazione del plastoidrochinone (Schulze et al., 2017).

Sulla base delle considerazioni teoriche appena descritte, diversi studi sperimentali hanno condotto esperimenti utilizzando la luce pulsata, dimostrando che essa comporta un effettivo aumento delle performance di crescita microalgali: (1) Borella et al. (Borella et al., 2022) hanno coltivato *A. maxima* in continuo utilizzando LED pulsati rossi e blu ad alte frequenze (fino ad 1MHz). Regolando finemente il periodo di luce, l'intensità del *pulse* e il tempo di permanenza hanno ottenuto un aumento della crescita della biomassa rispetto ad un controllo effettuato utilizzando luce continua. Coltivando *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis chui* e *Koliella antartica* in batch con luce LED bianca una luce media di 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  è risultata ottimale (periodo di luce di 100  $\mu\text{s}$ ); in tali condizioni Lima et al. (Lima et al., 2021), hanno ottenuto quantità maggiori di proteine, di acidi grassi poli-insaturi (PUFA), clorofilla, violaxantina e  $\beta$ -carotene utilizzando luce pulsata a 5 Hz e a 50 Hz, in confronto ad un controllo in luce continua.

Tuttavia, i risultati in letteratura non sono tutti concordi tra loro. Schulze et al. (Schulze et al., 2020) hanno studiato il profilo di evoluzione dell'ossigeno in regime di luce pulsata (frequenze tra i 10 Hz e i 10000 Hz), coltivando diverse specie di microalghe in batch (*T. chui* e *C. stigmatophora*), a varie densità cellulari e adattate a più intensità luminose. I dati ottenuti non sono stati migliori di quelli in luce continua, anche utilizzando bassi cicli di lavoro e alte frequenze. Questo, probabilmente, è causato dal fatto che per le colture batch non è garantita un'acclimatazione uniforme alla luce, infatti l'intensità di luce percepita dai microrganismi varia al variare della loro concentrazione che, con questa modalità di coltivazione, non è costante.

#### **1.4.4.1 Effetto dello spessore**

Uno dei più importanti vantaggi dell'utilizzo della luce pulsata è la possibilità di mitigare l'attenuazione luminosa e permettere una maggiore penetrazione della luce all'interno di colture concentrate (Schulze et al., 2017), limitando il cosiddetto *self-shading*. La legge di Lambert-Beer (C. G. Lee, 1999) descrive la penetrazione luminosa come una funzione che cresce linearmente alla crescita esponenziale dell'intensità luminosa.

Le colture microalgali sono caratterizzate da un'attenuazione della luce esponenziale lungo lo spessore della coltura stessa (Kim et al., 2006). La luce che incide sulla superficie della coltura, infatti, viene quasi del tutto assorbita durante il percorso luminoso, formando un gradiente e, potenzialmente, una zona buia in cui la fotosintesi è limitata (Figura 1.9). La lunghezza di questa zona buia dipende da diversi fattori come la concentrazione della coltura, i pigmenti delle microalghe, il percorso e l'intensità della luce sulla superficie (Abu-Ghosh et al., 2016).

Di contro, le alghe situate vicino alla fonte luminosa potrebbero andare incontro a fotoinibizione (Schulze et al., 2017). Entrambi questi problemi sono mitigati da velocità di mixing elevate che, però, richiedono grandi quantitativi di energia (Takache et al., 2015) e possono compromettere la fisiologia e la vitalità cellulare (Brindley et al., 2016). Un'alternativa è proprio quella di utilizzare luci pulsate che, grazie alla loro alta intensità, riescono a penetrare efficientemente nello spessore della coltura e, allo stesso tempo, prevengono la fotoinibizione grazie ad un ciclo luce-buio appositamente settato.

Le luci pulsate, dunque, permetterebbero l'utilizzo di reattori più spessi, rendendo questi ultimi una valida alternativa a sistemi più estensivi, che occupano grandi spazi, come i *pond*.

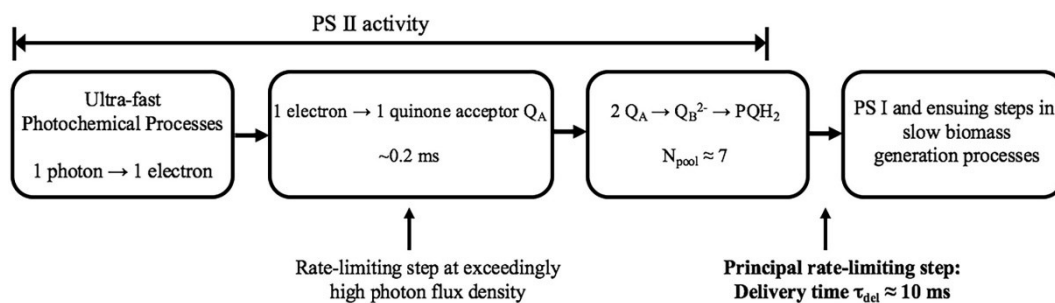
### **1.5 Modello di Zarmi: razionalizzazione del pulse basata sui centri di reazione**

L'avanzare della tecnologia e degli studi volti a migliorare la coltivazione di microalghe tramite l'utilizzo di luce pulsata ha permesso lo sviluppo di diversi modelli per l'ottimizzazione di questa tecnologia. Come descritto nel paragrafo 1.4 l'utilizzo ottimale di luce pulsata richiede una puntuale calibrazione dei parametri

come tempo di luce e di buio: Zarmi et al. (Zarmi et al., 2020) hanno proposto un modello per razionalizzare l'aumento dell'efficienza fotosintetica prendendo in considerazione la statistica di arrivo dei fotoni al fotosistema e le cinetiche caratteristiche.

Il modello tiene conto del numero di fotoni contenuti in un impulso di luce che incidono sull'apparato fotosintetico. L'area di assorbimento dei fotoni considerata è definita *cross section* ed ha un valore caratteristico che dipende dalla dimensione delle antenne, dalla specie microalgale e dall'acclimatazione alla luce. Quest'area può variare da mezzo nm<sup>2</sup> fino a diversi nm<sup>2</sup> (Zarmi et al., 2020).

Nel modello gli autori hanno anche considerato i tempi caratteristici del trasporto degli elettroni (Figura 1.9) e, tramite questi, sono riusciti a convogliare: (1) il potenziale della luce pulsata nell'evitare l'ostruzione del pathway fotosintetico; (2) lo stato del pool di chinoni e (3) la statistica di arrivo dei fotoni.



**Figura 1.9** Schema delle fasi del processo fotosintetico con relativi passaggi limitanti (Zarmi et al., 2020).

In questo modello è stato considerato un pool di chinoni pari a 7, numero medio rispetto ai 5-12 dimostrati in diversi studi (Cleland, 1998; Simionato et al., 2013; Zarmi et al., 2020). Questo numero è importante nel momento in cui si considera che oltre una determinata intensità di luce il pool di chinoni va incontro a saturazione, diminuendo l'efficienza fotosintetica.

Durante l'impulso, alcuni plastochinoni ridotti possono fornire cariche allo stadio successivo. Contemporaneamente, altri plastochinoni del pool si riducono perché il tasso di riossidazione è più lento di quello di riduzione. Se l'impulso di luce termina proprio quando l'intero *pool* di chinoni è stato ridotto, cioè prima che inizi l'ostruzione, e se il sistema ha a disposizione un tempo di buio sufficiente per

elaborare tutti i PQ ridotti durante l'impulso, allora tutti i fotoni assorbiti possono essere sfruttati e si può ottenere un'efficienza maggiore.

Le considerazioni sopracitate hanno permesso lo sviluppo di equazioni che descrivono la cinetica di riduzione e di ri-ossidazione del pool di chinoni.

Il primo dato utile per far ciò è il tasso di fotoni che colpisce il centro di reazione in un secondo ( $n_0$ ):

$$n_0 = (I * 10^{-6} * Av)(A * 10^{-18}) \quad (\text{Eq 1.1})$$

Dal quale è possibile ricavare il numero di plastochinoni ridotti in un pulse ( $N_g$ ):

$$N_g = n_0 T_{pulse} / 2 \quad (\text{Eq 1.2})$$

Con  $I$  che rappresenta l'intensità del *pulse*, espressa in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $Av$  è il numero di Avogadro ( $6.02 * 10^{23}$ ),  $A$  è l'area della *cross section* espressa in  $\text{nm}^2$  e  $T_{pulse}$  è il tempo di luce, espresso in ms.

Quando il tempo di luce è più alto rispetto al tempo di riduzione di un plastochinone, il numero di plastochinoni ridotti in un pulse ( $n_0^{\text{re-oxidized}}$ ) può essere calcolato come:

$$n_0^{\text{re-oxidized}} = T_{pulse} / \tau_{del} \quad (\text{Eq 1.3})$$

Dove  $\tau_{del}$  è il tempo di ri-ossidazione del pool di chinoni, espresso in ms.

A questo punto è possibile calcolare il numero di plastochinoni ridotti durante un pulse e che non si ri-ossidano prima del *pulse* successivo:

$$n_{additional} = N_g - n_0^{\text{re-oxidized}} = \left( \frac{n_0}{2} - \frac{1}{\tau_{del}} \right) T_{pulse} \quad (\text{Eq 1.4})$$

Questo valore, ovviamente, non deve mai essere superiore alla dimensione del pool di chinoni, ovvero 7.

Queste equazioni ci permettono, dunque, di stimare il  $T_{pulse}$  ideale per permettere la riduzione esatta del pool di chinoni, senza causare la saturazione dello stesso.

## 1.6 Scopo della tesi

La coltivazione di microalghe in sistemi chiusi illuminati artificialmente, come i fotobioreattori, comporta elevati costi di produzione, legati principalmente al costo dell'illuminazione. Questi possono essere attualmente giustificati per la produzione di composti ad alto valore aggiunto.

È quindi necessario sviluppare metodi di coltivazione che riescano ad aumentare la resa e la produttività delle microalghe, in modo da poterle utilizzare in maniera più trasversale, sfruttando le loro potenzialità in diversi settori industriali. L'utilizzo di luci LED pulsate ha come obiettivo, difatti, proprio l'aumento della capacità produttiva, fornendo un regime di luce tale da rispettare i tempi caratteristici della fotosintesi, oltre a permettere una penetrazione migliore della luce all'interno dei fotobioreattori, consentendo la coltivazione in volumi maggiori.

Lo scopo del seguente elaborato è quello di massimizzare la crescita del cianobatterio filamentoso *A. maxima* utilizzando luci LED pulsate a spettro ottimizzato, in fotobioreattori in continuo, andando a verificare l'effetto del tempo tra un *pulse* di luce ed un altro, ovvero del tempo di buio, e l'effetto dello spessore del fotobioreattore.

Questi due parametri, difatti, sono di fondamentale importanza per l'ottimizzazione delle condizioni operative. Il primo deve essere calibrato al meglio in modo da non saturare i fotosistemi; il secondo è responsabile dell'attenuazione della luce e influenza, quindi, la crescita dei microrganismi.



## CAPITOLO 2 – Materiali e metodi

### 2.1 Specie e condizioni di crescita

Il microrganismo utilizzato per la parte sperimentale è il cianobatterio filamentoso *Arthrospira maxima* SAG 49.88, coltivato in fotobioreattori in continuo utilizzando terreno Zarrouk (Ravelonandro et al., 2011), secondo la composizione mostrata in Tabella 2.1.

Il terreno utilizzato è stato autoclavato a 121° C per 20 minuti, in modo da garantirne la sterilità ed evitare contaminazioni.

Componente	Concentrazione (mg L <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> Mg EDTA	2
Citrato Ferrico di ammonio	12
Acido citrico	12
MgSO <sub>4</sub>	150
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	61
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	5,72
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3,62
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,444
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,158
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,1
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,782
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	20
NaNO <sub>3</sub>	3000
NaCl	10000
NaHCO <sub>3</sub>	30000

**Tabella 2.1** Composizione del *medium* Zarrouk utilizzato negli esperimenti.

I fotobioreattori sono stati mantenuti in un incubatore termostato ad una temperatura costante di 30° C. Il pH del medium è stato mantenuto a valori ottimali compresi tra 9 e 11 grazie ad un costante flusso di aria mista a CO<sub>2</sub> (5% v/v) e all'effetto tamponante del bicarbonato di sodio, che si trova ad elevate concentrazioni nel mezzo utilizzato. Questi valori sono stati monitorati tramite l'utilizzo di un pH-metro (Hanna HI 9124).

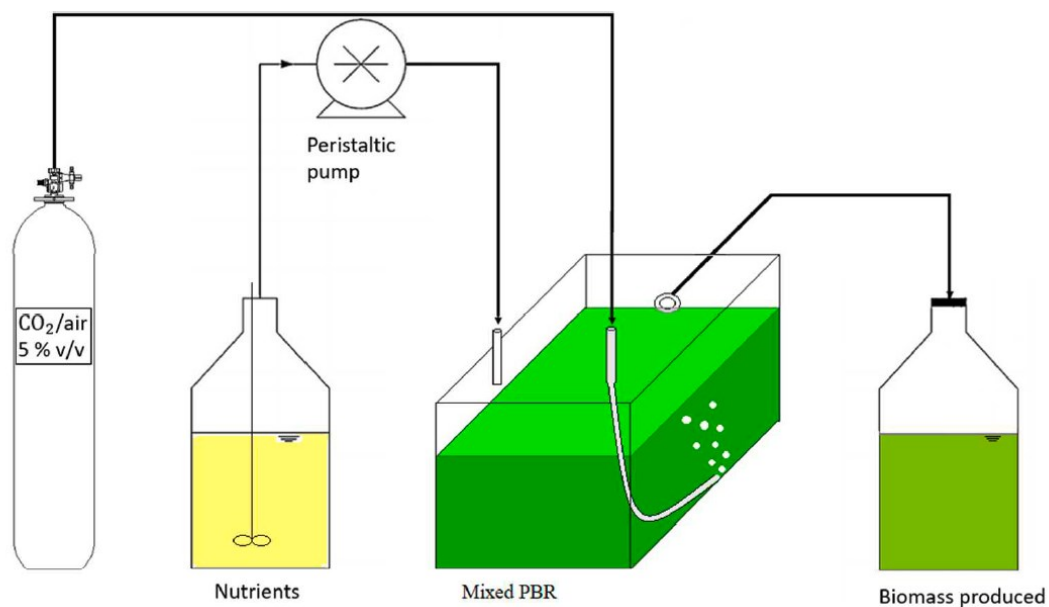
Il mixing della biomassa è stato garantito tramite l'utilizzo di un agitatore magnetico e il costante gorgogliamento della miscela aria-CO<sub>2</sub>.

## 2.2 Coltivazione in fotobioreattori

Tutte le condizioni sperimentali sono state effettuate a partire da un pre-inoculo in cui il cianobatterio ha avuto la possibilità di acclimatarsi alle varie condizioni di crescita.

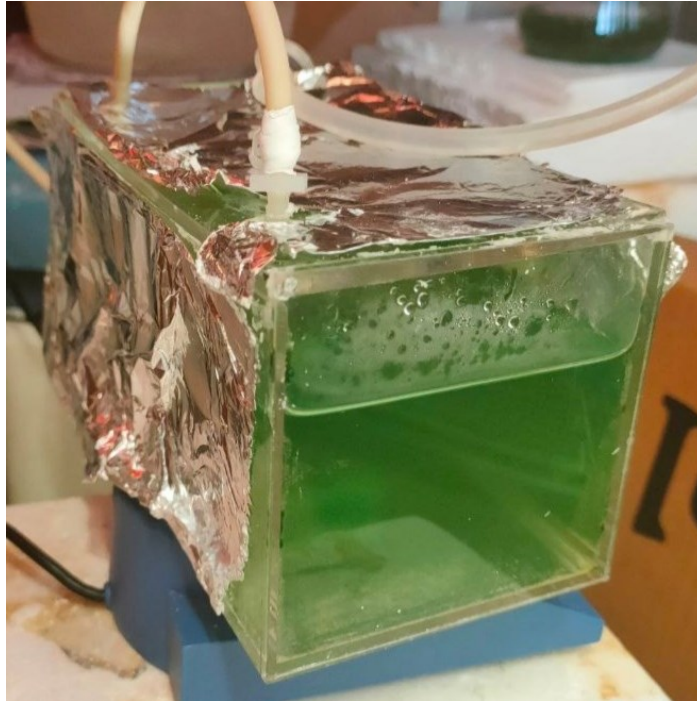
Spirulina è stata coltivata in modalità continua in diversi fotobioreattori equiparabili ai *flat panel* ed illuminati da LED rossi e blu, in regime di luce pulsata.

L'apparato sperimentale è rappresentato in figura (Figura 2.1). Si possono osservare la pompa peristaltica per l'alimentazione dei nutrienti, la bottiglia con il terreno di crescita, il fotobioreattore, la lampada e il recipiente per la raccolta della biomassa in uscita.



**Figura 2.1** Schema dell'apparato sperimentale (Diotto, 2021).

Gli esperimenti sono stati condotti in fotobioreattori di policarbonato ed il set-up sperimentale è stato studiato in modo che potessero essere equiparabili a dei *continuous stirred tank reactors* (CSTR). Si sono utilizzati reattori di tre spessori diversi: 15 cm (Figura 2.2), 8 cm e 3,5 cm, con volume rispettivamente di 500 mL, 285 mL e 100 mL.



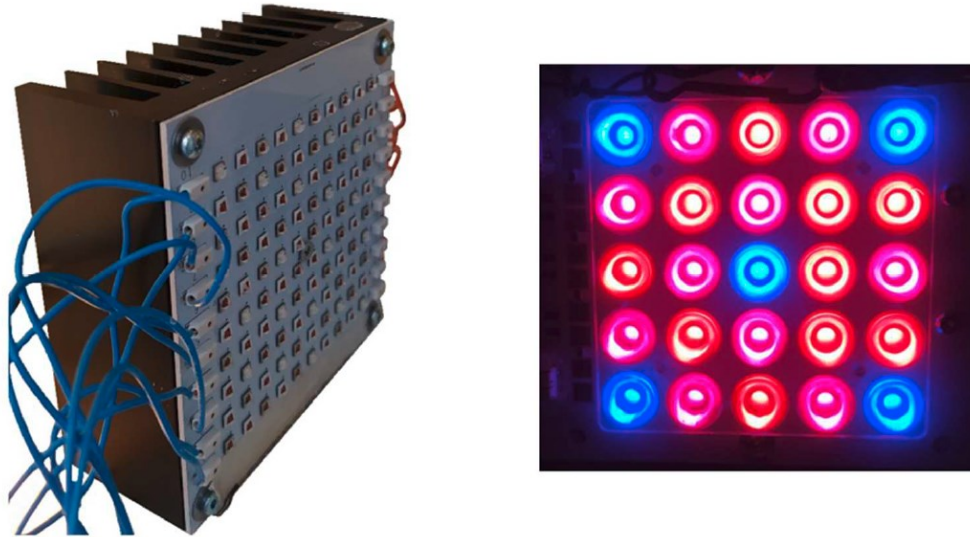
**Figura 2.2** Reattore in policarbonato di spessore 15 cm.

La coltivazione è stata effettuata con un tempo di permanenza di 2,8 giorni. Questo è stato ottenuto grazie ad un costante rifornimento di terreno per mezzo di una pompa peristaltica, utilizzando tubi in marpene o in silicone a diametro noto, e per mezzo di un tubo di troppo pieno in uscita dal reattore stesso. L'*inlet* di terreno ed il tubo di uscita sono posti agli estremi opposti del bioreattore, di modo che il *medium* non fuoriesca subito dal sistema.

I lati del fotobioreattore sono stati rivestiti con stagnola in modo da evitare la penetrazione di luce ambientale e di permettere un migliore profilo di distribuzione della luce nel reattore.

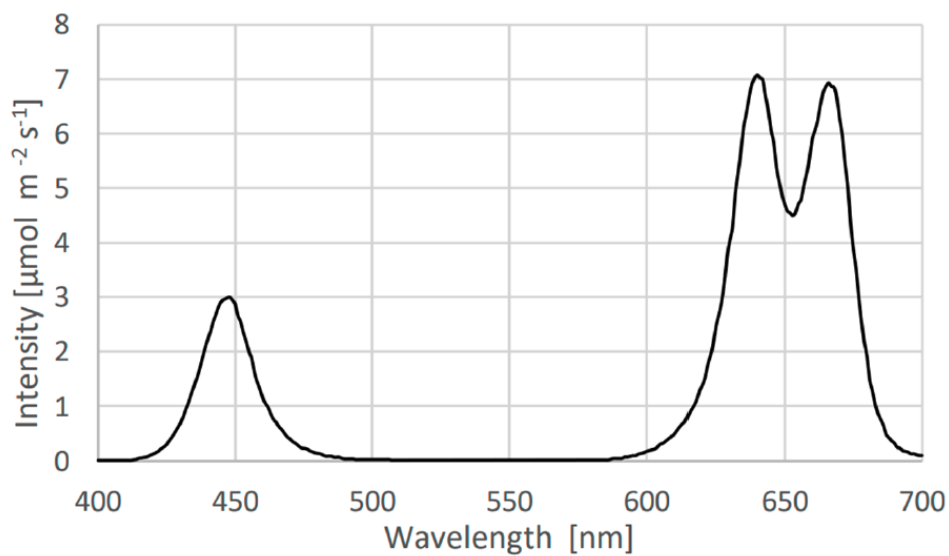
### **2.2.2 Sistema di illuminazione**

La fonte di illuminazione utilizzata consiste di due illuminatori LED rossi/blu, uno composto da 10 singoli LED ed uno da 25, collegati tra loro in serie (Figura 2.3).



**Figura 2.3** Lampada da 25 (a sinistra) e 10 (a destra) LED (Diotto, 2021).

Lo spettro di emissione è composto dall'80% di lunghezze d'onda a 660 nm e dal 20% di luce a 430 nm (Figura 2.4), con una superficie di irraggiamento pari a 75 mm x 75 mm. Le lampade sono sperimentali e sono state costruite appositamente, come riportato nello studio di Borella et al. (Borella et al., 2021).



**Figura 2.4** Spettro di emissione delle lampade LED rosse/blu (Diotto, 2021).

Per ottenere diverse intensità del *pulse* di luce è stata regolata la distanza tra le lampade e la superficie frontale del reattore e il valore è stato misurato tramite uno spettrometro (STS – VIS Spectrometers di Ocean Insight).

## 2.3 Condizioni operative

La luce pulsata con la quale sono stati condotti gli esperimenti è caratterizzata da diversi parametri, alcuni di questi, come l'intensità del *pulse* di luce ( $I_{pulse}$ ), il tempo di buio ( $t_b$ ) e il tempo di luce ( $t_l$ ), sono stati variati in modo da valutarne l'effetto sulle performance di crescita. I restanti parametri, ovvero ciclo di lavoro ( $\emptyset$ ), periodo o tempo di ciclo ( $t_c$ ), frequenza ( $f$ ) e luce integrale ( $I_{int}$ ) possono essere ricavati a partire dai precedenti, attraverso le seguenti equazioni:

$$t_c = t_l + t_b \quad (\text{Eq 2.1})$$

$$\emptyset = \frac{t_l}{t_c} \quad (\text{Eq 2.2})$$

$$f = \frac{1}{t_c} \quad (\text{Eq 2.3})$$

$$I_{int} = I_{pulse} \emptyset \quad (\text{Eq 2.4})$$

### 2.3.1 Studio dell'effetto del tempo di buio e dell'intensità del *pulse*

Questo set di esperimenti è stato condotto con il fotobioreattore spesso 15 cm, mantenendo costante il tempo di permanenza (settato a 2,8 giorni). Si sono dunque indagati gli effetti che la variazione del tempo di buio, ha sulla biomassa. Lo studio è stato condotto per diverse intensità del *pulse* di luce. Il tempo di luce è stato mantenuto costante a 100  $\mu\text{s}$ , in quanto studi precedenti condotti nel laboratorio avevano dimostrato che questo fosse in grado di innescare il *flashing light effect* (Borella et al., 2022).

Le condizioni operative sono riassunte nella Tabella 2.2.

$I_{\text{pulse}} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$	f (Hz)	$I_{\text{int}} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$	$t_{\text{b}} (\text{ms})$	$t_{\text{c}} (\text{ms})$
17850	250	444	3,9	4
	196	350	5	5,1
	168	300	5,85	5,95
	99	177	10	10,1
8925	250	222	3,9	4
	168	150	5,85	5,95
35700	370	1322	2,6	2,7
	168	600	5,85	5,95
	37	132	26,9	27

**Tabella 2.2** Condizioni sperimentali a tempo di permanenza e spessore costante.

### 2.3.2 Studio dell'effetto dello spessore

Per comprendere meglio l'effetto dello spessore del PBR quando si utilizzano luci pulsate, sono stati condotti una serie di esperimenti variando lo spessore del fotobioreattore e monitorando le performance di crescita. Nello specifico si sono testati tre spessori: 3,5 cm, 8 cm e 15 cm. Le restanti variabili (intensità del *pulse*, tempo di luce e di buio) sono state mantenute costanti (Tabella 2.3).

Spessore (cm)	$\tau$ (d)	$I_{pulse}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$f$ (Hz)	$I_{int}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$t_i$ ( $\mu\text{s}$ )	$t_b$ (ms)
3,5	2,8	8925	168	150	100	5,85
	3,3					
	4					
8	2,8					
15						

**Tabella 2.3** Condizioni sperimentali con variazione dello spessore.

## 2.4 Metodi analitici

In tutte le condizioni sperimentali i reattori sono stati inoculati con un pre-inoculo già acclimatato alla luce pulsata con spettro ottimizzato di *A. maxima* e si è monitorata la concentrazione di biomassa fino al raggiungimento dello stato stazionario prima di effettuare i prelievi. In questa fase, sono stati raccolti almeno quattro punti sperimentali, facendo trascorrere tra uno e l'altro abbastanza tempo (in base al tempo di permanenza) in modo che potesse avvenire il rinnovo della biomassa nel PBR.

In stato stazionario è stata misurata l'assorbanza del campione e il peso secco, in modo da valutarne la concentrazione. Inoltre sono stati monitorati il contenuto di clorofilla, carotenoidi e ficobiline per studiare l'effetto delle varie condizioni sulla loro concentrazione.

### 2.4.1 Densità ottica (OD)

La densità ottica (OD) è stata misurata al fine di monitorare il raggiungimento dello stato stazionario, utilizzando uno spettrofotometro a doppio raggio (Shimadzu UV-1900), settando la lunghezza d'onda incidente a 750 nm, in modo da evitare interferenze nella misura da parte dei pigmenti. Il campione microalgale e il bianco (composto da terreno Zarrouk) sono stati inseriti in delle cuvette di plastica con cammino ottico ( $l$ ) di 1 cm.

Le misure sono state effettuate in doppio ed il valore ottenuto può essere messo in relazione alla concentrazione cellulare attraverso l'equazione di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon Cl \quad (\text{Eq 2.5})$$

Dove  $A$  rappresenta l'assorbanza del campione,  $\varepsilon$  il coefficiente di estinzione molare,  $C$  la concentrazione del campione e  $l$  il cammino ottico.

### 2.4.2 Peso secco

Per monitorare la concentrazione della biomassa si è misurato il peso secco di quest'ultima attraverso il protocollo seguente:

un filtro di cellulosa con pori di  $0,45 \mu\text{m}$  è stato seccato per 10 minuti a  $110^\circ \text{C}$ . Questo è stato poi pesato tramite una bilancia di precisione (Atilon Acculab Sartorius Group®) in modo da ottenere il valore di tara. Il filtro è stato quindi utilizzato per filtrare biomassa da un campione di 10 mL tramite l'utilizzo di una fiasca collegata ad una pompa a vuoto ed è stato poi fatto seccare nuovamente per due ore a  $110^\circ \text{C}$ , prima di essere pesato.

Essendo Zarrouk un terreno caratterizzato da alte concentrazioni di sale il campione filtrato è stato diluito con diluizione 1/3 con acqua deionizzata, in modo da evitare la contaminazione del campione da parte di sali non, falsando così i risultati.

La concentrazione della biomassa all'interno del reattore è stata ricavata attraverso la seguente equazione:

$$DW (g L^{-1}) = \frac{\text{peso lordo} - \text{peso tara}}{V_{\text{campione}}} \quad (\text{Eq 2.6})$$

### 2.4.3 Clorofilla e carotenoidi

L'estrazione di clorofilla e carotenoidi è stata effettuata tramite l'utilizzo di l'-N-N dimetil-formammide (DMF), seguendo il protocollo messo a punto da Moran et al. (Moran & Porath, 1980). Questo solvente permette la degradazione delle pareti e delle membrane cellulari e l'estrazione della clorofilla e dei carotenoidi. Nello specifico il protocollo prevede il prelievo di 1 mL di campione da inserire in una eppendorf da 1,5 mL. Il campione viene centrifugato in una centrifuga da banco per 10 minuti a 13500 RPM. A questo punto viene rimosso il surnatante e viene aggiunto 1 mL di DMF al pellet, sotto cappa chimica. La clorofilla e i carotenoidi sono pigmenti fotosensibili dunque, una volta aggiunto il reagente, l'eppendorf viene avvolta da carta stagnola per impedire la penetrazione della luce. Il campione



viene quindi riposto in freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  *overnight*. L'estrazione viene sempre effettuata in duplicato.

Per l'analisi dei pigmenti estratti questi vengono scongelati e centrifugati per 10 minuti a 13500 RPM, in modo che vengano sospesi nel surnatante. Quest'ultimo viene posto in una cuvetta di quarzo per la misura spettrofotometrica. Nello specifico, utilizzando il DMF come bianco, viene misurato lo spettro di assorbimento del campione nel range di lunghezze d'onda 350 nm – 750 nm.

Per la quantificazione si utilizzano le correlazioni proposte da Wellburn, 1994:

$$Chl_a(\mu\text{g mL}^{-1}) = (Abs_{664} - Abs_{750}) d \varepsilon_{Chla} \frac{V_{DMF}}{V_s} \quad (\text{Eq 2.7})$$

$$Car(\mu\text{g mL}^{-1}) = [(Abs_{461} - Abs_{750}) - (Abs_{664} - Abs_{750})] 0.04 \varepsilon_{Car} \frac{V_{DMF}}{V_s}$$

(Eq 2.8)

Dove  $d$  rappresenta l'eventuale fattore di diluizione e  $\varepsilon_{Chla}$  e  $\varepsilon_{Car}$  rappresentano i coefficienti di assorbimento di clorofilla a (11.92) e di carotenoidi (4).

## 2.5 Bilanci di materia ed energia

### 2.5.1 Produttività volumetrica ed areale

Per ogni condizione sperimentale è stata calcolata la produttività volumetrica, ovvero la concentrazione di biomassa prodotta nell'unità di tempo per unità di volume. In un CSTR la produttività volumetrica si può calcolare sfruttando l'equazione seguente:

$$P_{x,v}(g L^{-1}d^{-1}) = \frac{C_x}{\tau} \quad (\text{Eq 2.9})$$

Con  $C_x$  che corrisponde alla concentrazione di biomassa allo stato stazionario e  $\tau$  che rappresenta il tempo di permanenza in giorni.

Una variabile legata alla produttività volumetrica ma più sfruttata in letteratura in quanto tiene conto del cammino ottico della luce nel fotobioreattore ( $W$ ), è la produttività areale, che è stata calcolata tramite la seguente equazione:

$$P_{x,A}(g\ m^{-2}d^{-1}) = P_{x,V}W \quad (\text{Eq 2.10})$$

## 2.5.2 Efficienza fotosintetica

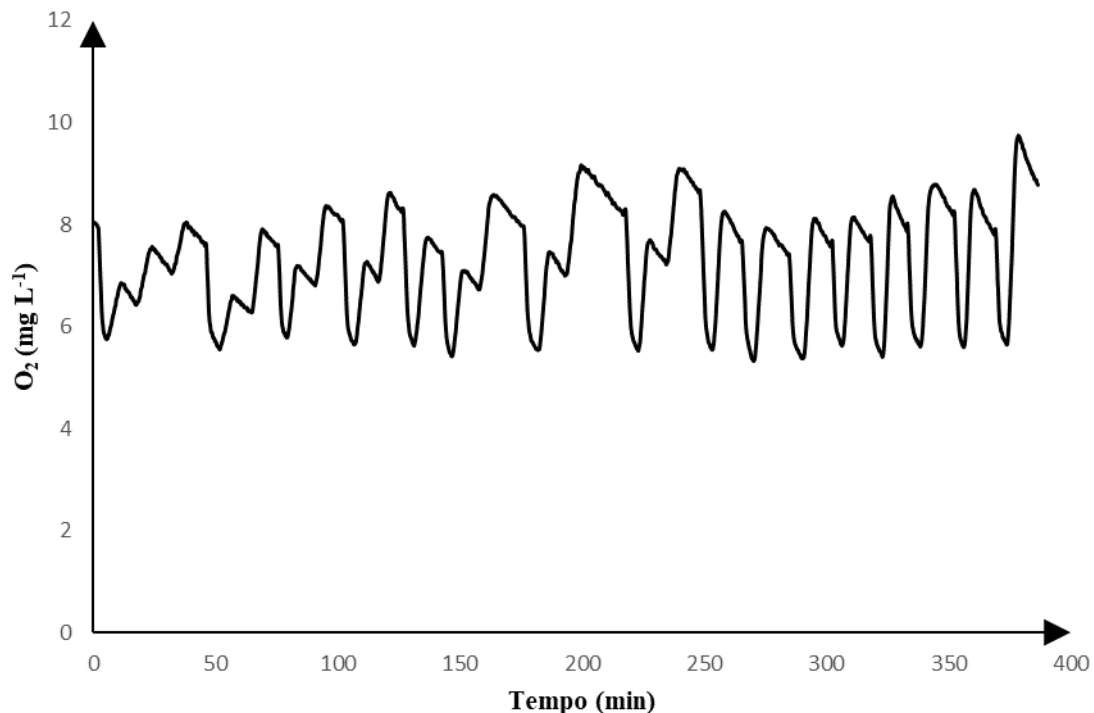
L'efficienza fotosintetica è una variabile che permette il calcolo dell'efficienza di conversione dell'energia luminosa in biomassa. Essa tiene conto della concentrazione di biomassa ( $C_x$ ), del *Lower Heating Value* ( $LHV$ ), specifico della specie microalgale e ricavato da letteratura (Zaimes & Khanna, 2013), della portata volumetrica in ingresso ( $Q_e$ ), dell'intensità di luce incidente sul reattore, ovvero la *Photon Flux Density* ( $PFD$ ), dell'energia media del fotone ( $E_p$ ) e della superficie illuminata del fotobioreattore ( $A_{PBR}$ ). L'equazione è riportata di seguito:

$$\eta_{PAR} (\%) = \frac{C_x LHV Q_e}{PF D E_p A_{PBR}} 100 \quad (\text{Eq 2.11})$$

## 2.6 Protocollo respirometrico in luce pulsata

La respirometria è una tecnica che consiste nel misurare il profilo di evoluzione dell'ossigeno in varie condizioni. Il test è effettuato inserendo il campione microalgale da testare (ad una concentrazione compresa tra gli 0.2 g L<sup>-1</sup> e gli 0.4 g L<sup>-1</sup>) in una *flask* di spessore 4 cm. Questa è inserita in un bagnetto termico in modo che la temperatura sia mantenuta costante a 30° C (la stessa utilizzata negli esperimenti di crescita) e al suo interno viene inserito un magnete che, grazie ad un agitatore magnetico, garantisce il continuo mescolamento del campione. La *flask* è quindi posta in una camera buia con all'interno una luce controllata da remoto, in modo da poter effettuare dei cicli di luce e di buio alternati, di almeno 10 minuti ciascuno, per valutare la produzione di ossigeno (alla luce, grazie al processo fotosintetico) e il suo consumo (al buio, dovuto al processo di respirazione). La concentrazione di ossigeno disciolto nel mezzo è misurata ogni 15 secondi tramite un ossimetro (Delta OHM HD 2109.1) e monitorata tramite il software DeltaLog9. Nel momento in cui la concentrazione di ossigeno si avvicina a saturazione, si procede ad insufflare azoto (N<sub>2</sub>) in modo di permettere lo *stripping* di ossigeno dalla *flask*. Per ogni condizione testata si osserva l'evoluzione di ossigeno nel tempo per almeno quattro repliche, ottenendo un profilo simile a quello riportato in figura (Figura 2.5). Il coefficiente angolare delle curve ottenute rappresenta la velocità di

produzione e di consumo di ossigeno e permette di ottenere l'*Oxygen Production Rate* (OPR) e l'*Oxygen Consumption Rate* (OCR). Questi valori possono essere rapportati alla velocità di crescita della biomassa tramite un termine di resa  $Y_{x/O_2}$ .



**Figura 2.5** Profilo tipico della concentrazione di ossigeno in un protocollo respirometrico.

La velocità di crescita ( $r_x$ ) in funzione della luce, che in regime di autotrofia può essere considerata un macronutriente, in assenza di inibizione è descritta dalla cinetica di Monod:

$$r_x = K_{max} \frac{C_i}{K_m + C_i} \quad (\text{Eq 2.12})$$

Dove  $K_{max}$  è la velocità massima di crescita,  $K_m$  è la *half-saturation constant*, ovvero la concentrazione di nutriente al quale la velocità di crescita è pari a metà del massimo e  $C_i$  è la concentrazione del macronutriente.

Nel momento in cui il substrato è inibente, la velocità di crescita può essere descritta dalla cinetica di Haldane:

$$r_x = \mu_{max} \frac{C_i}{C_i + K_i \left( \frac{C_i}{C_{i\ opt}} - 1 \right)^2} \quad (\text{Eq 2.13})$$

Dove  $\mu_{max}$  rappresenta la massima velocità di crescita,  $K_i$  rappresenta la costante di inibizione e  $C_{i\ opt}$  rappresenta la concentrazione di macronutriente ottimale

Tipicamente, i dati ottenuti dalla respirometria vengono rapportati alla concentrazione di biomassa utilizzata nel test (OPR/Cx ed OCR/Cx).

Per lo studio dei tempi di buio in luce pulsata, i dati sono stati normalizzati anche sulla luce media integrale, che varia al variare del tempo di buio e questi sono stati *fittati* con la cinetica di Monod, descritta dalla seguente equazione:

$$\frac{OPR}{C_x} (d^{-1}) = K_{max} \frac{t_b}{K_m + t_b} \quad (\text{Eq 2.14})$$

Per gli studi effettuati variando il tempo di luce, invece, si è utilizzata la cinetica di Haldane, che può essere così descritta:

$$\frac{OPR}{C_x} (d^{-1}) = \mu_{max} \frac{t_l}{t_l + k_i \left( \frac{t_l}{t_{l\ opt}} - 1 \right)^2} \quad (\text{Eq 2.15})$$

In questo lavoro di tesi, è stato messo a punto un protocollo respirometrico *ad hoc* per le luci pulsate. In particolare si è studiato il profilo di evoluzione dell'ossigeno in regime di luce pulsata andando a variare il tempo di buio (ms) o il tempo di luce ( $\mu$ s) a diverse intensità di *pulse*. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati con biomassa prelevata a stato stazionario e, quindi, acclimatata al *pulse* testato.

Le condizioni sperimentali sono riportate nelle tabelle sottostanti (Tabella 2.4, 2.5).

$I_{\text{pulse}} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$	$t_i (\mu\text{s})$	$t_b (\text{ms})$
8925	100	1
		2
		3
		3,9
		5
		10
17850	100	1
		2,58
		3
		3,91
		5,85
		7,78
		10,35
		15
35700	100	30
		1
		2
		3
		3,9
		5
		10
		30

**Tabella 2.4** Condizioni sperimentali del protocollo respirometrico per le luci pulsate con variazione del tempo di buio.

$I_{\text{pulse}} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$	$t_i (\mu\text{s})$	$t_b (\text{ms})$
17850	10	5,85
	50	
	100	
	200	
	1000	
35700	50	5,85
	100	

**Tabella 2.5** Condizioni sperimentali del protocollo respirometrico per le luci pulsate con variazione del tempo di luce.

In entrambi i casi i parametri cinetici sono stati calcolati attraverso la funzione “solver” di Excel, con il metodo dei minimi quadrati.

## 2.7 Modello di Zarmi

Sulla base del modello descritto da Zarmi e colleghi (Zarmi et al., 2020), descritto nel capitolo 1, sono stati effettuati diversi esperimenti di convalida, calcolando tempi di luce e di buio sulla base delle equazioni formulate nel modello.

Gli esperimenti sono stati effettuati nel reattore da 15 cm, mantenendo il tempo di permanenza costante a 2.8 giorni.

Le condizioni sperimentali sono riportate in tabella (Tabella 2.6).

$I_{\text{pulse}} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$	$f$ (Hz)	$I_{\text{int}} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$	$t_b$ (ms)	$t_l$ ( $\mu\text{s}$ )	$t_c$ (ms)
17850	168	300	26,8	200	27
8925	244	218	3,9	200	4,1
35700	171	61	5,85	10	2,7
	37	133	26,9	100	5,95

**Tabella 2.6** Condizioni sperimentali calcolate tramite le equazioni proposte dal modello di Zarmi.

## 2.8 Analisi statistica

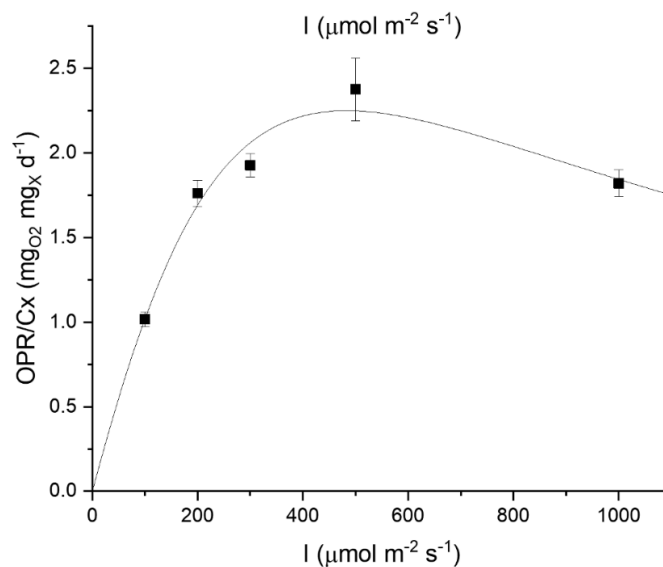
I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica tramite test Anova – one way per i dati parametrici, e tramite test Kruskal-Wallis per i dati non parametrici. In entrambi i casi si è mantenuto un livello di confidenza del 95%, in modo da valutare la veridicità delle eventuali differenze ottenute. Nello specifico l'analisi è stata svolta sulla produttività volumetrica e sulla concentrazione di pigmenti fotosintetici tra i dati raccolti alla stessa intensità di pulse.

Per la rappresentazione grafica si è effettuato il *grouping* tramite test di Tukey con un livello di confidenza del 95%.

## CAPITOLO 3 – Messa a punto dei protocolli respirometrici

### 3.1 Dati preliminari di protocolli respirometrici con *A. maxima* in luce continua

Come descritto nel paragrafo 2.6, la respirometria è una tecnica che permette di studiare la risposta di un microrganismo, nello specifico di una microalga, al variare di alcune condizioni sperimentali, es. l'intensità di luce. Per quanto riguarda *A. maxima* coltivata in continuo con luci colorate LED, con spettro ottimizzato R/B, Borella et al. (Borella et al., 2021) hanno applicato questa tecnica con lo scopo di studiare l'effetto di diverse intensità di luce continua sulla crescita del microrganismo (Figura 3.1). Gli autori hanno anche utilizzato il protocollo respirometrico per indagare varie condizioni di luce, in modo da ricavarne i parametri cinetici, tramite la cinetica di Haldane. Da questi studi è emerso che intensità più alte di  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sono inibenti per la produzione di ossigeno. I parametri cinetici ottenuti dalla respirometria, inoltre, hanno permesso lo sviluppo di un modello matematico capace di riprodurre i dati sperimentali e che, in studi successivi, è stato sfruttato per analizzare l'effetto dell'intensità del *pulse* e del tempo di permanenza sulla crescita di *A. maxima* utilizzando luce pulsata.



**Figura 3.1** Profilo di evoluzione dell'ossigeno a diverse intensità luminose.

Il protocollo è stato effettuato sia utilizzando una coltura pre-acclimatata alla luce R/B, che ha generato il profilo di evoluzione dell'ossigeno sopra riportato, sia utilizzando una coltura non acclimatata. Tuttavia, analizzando quest'ultima si è notato come l'inibizione avvenisse a intensità di luce molto più basse, confermando l'importanza del processo di acclimatazione per la coltivazione delle microalghe.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto un protocollo respirometrico in luce pulsata che fosse più riproducibile, ovvero con un inoculo acclimatato, in modo da analizzare nello specifico l'effetto del tempo di buio sulla risposta di *A. maxima* in luce pulsata.

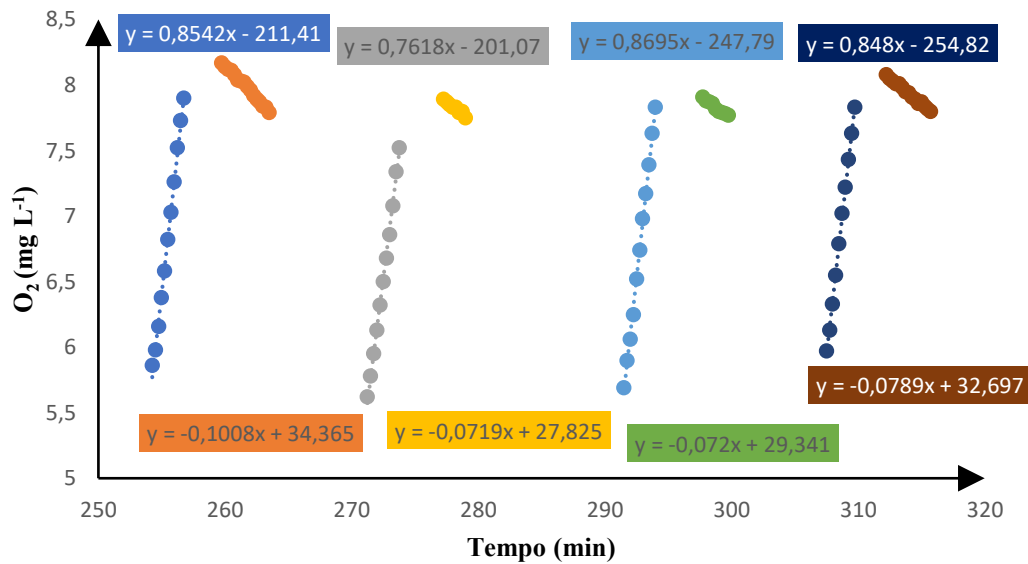
### **3.2 Messa a punto del protocollo respirometrico in luce pulsata**

La messa a punto di un protocollo respirometrico *ad hoc* per la luce pulsata è stata propedeutica per lo studio della luce pulsata in fotobioreattori in continuo in termini di tempo di buio, tempo di luce e intensità del pulse.

Le colture cellulari utilizzate sono state acclimate alla condizione di luce testata (in particolare  $I_{pulse}$ ) in sistemi di coltivazione in continuo. Come abbiamo visto nel paragrafo 3.1 questo è un aspetto fondamentale per far sì che i risultati ottenuti siano riproducibili.

Quindi, è stato effettuato il protocollo respirometrico sulla coltura acclimatata, come descritto al paragrafo 2.6, variando i tempi di luce oppure quelli di buio. L'intensità del pulse è mantenuta costante e pari a quella a cui la coltura è acclimatata, mentre varia la luce integrale. Questa, infatti, dipende dal tempo di ciclo e, quindi, sia dal tempo di luce che dal tempo di buio. Mantenendo costante uno dei due valori e modificando l'altro, si va a modificare anche l'intensità di luce. Una volta ottenuti i dati a diverse condizioni, si è costruito un grafico che mostri la variazione di concentrazione di ossigeno nel tempo (Figura 3.2) e, tramite la costruzione di una retta di tendenza, si sono ricavati l'OPR e l'OCR, rappresentati dai coefficienti angolari delle rette. Si è svolta questa operazione per ogni condizione testata.





**Figura 3.2** Esempio di profilo tipico della variazione di concentrazione di ossigeno nel tempo. Sono riportate anche le equazioni delle rette di tendenza.

I valori medi di OPR e OCR di ogni condizione sono stati normalizzati sulla concentrazione di biomassa del campione testato, in modo da rendere confrontabili tra loro i risultati.

Tuttavia, quando si lavora in luce pulsata la concentrazione di biomassa non è l'unica variabile che influisce sulla produzione di ossigeno, difatti cambiando tempi di luce, di buio o intensità del pulse, viene modificata anche l'intensità di luce media integrale ( $I_{avint}$ , ovvero la luce media in un tempo di ciclo lungo lo spessore della camera). Si è quindi normalizzato il dato anche sulla luce integrale. Nello specifico, prima della normalizzazione, si è sommato l'OPR/Cx con il valore assoluto dell'OCR/Cx, in modo da considerare la produzione fotosintetica netta.

Per minimizzare le variabilità dovute al singolo test, i valori di produzione di ossigeno vengono normalizzati sul punto di massima produzione.

### 3.2.1 Risultati con variazione del tempo di luce

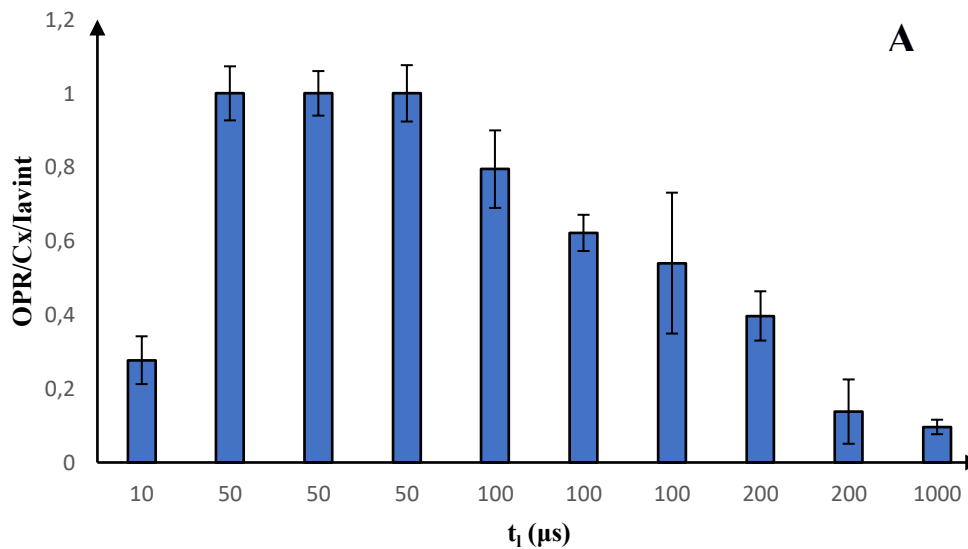
In primo luogo si sono indagati, applicando i protocolli respirometrici, diversi tempi di luce ( $\mu\text{s}$ ) in modo da verificare quale fosse quello ottimale per la crescita dei microrganismi (Figura 3.3).

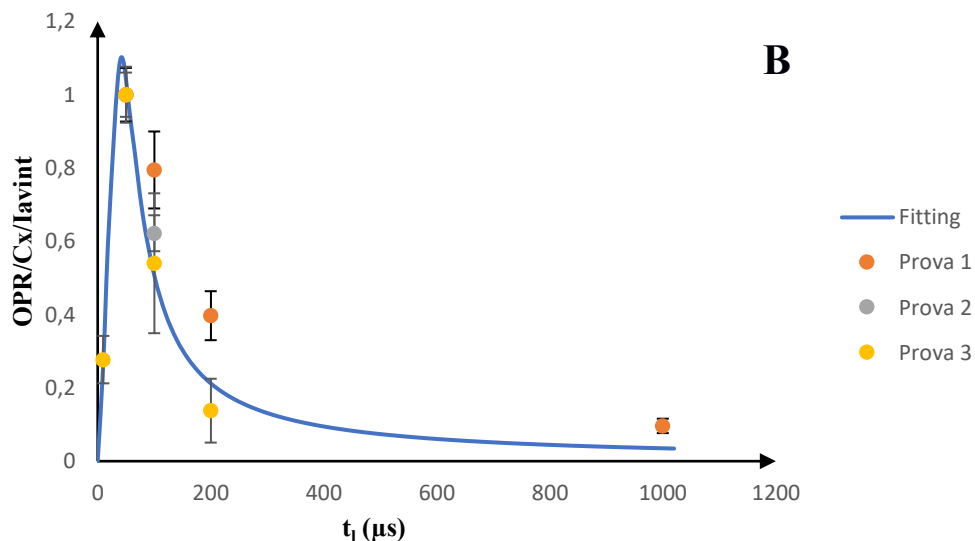
I test respirometrici si sono effettuati con colture acclimatate a luce pulsata a 100  $\mu\text{s}$  e a intensità di *pulse* corrispondente a quella del rispettivo test (Tabella 3.1).

$I_{\text{pulse}} (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$	$t_i (\mu\text{s})$	$t_b (\text{ms})$
17850	10	5,85
	50	
	100	
	200	
	1000	
35700	50	5,85
	100	

**Tabella 3.1** Condizioni sperimentali del protocollo respirometrico per le luci pulsate con variazione del tempo di luce.

In questo caso si è tenuto conto solo dell'OPR in quanto l'analisi è stata effettuata per indagare i tempi di luce, ovvero il periodo in cui l'ossigeno è prodotto.





**Figura 3.3** Andamento dell'OPR normalizzato al variare del tempo di luce rappresentato in un istogramma (A) e in un grafico a punti (B) con un fitting calcolato tramite cinetica di Haldane.

Come si può osservare dall'immagine si ha un picco tra i 50  $\mu\text{s}$  e i 100  $\mu\text{s}$ , con un calo a tempi di luce maggiori, profilo ben descritto dalla cinetica di Haldane.

Tempi di luce minori, come i 10  $\mu\text{s}$ , probabilmente non forniscono abbastanza fotoni ai fotosistemi, rendendo questo tempo di luce fotolimitante.

Al contrario, con tempi di luce maggiori di 100  $\mu\text{s}$ , si osserva un'inibizione del profilo di evoluzione dell'ossigeno. In queste condizioni, presumibilmente, i fotosistemi vanno incontro a fotoinibizione e si ha un calo nella produzione di ossigeno e probabilmente della crescita microalgale.

I risultati ottenuti, inoltre, sono in linea con gli studi fatti da (Borella et al., 2022) utilizzando lo stesso *set-up* sperimentale e che hanno osservato la presenza del *Flashing Light Effect* con tempi di luce di circa 100  $\mu\text{s}$ .

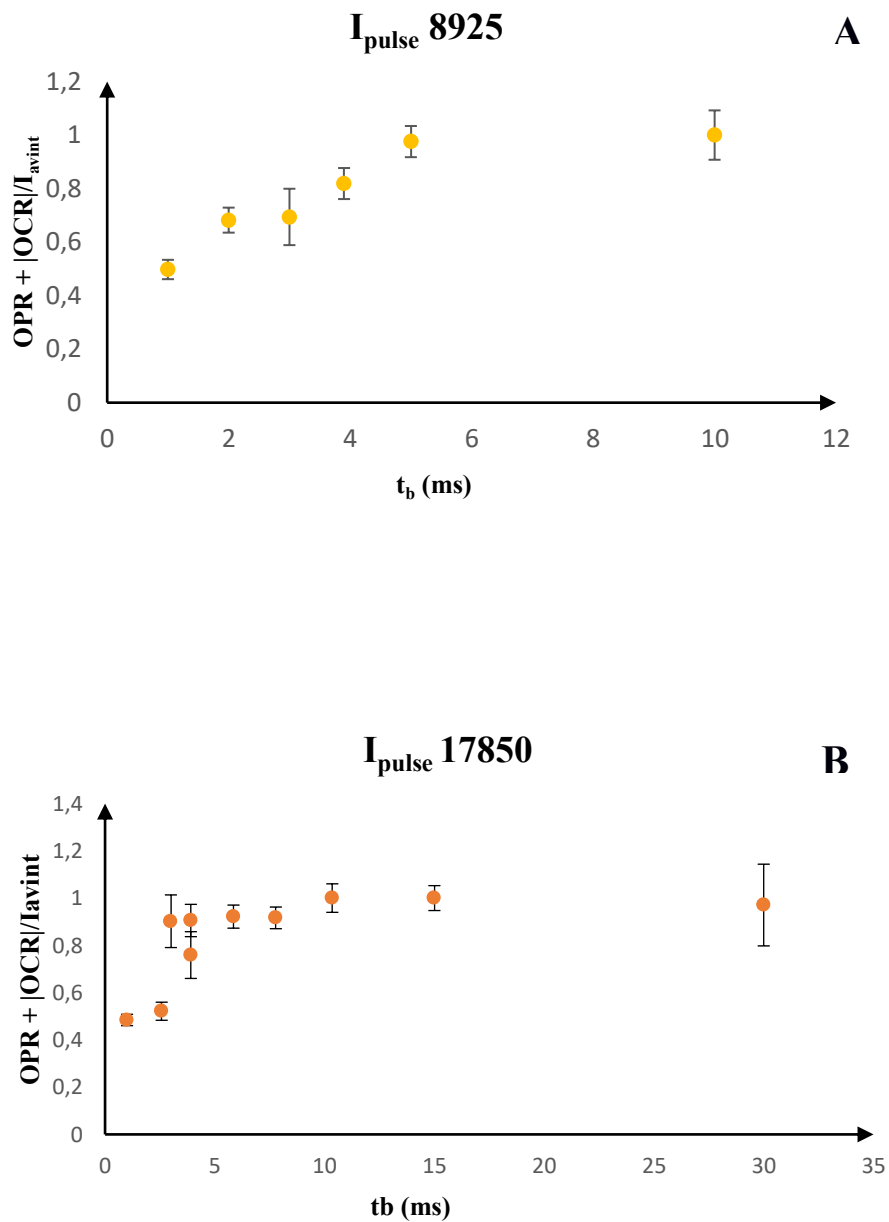
Questi risultati sono giustificabili se si confrontano con le tempistiche dell'assorbimento del fotone e della separazione di carica che ne permette l'arrivo ai fotosistemi studiate da Schulze et al. (Schulze et al., 2017). Queste, infatti, sono nell'ordine dei pico- e dei microsecondi, e spiegherebbero anche il calo ottenuto con tempo di luce pari a 1 ms.

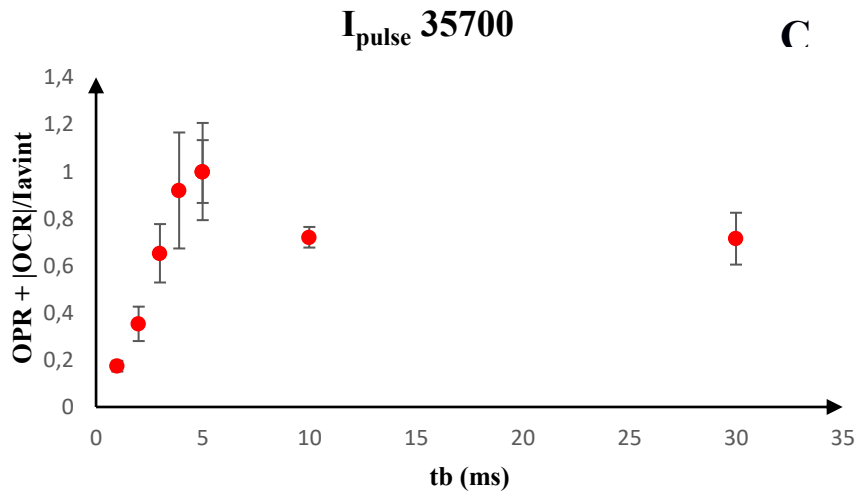
Dunque, sulla base di questo protocollo, e per continuità con gli esperimenti effettuati da (Borella, Diotto, et al., 2022) in cui si è osservato il *Flashing Light Effect*, si è scelto di operare con un tempo di luce di 100  $\mu\text{s}$ .

### 3.2.2 Risultati con variazione del tempo di buio

Una volta indagato l'effetto del tempo di luce, il protocollo è stato applicato allo studio del tempo di buio. In questo studio si è mantenuto il tempo di luce costante a 100  $\mu$ s e sono stati testati diversi tempi di buio (ms) e diverse intensità del pulse di luce.

Le diverse repliche del protocollo hanno portato ai risultati riportati in Figura 3.4.

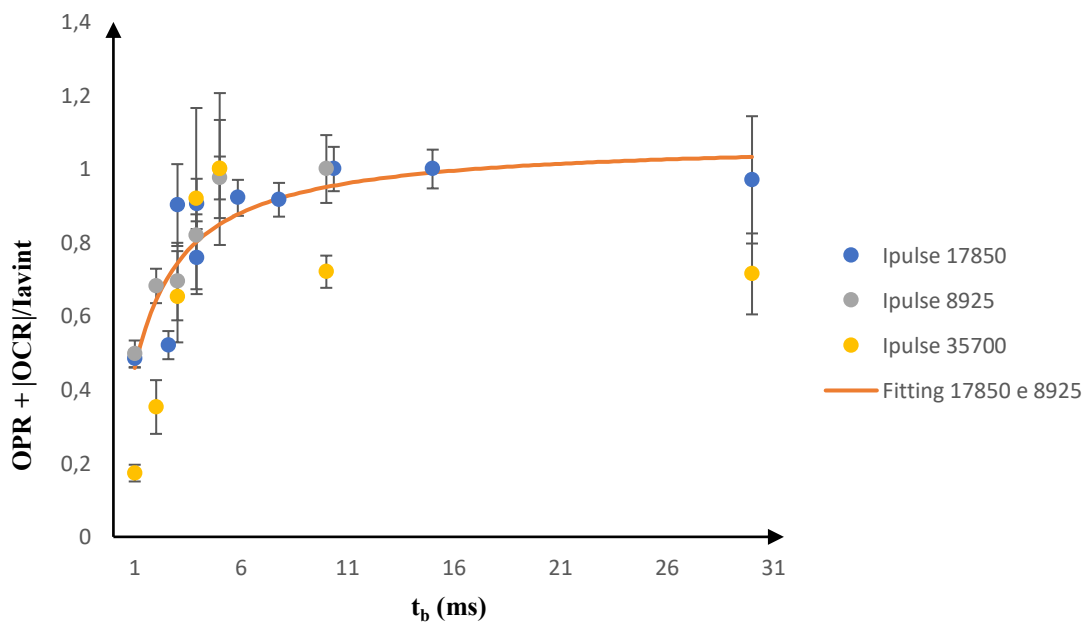




**Figura 3.4** Profilo di evoluzione dell'ossigeno al variare dei tempi di buio. Sono riportati protocolli svolti a intensità di luce di  $8925 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (A),  $17850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (B) e  $35700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (C).

Da questi profili si può notare come il trend sia in crescita fino ad un tempo di buio di circa 5 ms, per poi stabilizzarsi e raggiungere un plateau.

Sovrapponendo i punti ottenuti a diverse intensità si può notare più facilmente un trend comune, come mostrato in Figura 3.5.



**Figura 3.5** Profilo dell'evoluzione dell'ossigeno al variare del tempo di buio. Si può notare come i dati dei pulse 17850 e 8925 possano essere *fittati* con la cinetica di Monod.

Analizzando i dati ottenuti si può supporre che sopra un determinato tempo di buio, compreso tra i 4 ms e i 5 ms (*half saturation constant* pari a 2.95 ms), i fotosistemi abbiano abbastanza tempo per scaricare i fotoni ricevuti durante il pulse di luce e, dunque, lavorino sempre alla loro massima capacità.

Bisogna infatti considerare che gli step di trasferimento elettronico, ovvero il passaggio degli elettroni all'interno della catena di trasporto, impiegano tempi fino all'ordine dei millisecondi. Difatti è in questa fase che troviamo lo step più lento del trasporto, ovvero la riossidazione del *pool* di chinoni che impiega circa 5 ms (Schulze et al., 2017; Zarmi et al., 2020). Con queste considerazioni possiamo effettuare una migliore analisi delle curve ottenute con il protocollo applicato a diversi tempi di buio. Il punto in cui la curva inizia a piegare verso un *plateau*, infatti, coincide proprio con i 5 ms appena citati. Questo ci permette di supporre, pur con le dovute premure, che 5 ms siano il minimo tempo di buio necessario per far sì che i fotosistemi lavorino al massimo della loro capacità, senza andare incontro a saturazione.

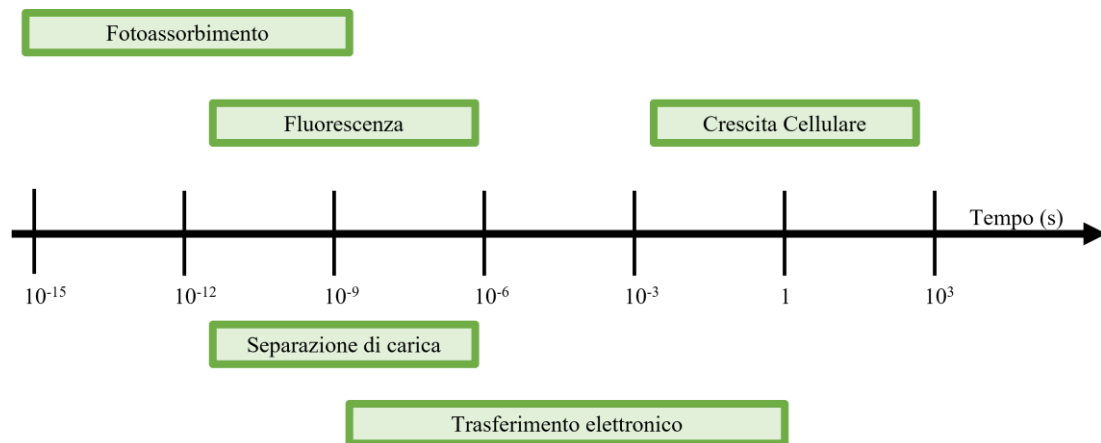
Questo profilo è anche suggerito dallo studio di (Vejrazka et al., 2015): dopo aver misurato il profilo di evoluzione dell'ossigeno in *C. reinhardtii* con varie condizioni di luce pulsata, hanno realizzato un modello in grado di predire la saturazione dei fotosistemi sottoposti a determinati tempi di luce e di buio. Tramite questo modello gli autori hanno messo in evidenza che i fotosistemi risultano sempre scarichi dopo un determinato tempo di buio (che varia a seconda del tempo di luce corrispondente).

I dati mostrano anche che utilizzando un'intensità del pulse di  $35700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  si ottengono valori inferiori rispetto alle altre due intensità testate per tempi di buio maggiori di 10 ms di cui, dunque, non si può fare il *fitting* come fatto per gli altri dati presentati. Nonostante questo dato sia da confermare con ulteriori esperimenti, si può presupporre che un pulse di  $35700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  abbia un'intensità troppo alta, che, quindi, causa una fotoinibizione dei fotosistemi.

### 3.2.3 Considerazioni finali

La messa a punto del protocollo respirometrico appena descritto è uno strumento estremamente utile per indagare, in poco tempo, un grande numero di variabili che potrebbero influenzare la crescita microalgale.

Nel caso specifico delle luci pulsate la respirometria ha permesso di stabilire un tempo di luce ottimale e di studiare più approfonditamente le tempistiche della cinetica di trasporto degli elettroni, considerata da Schulze et al. nel suo studio (Schulze et al., 2017) (Figura 3.6).



**Figura 3.6** Tempi caratteristici del processo fotosintetico.

Nello specifico il protocollo ci ha permesso di ipotizzare che:

- Un tempo di luce ottimale compreso tra i 50  $\mu$ s e i 100  $\mu$ s;
- Un tempo di buio minimo, necessario per ottimizzare l'efficienza del processo, compreso tra i 3 ms e i 5 ms.

La respirometria ha anche permesso una parziale validazione delle tempistiche della cinetica di trasporto degli elettroni discussa da Schulze et al. (Schulze et al., 2017).

Tali dati forniscono una importante base di partenza per lo studio dell'applicazione delle luci pulsate sulla coltivazione di *A. maxima* e per l'ottimizzazione di parametri fondamentali come il tempo di luce ed il tempo di buio.

## **CAPITOLO 4 - Luce pulsata: risultati e discussione**

In questo capitolo verranno discussi i risultati sperimentali ottenuti con fotobioreattori in continuo in diverse condizioni sperimentali in luce pulsata. In particolare, il confronto verrà effettuato soffermandosi sull'efficienza fotosintetica e sulla produttività di biomassa a stato stazionario. Verranno anche analizzati e confrontati i risultati ottenuti dai protocolli di estrazione dei pigmenti fotosintetici. Tutti i risultati ottenuti verranno messi in relazione a quelli ottenuti in precedenza nello stesso laboratorio.

### **4.1 Esperimenti preliminari: studio dell'intensità di luce e del *pulse*, del tempo di luce e del tempo di permanenza**

In questa prima parte verranno presentati gli esperimenti preliminari che hanno permesso l'inquadramento teorico e lo sviluppo di questo progetto di tesi.

Innanzitutto, è stato studiato l'effetto dell'intensità di luce sulla crescita di *A. maxima*, nello stesso set-up sperimentale descritto nel capitolo 2 (Borella et al., 2021). Si è, quindi, proceduto alla misurazione della crescita in regime di luce pulsata, andando a verificare sia l'effetto del tempo di luce che quello del tempo di permanenza, utilizzando diverse intensità di *pulse* (Borella et al., 2022).

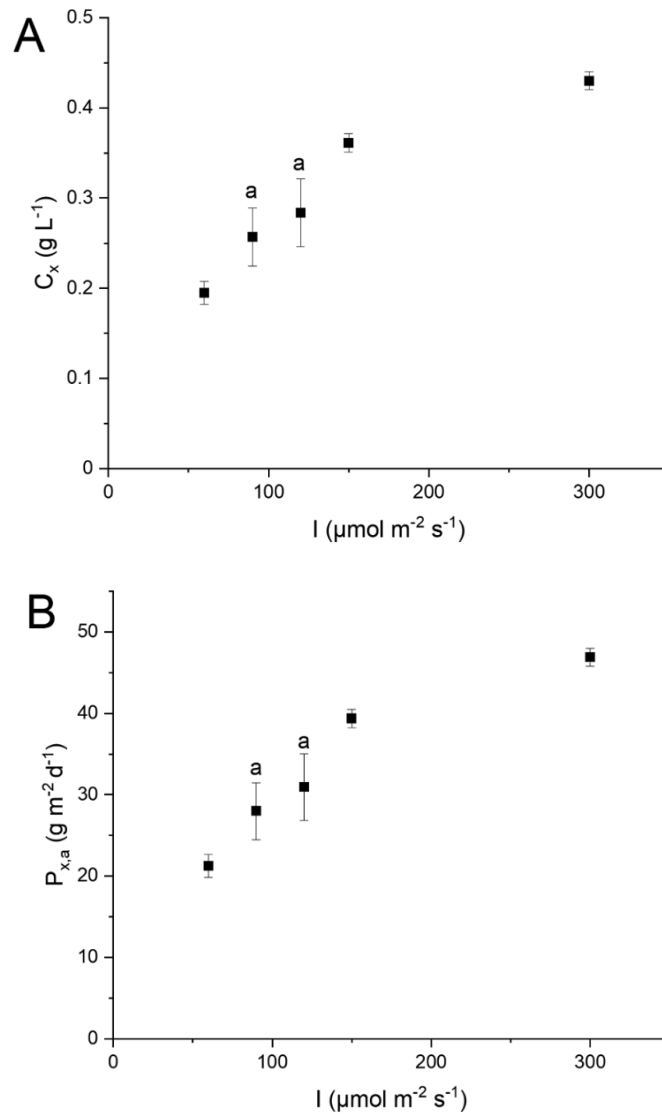
#### **4.1.1 Effetto dell'intensità di luce**

Borella et al. (Borella et al., 2021) hanno studiato l'effetto che varie intensità di luce hanno sulla crescita di *A. maxima*. Gli esperimenti sono stati effettuati con lampade a spettro ottimizzato R/B, in luce continua.

Le intensità testate vanno dai  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ai  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e gli esperimenti sono stati condotti ad un tempo di permanenza di 1.33 giorni.

I risultati hanno mostrato come tra  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  si ha una crescita lineare sia della concentrazione di biomassa, sia della produttività areale. Sopra le  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , invece, i microrganismi vanno incontro a fotosaturazione, come si osserva dal *plateau* (Figura 4.1).





**Figura 4.1** Profilo della concentrazione di biomassa (A) e della produttività areale (B) al variare dell'intensità luminosa, i dati con la stessa lettera sono statisticamente uguali (Borella et al., 2021).

La produttività volumetrica varia dai  $22.4 \pm 1.1 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  ai  $48 \pm 1.1 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ .

La massima produttività attualmente osservata in *flat panel* illuminati da luce solare è  $27.4 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (Clippinger & Davis, 2019; Zhou et al., 2015), lontana dal limite teorico, che si aggira intorno ai  $50 - 60 \text{ g m}^{-2} \text{ g}^{-1}$ , ma comunque molto inferiore alla produttività reale di impianti outdoor. Si può quindi ritenere che il sistema di coltura utilizzato sia altamente performante.

### 4.1.2 Effetto del tempo di luce, dell'intensità del *pulse* e del tempo di permanenza

Studi successivi (Borella et al., 2022) hanno utilizzato il medesimo set up sperimentale per la coltivazione di *A. maxima* in regime di luce pulsata.

I diversi esperimenti sono stati condotti ad intensità di luce integrale pari a 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con un tempo di permanenza, rispettivamente, di 1.9 giorni e 0.9 giorni.

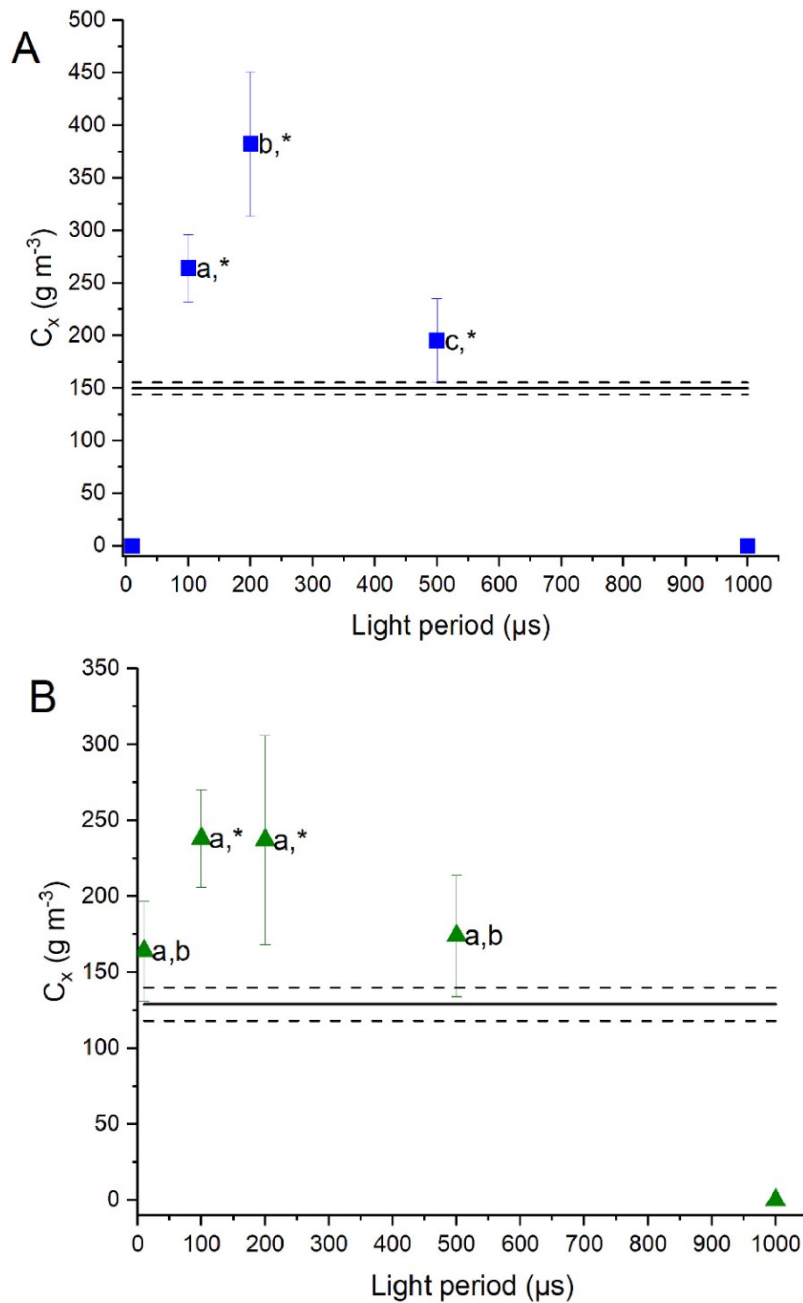
Al fine di mantenere la luce integrale costante è stato modificato anche il tempo di buio.

Si sono dunque testati tempi di luce nel range dai 10  $\mu\text{s}$  ai 1000  $\mu\text{s}$  (Tabella 4.1)

$I_{av}$ [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	$I_{pulse}$ [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	Light period $t_l$ [ $\mu\text{s}$ ]	Frequency $f$ [Hz]	Duty cycle ( $\varphi$ )	Flashing cycle ( $t_c$ ) [ms]	Dark period $t_d$ [ms]
300	8108	10	3700.0	0.0370	0.27	0.26
	11,605	100	258.5	0.0259	3.87	3.76
	10,800	200	138.9	0.0278	7.20	6.99
	16,216	500	37.0	0.0185	27.03	26.50
	12,500	1000	24.0	0.0240	41.67	40.67
120	8700	10	1379.0	0.0138	0.73	0.72
		100	137.9		7.25	7.15
		200	68.9		14.50	14.30
		500	27.6		36.25	35.75
		1000	13.8		72.50	71.50

**Tabella 4.1** Condizioni sperimentali per lo studio dell'effetto della variazione del tempo di luce.

Confrontando i risultati con un controllo in luce continua alla stessa intensità integrale, si è visto come in range di tempi di luce fra 100 e 500  $\mu\text{s}$  si ha un aumento considerevole della biomassa. In particolare, per l'intensità di 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sono risultati stimolare il *flashing light effect* i tempi di luce compresi tra i 100  $\mu\text{s}$  e i 500  $\mu\text{s}$ ; per l'intensità di 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , l'incremento si è verificato solo tra i 100  $\mu\text{s}$  e i 200  $\mu\text{s}$  (Figura 4.2).



**Figura 4.2** Concentrazione di biomassa in condizioni di luce pulsata a intensità di  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (A) e di  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (B). La linea nera tratteggiata rappresenta il controllo in luce continua.

È stato eseguito un terzo set di esperimenti, volti ad indagare l'effetto dell'aumento dell'intensità del *pulse*. In questo caso il tempo di luce è stato mantenuto costante a  $100 \mu\text{s}$  e l'intensità integrale a  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (condizioni sperimentali risultate ottimali negli esperimenti precedenti) e sono state testate intensità del *pulse* comprese tra  $11600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $71400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Tabella 4.2).

Queste condizioni sono state applicate a tempi di permanenza fra 0.9 e 4.8 giorni.

$I_{\text{int}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$I_{\text{pulse}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$t_i$ ( $\mu\text{s}$ )	$f$ (Hz)	$t_b$ (ms)
300	11600	100	275	3,6
	17850		168	5,85
	35700		84	11,8
	71400		42	23,7

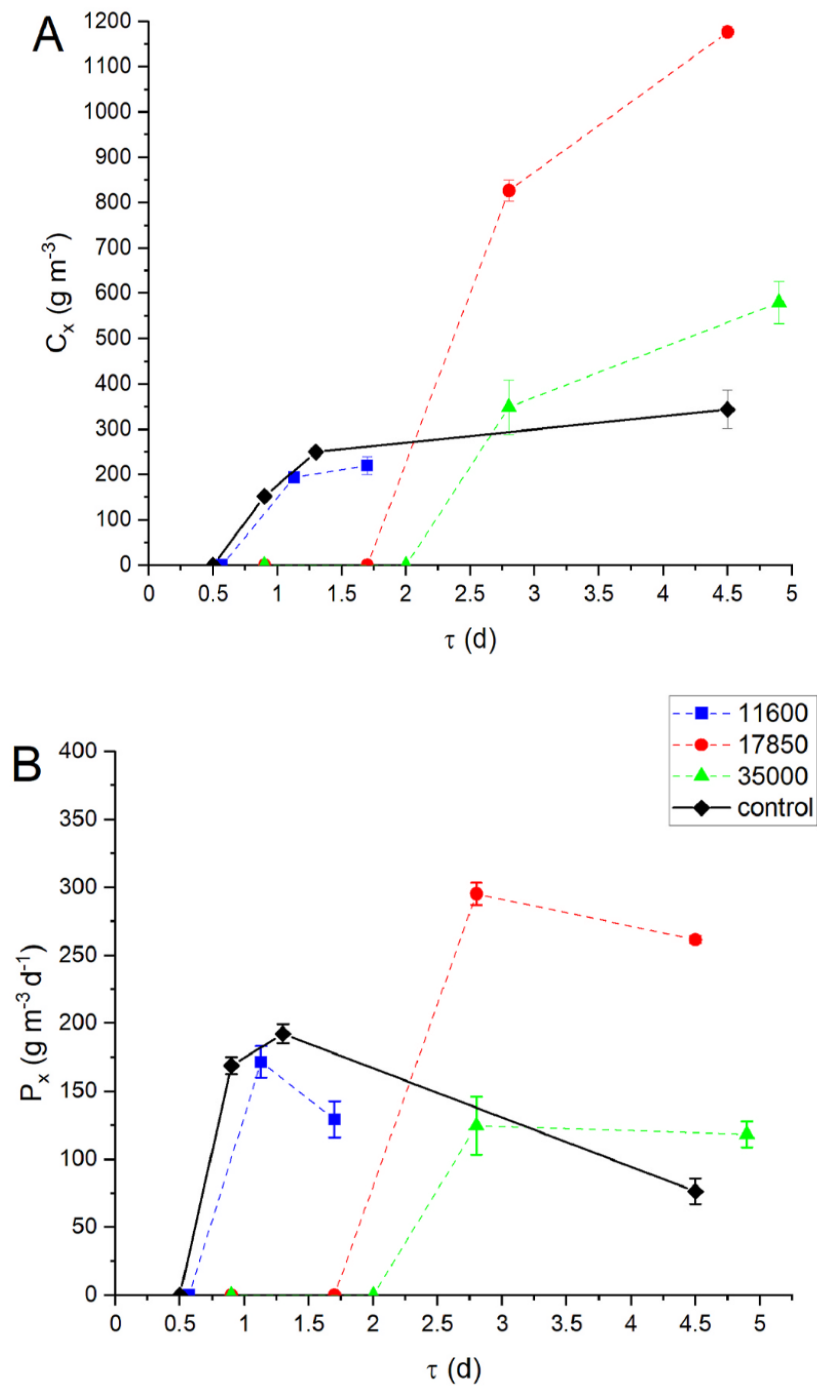
**Tabella 4.2** Condizioni sperimentali per indagare l'effetto dell'intensità del *pulse* sulla crescita di biomassa.

Quest'ultima indagine ha permesso di constatare che l'intensità del *pulse* ha un effetto sul tempo di permanenza di *wash-out* e di massima produttività.

Difatti, se è vero che a *pulse*  $11600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  il massimo della produttività si ha ad un tempo di permanenza pari ad un 1.2 giorni, ovvero un tempo simile al controllo in luce continua, questo non è vero per le altre intensità testate.

Come si può notare dalla Figura 4.3, con un *pulse* di  $17850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , si ha il picco di biomassa e di produttività a tempi di permanenza molto più elevati, ovvero 2.8 giorni e 4.5 giorni, oltre ad uno spostamento del tempo di permanenza di *wash out* a valori più elevati.

Inoltre, si è notato che l'utilizzo di intensità di *pulse* maggiori di  $17850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  non è vantaggioso: il *wash out* si verifica con tempi di permanenza di due giorni e  $\tau$  maggiori risultano comunque in concentrazioni e produttività minori rispetto alle condizioni precedenti. Con intensità così elevate, probabilmente, si verifica una forte fotoinibizione che impedisce la crescita cellulare.



**Figura 4.3** Concentrazione di biomassa (A) e produttività (B) a diversi tempi di permanenza e a diverse intensità di *pulse*.

Questi dati hanno dimostrato come le luci pulsate possano risultare in un aumento della produttività in sistemi di coltivazione in continuo, anche a tempi di permanenza elevati, condizione vantaggiosa anche perché permette flussi di *medium* minori e, dunque, una diminuzione dei costi di processo. Essi rappresentano il punto di partenza per questo lavoro di tesi, in quanto in letteratura

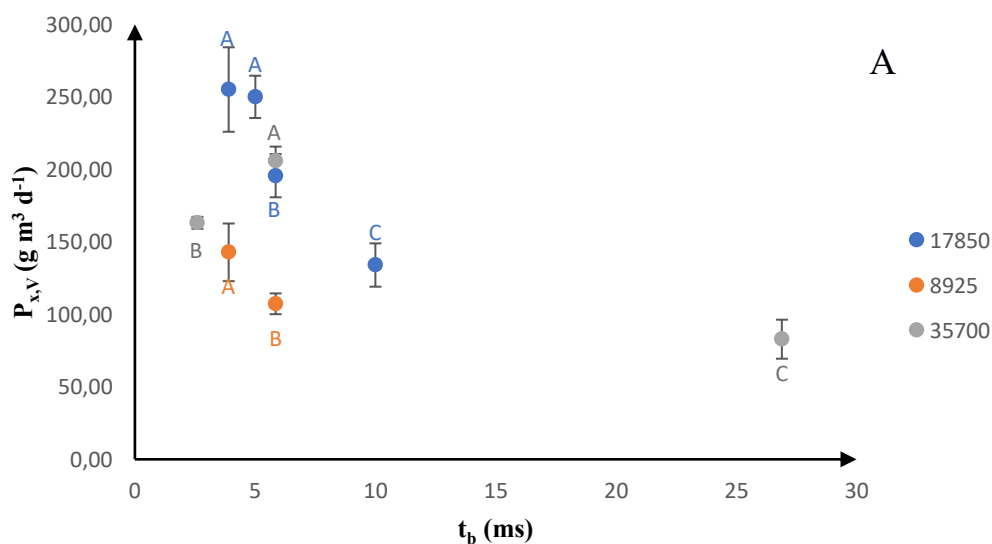
sono presenti pochissimi dati provenienti da coltivazioni in continuo in luce pulsata. Questa modalità di coltivazione, difatti, risulta necessaria per compiere un confronto valido, in quanto essa permette alla biomassa di acclimatarsi alle condizioni di luce fornite e di mantenere costante la sua composizione, fornendo dati riproducibili.

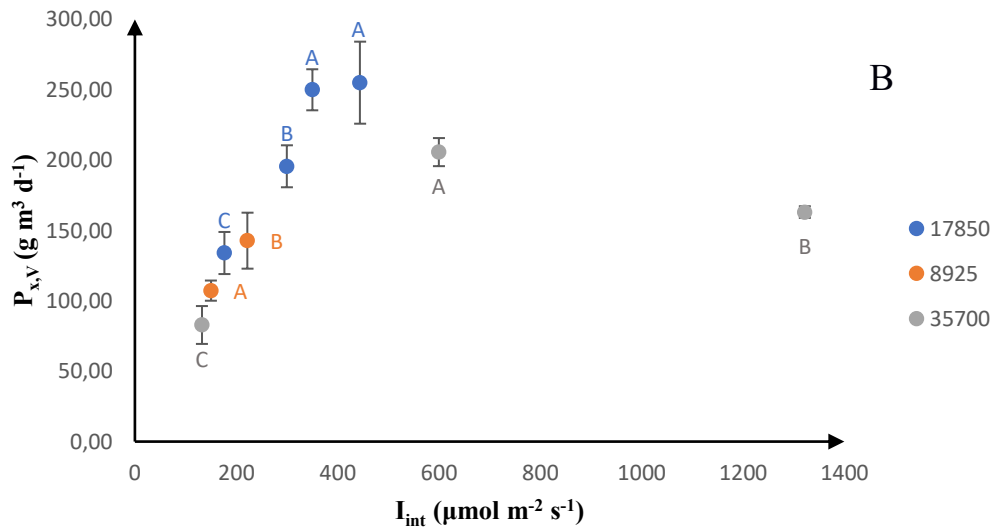
## 4.2 Studio dell'effetto della variazione del tempo di buio

Nel presente lavoro di tesi, ci si è focalizzati sullo studio dell'effetto del tempo di buio in fotobioreattori in continuo.

Nello specifico sono stati testati e confrontati tempi di buio che vanno da 2.6 ms a 26.9 ms, utilizzando luci a diverse intensità di pulse.

I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli derivanti, in maniera indipendente, dal protocollo respirometrico messo a punto per le luci pulsate, andando a misurare la concentrazione e a calcolare la produttività di biomassa nelle varie condizioni sperimentali.





**Figura 4.4** Profilo della produttività volumetrica al variare del tempo di buio (A) e dell'intensità di luce integrale (B). I punti con la stessa lettera sono statisticamente uguali.

La figura 4.4A mostra come a tempi di buio minori corrisponda una produttività di biomassa più alta. Con un'intensità del pulse di  $35700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  è possibile anche notare un massimo intorno ai 5 ms. Con le altre due intensità testate non è visibile un picco, tuttavia non si osservano differenze significative per i tempi di buio intorno i 3.9/5 ms e  $I_{\text{pulse}}$  di  $17850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , suggerendo la presenza di un massimo. Aumentando il tempo di buio, si ottiene un profilo decrescente, in quanto tempi di buio troppo lunghi, come i 26,9 ms, non permettono alla biomassa di crescere in maniera ottimale, a causa della poca luce fornita. In condizioni di fotolimitazione, infatti, la fotosintesi, e quindi la crescita microlagale, aumenta linearmente all'aumentare della luce. Ciò significa che a basse intensità l'apparato fotosintetico non lavora al suo massimo potenziale e non permette una crescita ottimale dei cianobatteri (Torzillo & Vonshak, 2013). Si ricorda che per questi esperimenti il tempo di permanenza è stato impostato a 2.7 giorni, in corrispondenza del miglior dato di produttività osservato negli esperimenti condotti precedentemente. L'utilizzo di tempi di permanenza elevati ha dei vantaggi dal punto di vista operativo, consentendo un risparmio di acqua e richiedendo la capacità di processare volumi inferiori nelle fasi di down-stream. Tuttavia, lavorando a tempi di permanenza così elevati, sono necessarie alte intensità per penetrare tutti gli strati della coltura e l'acclimatazione della microalga alle nuove condizioni sperimentali richiede tempi più lunghi rispetto a tempi di permanenza intorno ad 1 giorno. L'acclimatazione alla luce pulsata ad alta intensità è risultata

fondamentale per ottenere dati riproducibili e costanti nel tempo, ovvero per il raggiungimento dello stato stazionario.

I risultati ottenuti dagli esperimenti di crescita sono in accordo con quelli presentati nel paragrafo 3.2.2 che permettono di ipotizzare 5 ms come tempo di buio ottimale. Tramite il protocollo respirometrico, difatti, è stato visto un *trend* del profilo di evoluzione dell'ossigeno in crescita fino a circa 5 ms, *trend* che arriva ad un *plateau*, sottolineando come questo tempo di buio sia preferibile per garantire la massima produttività di biomassa.

Da studi condotti sui tempi caratteristici del processo fotosintetico, è noto che per la cattura del fotone sono richiesti tempi dell'ordine dei femto/picosecondi (Schulze et al., 2017).

La fase oscura della fotosintesi, invece, è caratterizzata da tempi più lunghi, dell'ordine dei ms. Uno dei processi più lenti è quello di riossidazione dei plastochinoni, anche a causa del meccanismo ciclico in cui sono coinvolti (Vermaas & Fj, 2001). Pertanto, uno studio più approfondito sulle tempistiche più opportune da utilizzare nel campo delle luci pulsate rappresenta un importante elemento per lo sviluppo di un processo efficiente. Infatti, se da un lato le luci pulsate permettono teoricamente di ridurre il fenomeno del self-shading (K.-H. Park & Lee, 2000; Schulze et al., 2017), dall'altra pulse ad alta intensità possono risultare inibitenti per la coltura e provocare danni al fotosistema, incidendo quindi sulla capacità di processare i fotoni incidenti (K.-H. Park & Lee, 2000).

Per valutare il possibile contributo legato all'intensità integrale di luce, si è ricavato l'andamento della produttività al variare di  $I_{int}$  (Figura 4.4 B). Si è ottenuto un massimo intorno ad intensità di  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , risultati in accordo con quelli presentati nel paragrafo 4.1.1. Nello specifico, intensità minori di luce risultano fotolimitanti, mentre oltre le  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  si va, presumibilmente, incontro a fotosaturazione e, successivamente, fotoinibizione, con un calo nella produttività. Un'analisi approfondita dell'effetto dei due contributi separatamente richiede maggiori dati, essendo  $t_b$  e  $I_{int}$  due parametri interconnessi, al variare del primo varia inevitabilmente anche il secondo.

Questo confronto, tuttavia, ci permette di notare come l'incremento di produttività a tempi di buio di 3.9/5 ms, presente nelle diverse intensità di *pulse* testate, non



corrisponda sempre alla stessa luce integrale. Difatti, variando l'intensità del *pulse* e mantenendo costante il tempo di buio varia anche l'intensità integrale.

Con un *pulse* di  $17850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  il tempo di buio che garantisce la massima produttività, ovvero 3.9/5 ms, corrisponde ad un'intensità di luce integrale di  $444 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , valore in linea con l'intensità ottimale di crescita in continuo trovato precedentemente (Borella et al., 2021). Analizzando le altre intensità di *pulse*, però, l'intensità integrale varia: con *pulse* di  $8925 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  il massimo di produttività osservato si ha ad intensità di  $222 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mentre con *pulse* di  $35700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  il massimo corrisponde ad intensità integrali di  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Confrontando i risultati ottenuti con quanto già presente in letteratura si può notare come le condizioni testate non siano state studiate in maniera approfondita da altri autori. Pozzobon (Pozzobon, 2022) ha coltivato *C. vulgaris* in batch utilizzando luce pulsata ad alta intensità ( $7000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con frequenze da 0.1 a 1000 Hz ed un ciclo di lavoro di 0.5, che produce una intensità di luce integrale di  $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . L'autore ha utilizzato anche un controllo in luce continua con intensità di  $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Dai risultati emerge come, con luce continua, queste intensità risultino dannose per la crescita microalgale, crescita che risulta ridotta anche con luce pulsata a frequenze troppo alte (1000 Hz) che simulano sostanzialmente una condizione di luce continua. Tuttavia regolando la frequenza a 100 Hz il tasso di crescita è risultato raddoppiato rispetto al controllo in luce continua.

Da questi dati si può intuire come per sfruttare al meglio le intensità testate in questo lavoro di tesi, bisognerebbe calibrare al meglio la frequenza e, dunque, tempo di luce e di buio ottimali sono, presumibilmente, dipendenti dall'intensità del *pulse* utilizzato. Questo potrebbe anche spiegare i valori più bassi di produttività ottenuti ad intensità di *pulse* di  $35700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $205.71 \text{ g m}^{-3} \text{ g}^{-1}$ ) e di  $8925 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $142.77 \text{ g m}^{-3} \text{ g}^{-1}$ ).

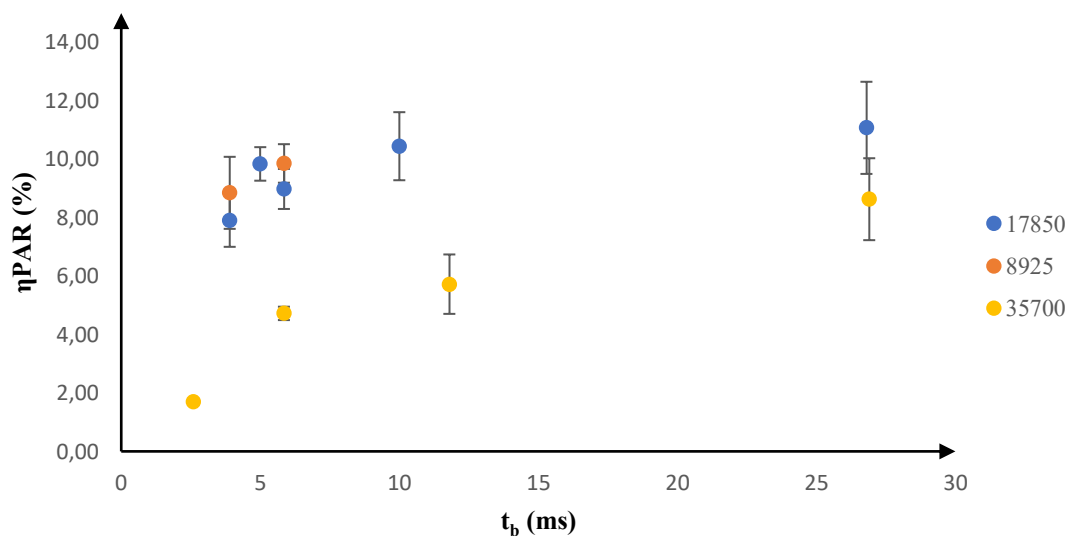
#### **4.2.1 Studio dell'efficienza fotosintetica in luce pulsata**

Oltre alla produttività volumetrica, un parametro fondamentale è l'efficienza di conversione fotosintetica. Questa rappresenta l'efficienza con cui il cianobatterio sfrutta l'energia luminosa fornitagli, convertendola in biomassa. Un alto valore di efficienza di conversione fotosintetica si traduce in un minore spreco di energia in quanto una maggiore percentuale di quest'ultima viene convertita in biomassa.

In altre parole, più il valore di efficienza fotosintetica è alto, meglio le alghe sfruttano i fotoni forniti. Questo parametro risulta particolarmente esplicativo negli studi in luce pulsata, in quanto l'ottimizzazione dei tempi di buio e di luce ha come fine ultimo proprio quello di permettere ai fotosistemi e alle catene di trasporto degli elettroni di assorbire e convertire in energia chimica ogni fotone emesso dal sistema di illuminazione, senza che, a causa di una saturazione dei fotosistemi, se ne perda nessuno.

Questo parametro, inoltre, è fondamentale in quanto tiene conto sia della dimensione del reattore che del quantitativo di luce effettivamente assorbito dalle microalghe (Vejrazka et al., 2013).

Il profilo dell'efficienza fotosintetica al variare del tempo di buio è mostrato in Figura 4.5.



**Figura 4.5** Efficienza fotosintetica al variare del tempo di buio.

Il grafico mostra un andamento simile a quello fornito dal protocollo respirometrico (vedi paragrafo 3.2.2), con una crescita fino a tempi di buio intorno ai 3.9/5 ms che si interrompe per andare a *plateau* a tempi di buio maggiori.

Anche questo dato permette delle supposizioni su quale possa essere il tempo di buio necessario per far sì che i fotosistemi non vadano incontro a saturazione. In particolare, il calcolo dell'efficienza fotosintetica tiene conto sia della concentrazione di biomassa sia dell'intensità di luce integrale.

Quest'ultimo parametro, inoltre, diminuisce all'aumentare del tempo di buio. Come riportato in letteratura il valore di efficienza fotosintetica aumenta al diminuire della

luce incidente (Tredici, 2010), che, in questo caso, è la luce integrale. È dunque interessante notare che dopo un certo tempo di buio (circa 5 ms), il valore di efficienza fotosintetica non aumenti più, rimarcando l'ipotesi che al di sopra di questo tempo di buio i fotosistemi hanno abbastanza tempo per processare i fotoni incidenti.

Risulta quindi rilevante che i risultati di efficienza fotosintetica e quelli ottenuti dalla respirometria sono concordi.

È interessante notare, inoltre, come la curva formata dai punti ad intensità del pulse  $35700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  abbia valori minori rispetto alle restanti intensità. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che ad intensità di *pulse* così alte il flusso di fotoni che giunge ai fotosistemi è troppo elevato, causando condizioni di fotoinibizione, ovvero la saturazione dei fotosistemi e la diminuzione del processo fotosintetico (Torzillo & Vonshak, 2013).

Il massimo di efficienza fotosintetica raggiunto, corrispondente all' 11.07 %, si è ottenuto con un'intensità del pulse di  $17850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e ad un tempo di buio di 26.8 ms. Questo valore è comunque molto simile a quello ottenuto con un tempo di buio di 5 ms e di 10 ms, ovvero, rispettivamente, 9.84% e 10.44%. Questi valori, però, sono lontani da quello che è il massimo teorico di efficienza fotosintetica raggiungibile utilizzando la PAR, ovvero il 27% (Bhan Singh et al., 2013). Tuttavia, confrontando i dati ottenuti con la letteratura esistente, è possibile affermare che questi valori siano superiori, ad esempio, a quelli ottenuti da (Matsudo et al., 2012) che, coltivando *Arthrospira platensis* in fotobioreattori tubulari in continuo, hanno ottenuto un massimo di efficienza fotosintetica del 7.7%.

Valori così alti, inoltre, sono atipici per reattori di spessori elevati come quello utilizzato. Normalmente, infatti, un minore spessore garantisce una maggiore efficienza fotosintetica (Gifuni et al., 2018).

I risultati ottenuti, dunque, potrebbero essere causati dalla capacità della luce pulsata di penetrare in profondità nei fotobioreattori, limitando il *self shading*.

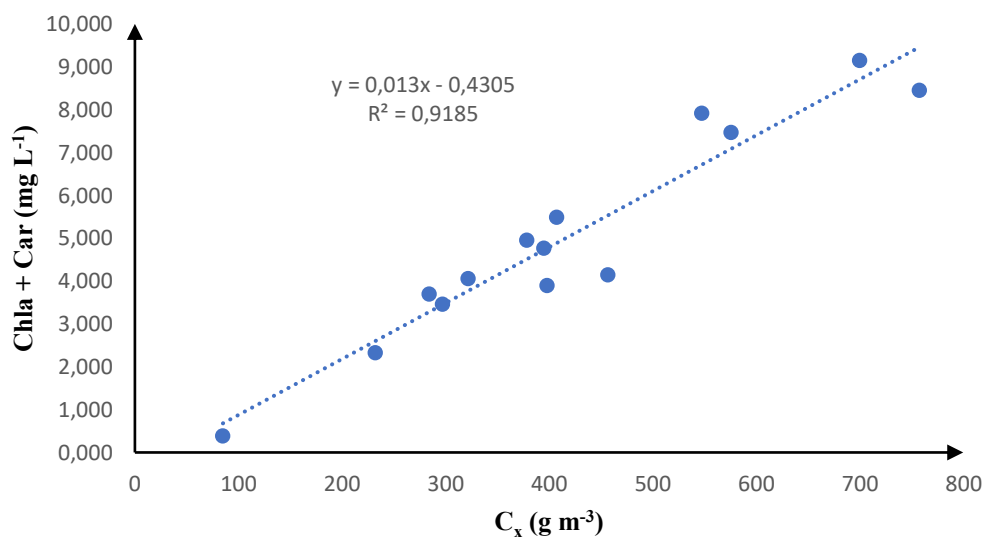
Nonostante questi primi risultati, però, sono necessari ulteriori studi per massimizzare questo valore e sfruttare al meglio le potenzialità delle luci artificiali. Ad oggi il massimo di efficienza fotosintetica raggiungibile nella coltivazione di microalghe, è circa del 12% della luce solare. Questo è causato dal fatto che si utilizzano principalmente *open ponds* che sfruttano la radiazione solare (Chisti,

2016; Pruvost et al., 2016). Questo valore, inoltre, si riduce al 5% nel momento in cui si considerano le condizioni reali di coltura (Tredici, 2010). Il vantaggio dell'utilizzo di luci artificiali e di sistemi chiusi è, d'altronde, proprio quello di poter sfruttare uno spettro ottimizzato che possa essere utilizzato pienamente dalle microalghe.

#### 4.2.2 Analisi dei pigmenti fotosintetici

La misura del contenuto di pigmenti fotosintetici è importante in quanto, come discusso nel paragrafo 1.2.2.1, questi sono molecole fondamentali per il processo fotosintetico e che rivestono un ruolo essenziale nella captazione dei fotoni.

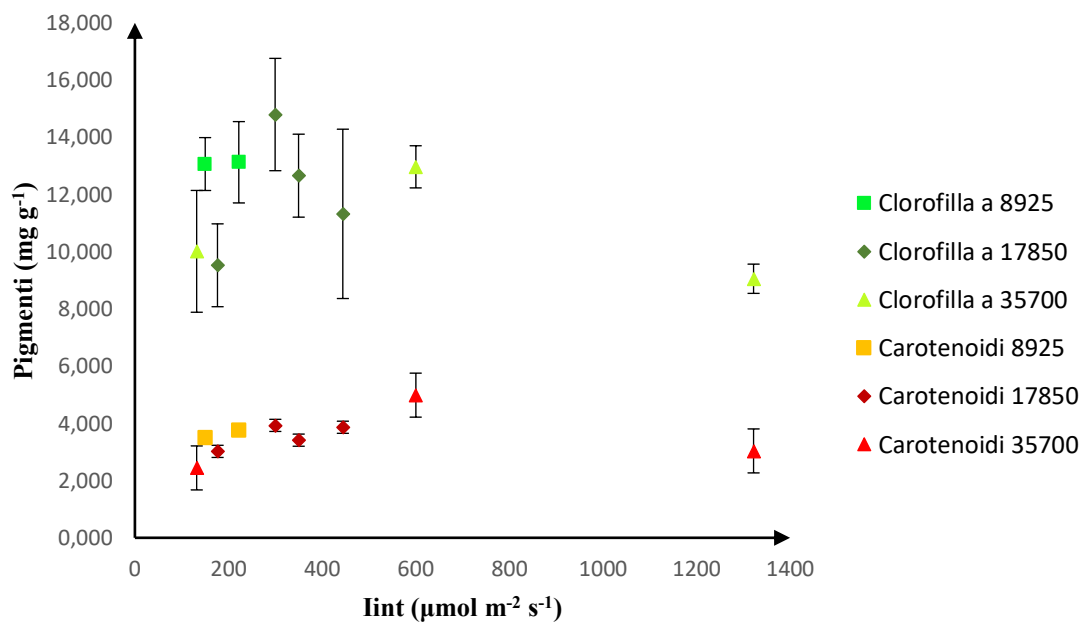
Essendo clorofilla *a* e carotenoidi costituente principale dei fotosistemi, il loro contenuto aumenta linearmente all'aumentare della biomassa, come si può osservare dalla retta di correlazione presentata in Figura 4.6.



**Figura 4.6** Retta di correlazione tra concentrazione di pigmenti fotosintetici e concentrazione di biomassa.

Analizzando la composizione della biomassa questa correlazione lineare risulta piuttosto tipica in assenza di condizioni di stress (Ljubic et al., 2018), ad esempio eccessiva luce o carenza di nutrienti. Difatti, a meno di variabili che possano influenzare la produzione di pigmenti da parte del microrganismo, si ha una corrispondenza fra la concentrazione di biomassa e il numero di centri di reazione. Nel caso degli esperimenti discussi in questo lavoro, in tutte le condizioni testate il

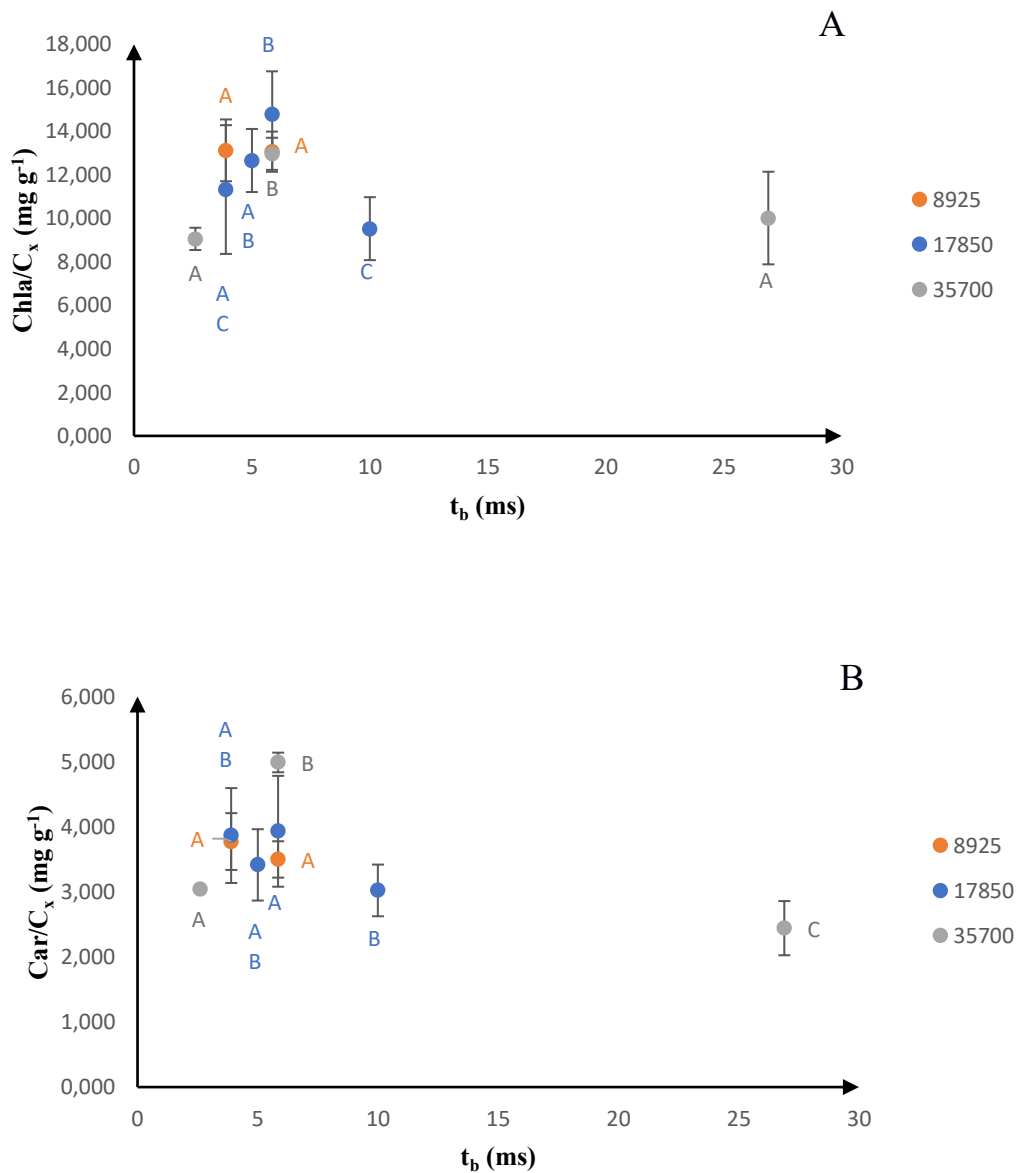
contenuto di pigmenti non varia in maniera considerevole all'interno della biomassa, indicando che non si è mai raggiunta forte inibizione. Tale osservazione è molto importante nel sistema in esame, considerando che sono stati utilizzati *pulse* molto intensi. Questo risulta molto rilevante, in quanto sembrerebbe indicare che in un PBR da 15 cm di spessore, l'elevata intensità della luce pulsata permette di raggiungere gli strati più profondi del reattore, senza portare eccessivo stress alla coltura. Infatti, in risposta a stress luminosi il contenuto di pigmenti nella biomassa si riduce a causa dello stress ossidativo: viene rallentata la sintesi *de novo* dei fotosistemi e la loro degradazione prende il sopravvento, portando ad una diminuzione della concentrazione totale di pigmenti (Nishiyama et al., 2005). Pertanto, confrontando il contenuto totale di pigmenti fotosintetici all'intensità di luce integrale (Figura 4.7), non si osserva un andamento fortemente decrescente.



**Figura 4.7** Profilo del contenuto di pigmenti fotosintetici al variare dell'intensità di luce integrale.

Rapportando al tempo di buio il contenuto di pigmenti normalizzato sulla concentrazione di biomassa (Figura 4.8), è possibile osservare come con *pulse* di  $8925 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  esso rimanga costante in tutte le condizioni testate, mentre con *pulse* di  $17850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $35700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  possiamo notare un leggero picco nel contenuto di clorofilla intorno ai 5 ms. Analizzando il contenuto di carotenoidi, invece, il picco è osservabile solo con *pulse* di  $35700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Da questo si può

dedurre che nessuna delle condizioni testate abbia portato ad un'importante degradazione dei fotosistemi.

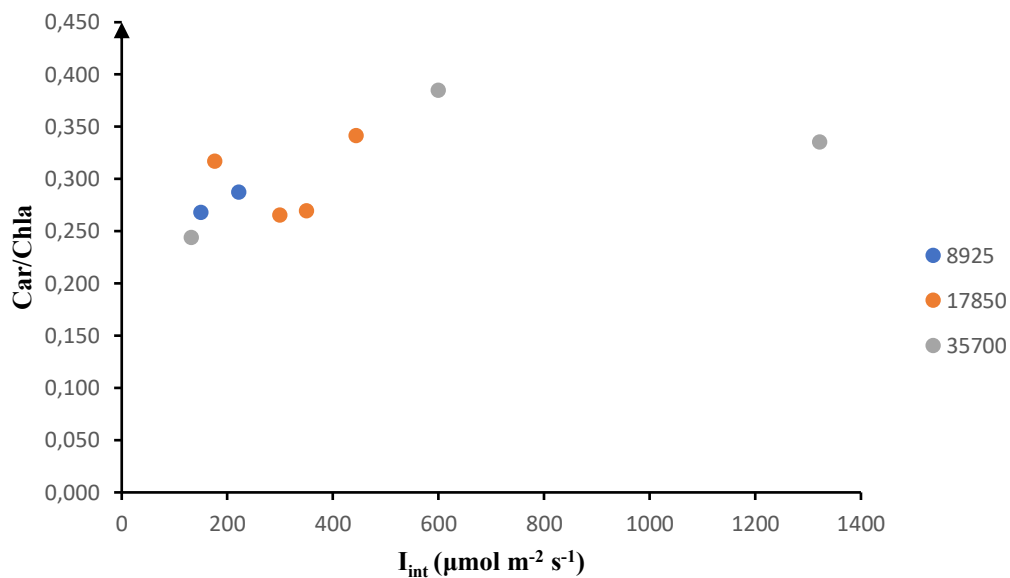


**Figura 4.8** Andamento della concentrazione di clorofilla a (A) e carotenoidi (B) normalizzati sulla concentrazione della biomassa al variare del tempo di buio. I punti con la stessa lettera sono statisticamente uguali.

Sebbene l'andamento generale del contenuto di pigmenti rimanga costante, si possono osservare dei picchi in corrispondenza di quello che è risultato essere il tempo di buio in cui si ha un massimo di produttività (5.85 ms). Questo è probabilmente dovuto al fatto che questa condizione rispecchi le cinetiche di

trasporto degli elettroni e porti a performance di crescita migliori, senza provocare danni ai fotosistemi.

Per valutare meglio gli effetti dello stress luminoso è indicativo il rapporto tra la concentrazione di carotenoidi e quella di clorofilla. Come detto nel paragrafo 1.1.1, infatti, i carotenoidi sono molecole fotoprotettive, prodotte in maggiore concentrazione in seguito a stress luminoso. Nello specifico, nel momento in cui i cianobatteri sono sottoposti a condizioni di alta intensità luminosa, si ha una sovraregolazione della sintesi dei carotenoidi (Steiger et al., 1999), che porta ad un aumento della loro concentrazione. Osservando questo rapporto per ogni intensità di *pulse* (Figura 4.9) è possibile notare come esso vari limitatamente, permettendo di ipotizzare la mancanza di stress luminoso nella maggior parte delle condizioni testate.



**Figura 4.9** Rapporto tra concentrazione di carotenoidi e clorofilla nei vari *pulse* testati.

Il rapporto è stato calcolato per ogni intensità del *pulse* testata ed è possibile constatare una tendenza in aumento con l'intensità del *pulse* corrispondente a 35700 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Questo indica, presumibilmente, un aumento nella concentrazione di carotenoidi, indice di un maggiore stress luminoso da parte del microrganismo. Questo è in linea con quanto discusso nel paragrafo 4.2, rendendo più forte l'ipotesi

che un'intensità del *pulse* di  $35700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sia fotosaturante e fornisca troppi fotoni ai fotosistemi, ma è da approfondire con ulteriori set di esperimenti.

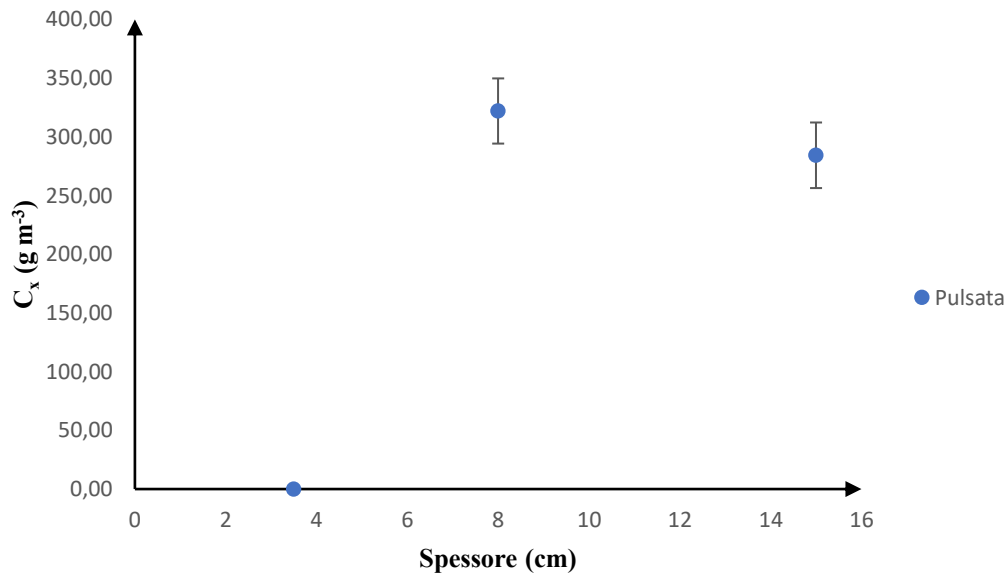
### 4.3 Studio preliminare dell'effetto dello spessore

Dai risultati riportati nel paragrafo 4.2 risulta evidente come nell'ottimizzazione della coltivazione di microalghe sfruttando luci pulsate entrino in gioco molte variabili, spesso collegate tra loro. Una di queste variabili è lo spessore del reattore che, in altri termini, rappresenta il cammino ottico della luce all'interno del reattore. Come visto nel paragrafo 1.4.4.1, difatti, all'interno del reattore si va a creare un profilo di attenuazione della luce che viene ridotto nel momento in cui si utilizzano luci pulsate. Il profilo di attenuazione luminoso è tanto più marcato quanto maggiore è la densità microalgale (Kim et al., 2006). Un numero maggiore di cellule, infatti, amplifica il cosiddetto *self shading*, ovvero il fenomeno per il quale le cellule che si trovano nella parte illuminata del reattore impediscono la penetrazione ottimale della luce e ne bloccano l'assorbimento da parte delle cellule nella zona buia.

Questo si traduce nel fatto che per sfruttare appieno le potenzialità delle luci pulsate bisognerebbe operare con reattori abbastanza spessi in modo da sfruttare quanto più possibile la grande penetrazione dei *pulse* ad alta intensità. Alte intensità, infatti, riescono a impedire la formazione del *self shading* e allo stesso tempo la luce pulsata impedisce che intensità di luce così alte causino danni alle cellule (Schulze et al., 2017). Reattori con un cammino ottico maggiore, inoltre, permetterebbero un risparmio notevole di materiali, ammortizzando i costi operativi di processo.

I risultati ottenuti dagli esperimenti preliminari effettuati nei tre spessori (3.5 cm, 8 cm e 15 cm) sono mostrati in Figura 4.10.





**Figura 4.10** Concentrazione della biomassa al variare dello spessore del reattore.

In figura 4.10 vengono confrontati i risultati ottenuti nelle stesse condizioni di luce pulsata (I pulse 8925  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , t luce 100  $\mu\text{s}$  t buio 5.85 ms) in reattori di diverso spessore. Si può notare come utilizzando il reattore da 3.5 cm si vada incontro ad un *wash out* del reattore. Questo è plausibilmente dovuto al grande flusso di fotoni al quale la biomassa in un reattore di così poco spessore è costantemente sottoposta. Spessori maggiori, uniti al mixing sempre presente all'interno dei reattori, permettono alla biomassa di muoversi dalla faccia del reattore più vicina alla fonte luminosa a quella opposta (Perin et al., 2016; Saccardo et al., 2022). La luce pulsata permette di far penetrare la luce fino a quest'ultima faccia del reattore, senza però lasciare alcuna zona buio al suo interno.

Con spessori maggiori, difatti, la concentrazione di biomassa ottenuta con la luce pulsata aumenta.

È evidente che siano necessari ulteriori studi che si concentrino sia sull'utilizzo di spessori ancora maggiori, per sfruttare ancora meglio le potenzialità della luce pulsata, sia sul confronto con dati ottenuti in luce continua, in modo da confrontare gli andamenti in funzione dello spessore: in luce continua a causa del fenomeno di self-shading le performance di crescita calano, con una formazione di una zona buia all'interno del reattore. L'utilizzo di spessori maggiori su larga scala ha una serie di vantaggi potenziali di cui il principale è la riduzione della richiesta di superficie illuminata.

## 4.4 Razionalizzazione delle condizioni in luce pulsata: applicazione di modelli matematici

Nell'ottica di ottimizzare i parametri della luce pulsata per aumentare le performance di crescita, si sono riadattate le equazioni messe a punto da Zarmi et al. (Zarmi et al., 2020), presentate nel paragrafo 1.5, in modo da poterle sfruttare per calcolare il tempo di buio minimo necessario a tutti i plastoidrochinoni per riossidersi in plastochinoni.

Dall'ottimizzazione del tempo di buio attraverso questo approccio, ci si aspettava un aumento dell'efficienza fotosintetica, in quanto i cianobatteri sarebbero riusciti a sfruttare al meglio la luce fornitagli dalle lampade LED.

Innanzitutto si sono calcolate le condizioni per far ridurre a due intensità di pulse diverse lo stesso numero di plastochinoni. Nello specifico sia con intensità di pulse di  $17850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  che con intensità di  $35700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sono necessari 26.8 ms per riossidare totalmente il pool di plastoidrochinoni. Nel primo caso, però, è necessario un tempo di luce doppio (200  $\mu\text{s}$ ) rispetto alla seconda intensità (Tabella 4.3). Questi parametri, inoltre, permettono di mantenere costante la luce integrale.

$I_{\text{int}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$I_{\text{pulse}}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$t_{\text{i}}$ ( $\mu\text{s}$ )	$t_{\text{b}}$ (ms)	$\eta\text{PAR}$ (%)	$P_{\text{x,v}}$ ( $\text{g m}^3 \text{d}^{-1}$ )	Grouping
132	17850	200	26,8	$11,07 \pm 1,58$	$106,12 \pm 15,11$	A
	35700	100		$8,63 \pm 1,40$	$82,86 \pm 13,46$	B

**Tabella 4.3** Efficienza fotosintetica e produttività volumetrica delle condizioni calcolate sfruttando le equazioni del modello di Zarmi. Valori di efficienza fotosintetica e di produttività statisticamente diversi sono indicati con una diversa lettera.

Anche in questo caso, si può notare che utilizzando un'intensità del pulse di 35700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  si ha una diminuzione sia dell'efficienza, sia della produttività, nonostante la luce integrale sia la stessa in entrambi i casi. Questo suggerisce nuovamente che l'intensità del pulse abbia un effetto non trascurabile sui risultati, tuttavia la validazione del modello richiede ulteriori dati sperimentali.

Si è andati anche a testare una condizione di luce limite che non avrebbe permesso ai fotosistemi di ricevere abbastanza elettroni e, nello specifico, non si sarebbe riuscito a ridurre neanche un plastochinone (Tabella 4.4).

$I_{int}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$I_{pulse}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$t_l$ ( $\mu\text{s}$ )	$t_b$ (ms)	$P_{x,v}$ ( $\text{g m}^{-3} \text{d}^{-1}$ )
61	35700	10	5,85	$30,4 \pm 2,06$

**Tabella 4.4** Produttività volumetrica della condizione limite calcolata utilizzando le equazioni del modello di Zarmi.

Questa condizione, difatti, è caratterizzata da un brevissimo tempo di luce di 10  $\mu\text{s}$  che, come atteso, ha permesso l'ottenimento di solo  $30.4 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (produttività volumetrica), molto minore rispetto alla precedente condizione con *pulse* di 35700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  testata per la validazione, ovvero  $82.66 \text{ g m}^{-3} \text{d}^{-1}$ .

I dati preliminari ottenuti sfruttando le equazioni stipulate da Zarmi (Zarmi et al., 2020) confermano la validità e l'efficacia del modello presentato. Tuttavia per una validazione ottimale sono necessari un gran numero di dati ottenuti sfruttando diverse condizioni calcolabili tramite le equazioni, testando diverse combinazioni di tempi di luce e buio ottimali. I risultati presentati, dunque, sono ad uno stadio del tutto preliminare e pongono le basi per studi futuri.

## CONCLUSIONI

Lo scopo dell'elaborato è quello di ottimizzare le performance di crescita del cianobatterio *Arthrospira maxima* coltivato in fotobioreattori in continuo, sfruttando luci LED pulsate con spettro ottimizzato R/B. Lo studio si è focalizzato sull'effetto di due fattori principali nella coltivazione: il tempo di buio tra un *pulse* di luce ed il successivo e lo spessore del fotobioreattore.

Le indagini sono state accompagnate dalla messa a punto di un protocollo respirometrico *ad hoc*, che ha permesso di indagare l'effetto di diversi tempi di buio in tempi brevi, e da un modello che ha fornito le basi teoriche per alcuni test preliminari di approfondimento.

Per quanto riguarda il tempo di luce, sono stati considerati intervalli tra 10  $\mu$ s e 1000  $\mu$ s, mentre per il tempo di buio, è stato studiato il range tra 2.6 ms e 26.9 ms, in accordo con le indicazioni provenienti dalla letteratura (Schulze et al., 2017). Con lo scopo di effettuare uno *screening* iniziale di molte condizioni sperimentali in breve tempo, si è messo a punto un protocollo respirometrico. Questo ha fornito informazioni riguardanti il tempo di luce ottimale alle diverse intensità incidenti che permetta il pieno sfruttamento delle capacità dei fotosistemi senza andare incontro a fotoinibizione, che è risultato compreso tra i 50  $\mu$ s e i 100  $\mu$ s. Questi dati sono anche in accordo con i risultati di test di crescita in continuo effettuati precedentemente con la stessa specie nel laboratorio.

Ulteriori test respirometrici sono stati effettuati per indagare l'effetto del tempo di buio, basandosi sull'ipotesi dell'esistenza di un tempo minimo per far sì che i fotosistemi non vadano incontro a saturazione (Zarmi et al., 2020). I risultati dei test respirometrici mostrano un tempo compreso tra i 3.9 ms e i 6 ms, in accordo con le ipotesi di letteratura. Il significato fisiologico di questo intervallo di tempo potrebbe corrispondere al tempo minimo necessario ai plastoidrochinoni della catena di trasporto elettronica per riossidarsi a plastochinoni (Zarmi et al., 2020).

Considerando che questo protocollo respirometrico è stato sviluppato *ad hoc* per questo studio, necessita di una validazione. Per questo motivo, sono stati effettuati degli esperimenti di coltivazione in continuo volti a testare alcune delle condizioni di luce direttamente sui reattori, tracciando i profili di produttività volumetrica e di efficienza fotosintetica al variare del tempo di buio.

I dati raccolti hanno confermato quanto risultato dalla respirometria, rendendo più solida l'ipotesi che un tempo di buio compreso tra i 3.9 ms e i 5 ms sia ottimale, per la specie *A. maxima*, e nel reattore utilizzato, di spessore 15 cm. Difatti il valore più alto di produttività volumetrica ( $255 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) è stato ottenuto utilizzando un'intensità di *pulse* di  $17850 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ed un tempo di buio di 3.9 ms. Il profilo dell'efficienza fotosintetica, inoltre, ha confermato che al di sopra di 5 ms il *trend* va incontro ad un *plateau* e l'efficienza rimane costante.

Si è anche notato che intensità del *pulse* troppo elevate, come  $35700 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , comportano un'efficienza fotosintetica minore e risultano inibenti per la crescita. Questo è probabilmente causato dal flusso troppo elevato di fotoni che giungono ai fotosistemi.

Durante questa fase sperimentale è emersa una grande interconnessione tra le variabili presenti in luce pulsata. È dunque risultato necessario lo studio dell'effetto che una di queste, ovvero lo spessore del fotobioreattore, ha sulle performance di crescita. Da questa indagine, ancora in stadio preliminare, è risultato che per sfruttare appieno le potenzialità della luce pulsata sono necessari spessori elevati, in modo che la grande penetrazione della luce sia pienamente sfruttata dalle microalghe.

La parte sperimentale si è, infine, concentrata sulla validazione del modello proposto da Zarmi (Zarmi et al., 2020). Si sono quindi studiate condizioni *ad hoc* in modo che si potessero sfruttare tempi di buio che permettessero a tutto il *pool* di plastidochinoni di riossidarsi a plastochinoni. I risultati, però, sono ancora in uno stadio preliminare e non sono sufficienti ad una completa validazione del modello, sebbene indichino che il razionale proposto da Zarmi potrebbe essere utile per guidare la campagna sperimentale, resa molto complessa dall'alto numero di variabili operative in gioco.

I risultati ottenuti in questa lavoro sperimentale sono un primo passo per l'ottimizzazione delle luci pulsate nella coltivazione di cianobatteri in fotobioreattori illuminati artificialmente. Sono stati proposti un tempo di buio e di luce ottimali necessari affinché si possa ottimizzare il processo e si è rimarcata l'importanza dello spessore del fotobioreattore nell'utilizzo di luci pulsate.

## BIBLIOGRAFIA

- Abu-Ghosh, S., Fixler, D., Dubinsky, Z., & Iluz, D. (2016). Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresource Technology*, 203, 357–363. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.12.057>
- Becker, E. W. (2013). Microalgae for Aquaculture: Nutritional Aspects. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*, 671–691. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.CH36>
- Becker E.W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*.
- Beel, B., Prager, K., Spexard, M., Sasso, S., Weiss, D., Müller, N., Heinnickel, M., Dewez, D., Ikoma, D., Grossman, A. R., Kottke, T., & Mittaga, M. (2012). A Flavin Binding Cryptochrome Photoreceptor Responds to Both Blue and Red Light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 24(7), 2992–3008. <https://doi.org/10.1105/TPC.112.098947>
- Bernát, G., & Rögner, M. (2011). Center of the Cyanobacterial Electron Transport Network: The Cytochrome b 6 f Complex. *Bioenergetic Processes of Cyanobacteria*, 573–606. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0388-9\\_20](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0388-9_20)
- Bhan Singh, U., Ahluwalia, A. S., & Singh, U. B. (2013). *Microalgae: a promising tool for carbon sequestration*. <https://doi.org/10.1007/s11027-012-9393-3>
- Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R. H., & Janssen, M. (2013). Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Research*, 2(4), 333–340. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2013.09.004>
- Borella, L., Diotto, D., Barbera, E., Fiorimonte, D., Sforza, E., & Trivellin, N. (2022). Application of flashing blue-red LED to boost microalgae biomass productivity and energy efficiency in continuous photobioreactors. *Energy*, 259. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2022.125087>
- Borella, L., Ortolan, D., Barbera, E., Trivellin, N., & Sforza, E. (2021). A multiwavelength model to improve microalgal productivity and energetic conversion in a red-blue light emitting diodes (LEDs) continuous photobioreactor. *Energy Conversion and Management*, 243, 114330. <https://doi.org/10.1016/J.ENCONMAN.2021.114330>
- Borella, L., Sforza, E., & Bertucco, A. (2022). An internally LED illuminated photobioreactor to increase energy conversion efficiency: Design and

- operation. *Energy Conversion and Management*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.116224>
- Brindley, C., Jiménez-Ruíz, N., Acién, F. G., & Fernández-Sevilla, J. M. (2016). Light regime optimization in photobioreactors using a dynamic photosynthesis model. *Algal Research*, 16, 399–408. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.03.033>
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A., & Malcata, F. X. (2006). Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnology Progress*, 22(6), 1490–1506. <https://doi.org/10.1021/BP060065R>
- Carvalho, A. P., Silva, S. O., Baptista, J. M., & Malcata, F. X. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1275–1288. <https://doi.org/10.1007/S00253-010-3047-8/FIGURES/3>
- Carvalho, A., Silva, S., ... J. B.-A. microbiology and, & 2011, undefined. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Springer*, 89(5), 1275–1288. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8>
- Chisti, Y. (2016). *Large-Scale Production of Algal Biomass: Raceway Ponds*. 21–40. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9_2)
- Cleland, R. E. (1998). Voltammetric measurement of the plastoquinone redox state in isolated thylakoids. In *Photosynthesis Research* (Vol. 58).
- Clippinger, J., & Davis, R. (2019). *Techno-economic analysis for the production of algal biomass via closed photobioreactors: future cost potential evaluated across a range of cultivation system designs*. <https://www.osti.gov/biblio/1566806>
- Coelho, R. S., Vidotti, A. D. S., Reis, É. M., & Franco, T. T. (2014). High cell density cultures of microalgae under fed-batch and continuous growth. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 313–318. <https://doi.org/10.3303/CET1438053>
- D'Alessandro, E. B., & Antoniosi Filho, N. R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 832–841. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2015.12.162>

- de Morais, M. G., Vaz, B. D. S., de Morais, E. G., & Costa, J. A. V. (2015). Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/835761>
- Diotto, D. (2021). *Tesi magistrale*.
- Egloff, S., Tschudi, F., Schmautz, Z., & Refardt, D. (2018). High-density cultivation of microalgae continuously fed with unfiltered water from a recirculating aquaculture system. *Algal Research*, 34, 68–74. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.07.004>
- Emerson, R., & W Arnold. (1932). A separation of the reactions in photosynthesis by means of intermittent light. *The Journal of General Physiology*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2141175/>
- Fu, W., Guomundsson, Ó., Paglia, G., Herjólfsson, G., Andrésson, Ó. S., Palsson, B. O., & Brynjólfsson, S. (2013). Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2395–2403. <https://doi.org/10.1007/S00253-012-4502-5>
- Fu, W., Nelson, D. R., Yi, Z., Xu, M., Khraiwesh, B., Jijakli, K., Chaiboonchoe, A., Alzahmi, A., Al-Khairi, D., Brynjólfsson, S., & Salehi-Ashtiani, K. (2017). Bioactive Compounds From Microalgae: Current Development and Prospects. *Studies in Natural Products Chemistry*, 54, 199–225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63929-5.00006-1>
- García-López Daniel A., & Olguín Eugenia J. (2020). *Potential strategies and opportunities for the development of Arthrospira maxima (Spirulina) processes: A review*. <http://www.solabiaa.org/ojs3/index.php/RELBAAs/article/view/87>
- Gifuni, I., Pollio, A., Marzocchella, A., & Olivieri, G. (2018). *New ultra-flat photobioreactor for intensive microalgal production: The effect of light irradiance*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.014>
- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1396–1412. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2016.10.005>
- Hill, D. R., & Bendall, D. F. (1960). *FUNCTION OF THE TWO CYTOCHROME COMPONENTS IN CHLOROPLASTS: A WORKING HYPOTHESIS*.



- Hohmann-Marriott, M. F., & Blankenship, R. E. (2011). Evolution of photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 515–548. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042110-103811>
- Hüner, N. P. A., Bode, R., Dahal, K., Hollis, L., Rosso, D., Krol, M., & Ivanov, A. G. (2012a). Chloroplast redox imbalance governs phenotypic plasticity: The “grand design of photosynthesis” revisited. *Frontiers in Plant Science*, 3(NOV), 255. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2012.00255/BIBTEX>
- Hüner, N. P. A., Bode, R., Dahal, K., Hollis, L., Rosso, D., Krol, M., & Ivanov, A. G. (2012b). Chloroplast redox imbalance governs phenotypic plasticity: The “grand design of photosynthesis” revisited. *Frontiers in Plant Science*, 3(NOV). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2012.00255>
- Jerney, J., & Spilling, K. (2020). Large Scale Cultivation of Microalgae: Open and Closed Systems. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1980, pp. 1–8). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2018\\_130](https://doi.org/10.1007/7651_2018_130)
- Jurić, S., Vojta, L., Fulgosi, H., Jurić, S., Vojta, L., & Fulgosi, H. (2013). Electron Transfer Routes in Oxygenic Photosynthesis: Regulatory Mechanisms and New Perspectives. *Photosynthesis*. <https://doi.org/10.5772/55339>
- Kannaujya, V. K., Kesheri, M., Singh, G., & Sinha, R. P. (2011). BIOTECHNOLOGICAL POTENTIALS OF PHYCOBILIPROTEINS. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* . [www.ijpbs.net](http://www.ijpbs.net)
- Keeling, P. J. (2013). The Number, Speed, and Impact of Plastid Endosymbioses in Eukaryotic Evolution. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev-Arplant-050312-120144*, 64, 583–607. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-050312-120144>
- Khan, S., Naushad, M., Iqbal, J., Bathula, C., & Sharma, G. (2022). Production and harvesting of microalgae and an efficient operational approach to biofuel production for a sustainable environment. *Fuel*, 311. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2021.122543>
- Kim, Z. H., Kim, S. H., Lee, H. S., & Lee, C. G. (2006). Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 414–419. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2005.11.041>

- Kommareddy, A., & Meeting, G. A. (2003). Study of light as a parameter in the growth of algae in a photo-bio reactor (PBR). *Elibrary.Asabe.Org*. <https://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=13868>
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D. T., & Show, P. L. (2019). Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2019.03.001>
- Kulshreshtha, A., J., A., Jarouliya, U., Bhadauriya, P., Prasad, G., & Bisen, P. (2008). Spirulina in Health Care Management. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(5), 400–405. <https://doi.org/10.2174/138920108785915111>
- Kumar, A., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Malcata, F. X., & van Langenhove, H. (2010). Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: Recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, 28(7), 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.04.004>
- Leakey, A., Press, M., Plant, J. S., & C., & 2002, undefined. (2002). Relative enhancement of photosynthesis and growth at elevated CO<sub>2</sub> is greater under sunflecks than uniform irradiance in a tropical rain forest tree seedling. *Wiley Online Library*, 25(12), 1701–1714. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00944.x>
- Lee, C. G. (1999). Calculation of light penetration depth in photobioreactors. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 4(1), 78–81. <https://doi.org/10.1007/BF02931920>
- Lee, Y. H., & Li, P. H. (2017). Using resonant ultrasound field-incorporated dynamic photobioreactor system to enhance medium replacement process for concentrated microalgae cultivation in continuous mode. *Chemical Engineering Research and Design*, 118, 112–120. <https://doi.org/10.1016/J.CHERD.2016.12.010>
- Lima, S., Schulze, P. S. C., Schüler, L. M., Rautenberger, R., Morales-Sánchez, D., Santos, T. F., Pereira, H., Varela, J. C. S., Scargiali, F., Wijffels, R. H., & Kiron, V. (2021). Flashing light emitting diodes (LEDs) induce proteins, polyunsaturated fatty acids and pigments in three microalgae. *Journal of Biotechnology*, 325, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.11.019>
- Ljubic, A., Safafar, H., Holdt, S. L., & Jacobsen, C. (2018). Biomass composition of *Arthrospira platensis* during cultivation on industrial process water and

- harvesting. *Journal of Applied Phycology*, 30(2), 943–954. <https://doi.org/10.1007/S10811-017-1332-Y/FIGURES/9>
- Maksimov, E. G., Kuzminov, F. I., Konyuhov, I. v., Elanskaya, I. v., & Paschenko, V. Z. (2011). Photosystem 2 effective fluorescence cross-section of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 and its mutants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104(1–2), 285–291. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2011.02.011>
- Masojídek, J., & Torzillo, G. (2008). Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set*, 2226–2235. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00830-2>
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*, 21–36. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.CH2>
- Mathimani, T., Baldinelli, A., Rajendran, K., Prabakar, D., Matheswaran, M., Pieter van Leeuwen, R., & Pugazhendhi, A. (2019). Review on cultivation and thermochemical conversion of microalgae to fuels and chemicals: Process evaluation and knowledge gaps. *Journal of Cleaner Production*, 208, 1053–1064. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.10.096>
- Matsudo, M. C., Bezerra, R. P., Sato, S., Converti, A., & De Carvalho, J. C. M. (2012). Photosynthetic efficiency and rate of CO<sub>2</sub> assimilation by *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* continuously cultivated in a tubular photobioreactor. *Biotechnology Journal*, 7(11), 1412–1417. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201200177>
- Metting, F. B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 17(5–6), 477–489. <https://doi.org/10.1007/BF01574779/METRICS>
- Moran, R., & Porath, D. (1980). Chlorophyll Determination in Intact Tissues Using N,N-Dimethylformamide. *Plant Physiology*, 65(3), 478–479. <https://doi.org/10.1104/PP.65.3.478>
- Muramatsu, M., & Hihara, Y. (2011). Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses. *Journal of Plant Research* 2011 125:1, 125(1), 11–39. <https://doi.org/10.1007/S10265-011-0454-6>

- Nelson, N., & Junge, W. (2015). Structure and Energy Transfer in Photosystems of Oxygenic Photosynthesis. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev-Biochem-092914-041942*, 84, 659–683. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-092914-041942>
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., & Murata, N. (2005). *Inhibition of the repair of Photosystem II by oxidative stress in cyanobacteria*.
- Nürnberg, D. J., Morton, J., Santabarbara, S., Telfer, A., Joliot, P., Antonaru, L. A., Ruban, A. v., Cardona, T., Krausz, E., Boussac, A., Fantuzzi, A., & William Rutherford, A. (2018). Photochemistry beyond the red limit in chlorophyll f-containing photosystems. *Science*, 360(6394), 1210–1213. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAR8313/SUPPL\\_FILE/AAR8313\\_NURNBERG\\_SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAR8313/SUPPL_FILE/AAR8313_NURNBERG_SM.PDF)
- Olguín, E. J. (2012). Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1031–1046. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2012.05.001>
- Olle, M., Viršilė, A., Olle, M., & Viršilė, A. (2013). The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. *Agricultural and Food Science*, 22(2), 223–234. <https://doi.org/10.23986/AFSCI.7897>
- Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoo, A., & Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 37(3), 422–443. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.02.010>
- Park, J., & Dinh, T. B. (2019). Contrasting effects of monochromatic LED lighting on growth, pigments and photosynthesis in the commercially important cyanobacterium *Arthrospira maxima*. *Bioresource Technology*, 291, 121846. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121846>
- Park, K.-H., & Lee, C.-G. (2000). Optimization of Algal Photobioreactors Using Flashing Lights. In *Biotechnol. Bioprocess Eng* (Vol. 5).
- Perin, G., Cimetta, E., Monetti, F., Morosinotto, T., & Bezzo, F. (2016). Novel micro-photobioreactor design and monitoring method for assessing microalgae response to light intensity. *Algal Research*, 19, 69–76. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.07.015>

- Peter, A. P., Koyande, A. K., Chew, K. W., Ho, S. H., Chen, W. H., Chang, J. S., Krishnamoorthy, R., Banat, F., & Show, P. L. (2022). Continuous cultivation of microalgae in photobioreactors as a source of renewable energy: Current status and future challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2021.111852>
- Pozzobon, V. (2022). Chlorella vulgaris cultivation under super high light intensity: An application of the flashing light effect. *Algal Research*, 68, 102874. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2022.102874>
- Pruvost, J., Cornet, J.-F., & Pilon, L. (2016). *Large-Scale Production of Algal Biomass: Photobioreactors*. 41–66. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9_3)
- Queiroz Zepka, L., Jacob-Lopes, E., & Roca, M. (2019). Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Current Opinion in Food Science*, 26, 94–100. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2019.04.004>
- Radmer, R., & B Kok. (1977). Photosynthesis: limited yields, unlimited dreams. *BioScience*. <https://academic.oup.com/bioscience/article-abstract/27/9/599/285208>
- Ravelonandro, P. H., Ratianarivo, D. H., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., & Raherimandimby, M. (2011). Improvement of the growth of Arthrospira (Spirulina) platensis from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO<sub>2</sub> addition. *Food and Bioprocess Processing*, 89(3), 209–216. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2010.04.009>
- Rodrigues, D. B., Menezes, C. R., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., & Zepka, L. Q. (2015). Bioactive pigments from microalgae Phormidium autumnale. *Food Research International*, 77, 273–279. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.04.027>
- Saccardo, A., Bezzo, F., & Sforza, E. (2022). Microalgae growth in ultra-thin steady-state continuous photobioreactors: assessing self-shading effects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.977429>
- Schulze, P. S. C., Barreira, L. A., Pereira, H. G. C., Perales, J. A., & Varela, J. C. S. (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in Biotechnology*, 32(8), 422–430. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2014.06.001>

- Schulze, P. S. C., Brindley, C., Fernández, J. M., Rautenberger, R., Pereira, H., Wijffels, R. H., & Kiron, V. (2020). Flashing light does not improve photosynthetic performance and growth of green microalgae. *Bioresource Technology Reports*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100367>
- Schulze, P. S. C., Guerra, R., Pereira, H., Schüler, L. M., & Varela, J. C. S. (2017). Flashing LEDs for Microalgal Production. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 35, Issue 11, pp. 1088–1101). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.07.011>
- Silva, S. C., Ferreira, I. C. F. R., Dias, M. M., & Filomena Barreiro, M. (2020). Microalgae-Derived Pigments: A 10-Year Bibliometric Review and Industry and Market Trend Analysis. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3406, 25(15), 3406. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25153406>
- Simionato, D., Basso, S., Giacometti, G. M., & Morosinotto, T. (2013). Optimization of light use efficiency for biofuel production in algae. *Biophysical Chemistry*, 182, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.06.017>
- Simkin, A. J. (2019). Genetic Engineering for Global Food Security: Photosynthesis and Biofortification. *Plants* 2019, Vol. 8, Page 586, 8(12), 586. <https://doi.org/10.3390/PLANTS8120586>
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, 175(4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.175.4023.720>
- Steiger, S., Schäfer, L., & Sandmann, G. (1999). High-light-dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 52(1–3), 14–18. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(99\)00094-9](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(99)00094-9)
- Stitt, M., & Zhu, X. G. (2014). The large pools of metabolites involved in intercellular metabolite shuttles in C4 photosynthesis provide enormous flexibility and robustness in a fluctuating light environment. *Plant, Cell & Environment*, 37(9), 1985–1988. <https://doi.org/10.1111/PCE.12290>
- Takache, H., Pruvost, J., & Marec, H. (2015). Investigation of light/dark cycles effects on the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in conditions representative of photobioreactor cultivation. *Algal Research*, 8, 192–204. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2015.02.009>

- Takaichi, S. (2011). Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs* 2011, Vol. 9, Pages 1101-1118, 9(6), 1101–1118. <https://doi.org/10.3390/MD9061101>
- Torzillo, G., & Vonshak, A. (2013). Environmental Stress Physiology with Reference to Mass Cultures. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*, 90–113. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.CH6>
- Tredici, M. R. (2010). Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. *Http://Dx.Doi.Org/10.4155/Bfs.09.10*, 1(1), 143–162. <https://doi.org/10.4155/BFS.09.10>
- Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., & León, R. (2015). Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges. *Photosynthesis Research*, 125(3), 423–436. <https://doi.org/10.1007/S11120-015-0149-2>
- Vejrazka, C., Janssen, M., Benvenuti, G., Streefland, M., & Wijffels, R. H. (2013). Photosynthetic efficiency and oxygen evolution of *Chlamydomonas reinhardtii* under continuous and flashing light. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(4), 1523–1532. <https://doi.org/10.1007/S00253-012-4390-8>
- Vejrazka, C., Janssen, M., Streefland, M., & Wijffels, R. H. (2011). Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in flashing light. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12), 2905–2913. <https://doi.org/10.1002/BIT.23270>
- Vejrazka, C., Streefland, M., Wijffels, R. H., & Janssen, M. (2015). The role of an electron pool in algal photosynthesis during sub-second light-dark cycling. *Algal Research*, 12, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.017>
- Vermaas, W., & Fj, W. (2001). *Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria*. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001670>
- Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*.
- 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. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

- Xu, X., Sharma, P., Shu, S., Lin, T.-S., Ciais, P., Tubiello, F. N., Smith, P., Campbell, N., & Jain, A. K. (2021). *Global greenhouse gas emissions from animal-based foods are twice those of plant-based foods*.
- Zaimes, G. G., & Khanna, V. (2013). Microalgal biomass production pathways: Evaluation of life cycle environmental impacts. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-88/TABLES/2>
- Zarmi, Y., Gordon, J. M., Mahulkar, A., Khopkar, A. R., Patil, S. D., Banerjee, A., Reddy, B. G., Griffin, T. P., & Sapre, A. (2020). Enhanced Algal Photosynthetic Photon Efficiency by Pulsed Light. *IScience*, 23(5). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101115>
- Zhou, X., Yuan, S., ... R. C.-J. of R. and, & 2015, undefined. (2015). Sustainable production of energy from microalgae: review of culturing systems, economics, and modelling. *Aip.Scitation.Org*, 7(1), 12701. <https://doi.org/10.1063/1.4906919>
- Zhu, L. (2015). Microalgal culture strategies for biofuel production: A review. In *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* (Vol. 9, Issue 6, pp. 801–814). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/bbb.1576>
- Zhuang, L. L., Wu, Y. H., Espinosa, V. M. D., Zhang, T. Y., Dao, G. H., & Hu, H. Y. (2016). Soluble Algal Products (SAPs) in large scale cultivation of microalgae for biomass/bioenergy production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 59, 141–148. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2015.12.352>