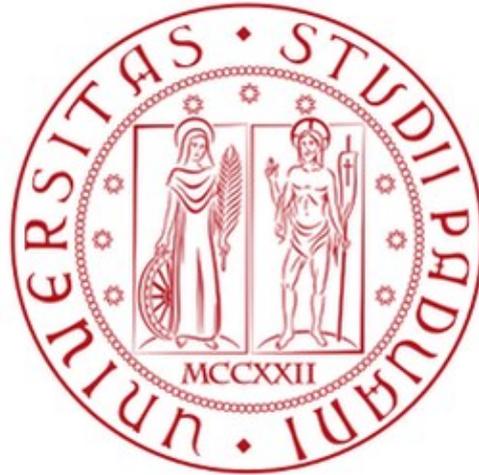


Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



Utilizzo di scarti dell'industria lattiero-casearia per la coltivazione di *Galdieria sulphuraria*: ottimizzazione della resa in reattori continui

Relatore: Prof.ssa Eleonora Sforza
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Correlatore: Leonardo Pattaro
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Controrelatore: Prof.re Tomas Morosinotto
Dipartimento di Biologia – DiBio

Laureando: Nicolò Ostaro

Anno Accademico 2023/2024

| | |
|---|----|
| Abstract | 6 |
| Introduzione | 7 |
| Capitolo 1: Stato dell'arte | 9 |
| 1.1 Presentazione del contesto | 9 |
| 1.2 Microalghe e specie estremofile | 10 |
| 1.2 Meccanismi trofici | 14 |
| 1.2.1 Meccanismo fotoautotrofico | 14 |
| 1.2.2 Metabolismo eterotrofico | 17 |
| 1.2.3 Meccanismo mixotrofico | 19 |
| 1.3 Fattori che influenzano la crescita delle microalghe | 21 |
| 1.3.1 Disponibilità di nutrienti | 21 |
| 1.3.2 Luce | 22 |
| 1.3.3 pH | 24 |
| 1.3.4 Temperatura | 25 |
| 1.4 Strategie per la coltivazione delle microalghe su larga scala | 26 |
| 1.4.1 Batch | 27 |
| 1.4.2 Reattori in continuo | 28 |
| 1.4.3 Sistemi aperti | 31 |
| 1.4.4 Sistemi chiusi | 32 |
| 1.6 <i>Galdieria sulphuraria</i> | 34 |
| 1.6.1 Profilo nutrizionale | 36 |
| 1.7 Scopo della tesi | 39 |
| Capitolo 2: Materiali e Metodi | 40 |
| 2.1 Ceppo algale e condizioni di coltivazione | 40 |
| 2.2 Modalità di coltivazione | 43 |
| 2.2.1 Coltivazione in continuo | 43 |

| | |
|---|----|
| 2.2.1.1 Flat panel | 43 |
| 2.2.1.2 Sistema IDEA | 46 |
| 2.2.4 Coltivazione in batch | 49 |
| 2.3 Monitoraggio della crescita cellulare | 50 |
| 2.3.1 Densità ottica | 50 |
| 2.3.2 Peso secco | 51 |
| 2.4 Bilanci di materia ed energia | 52 |
| 2.5 Altre misure di monitoraggio della crescita | 54 |
| 2.6 Misure analitiche | 54 |
| 2.6.1 Carbonio e Azoto totale | 54 |
| 2.6.2 Analisi dei pigmenti | 55 |
| 2.6.3 Determinazione del contenuto proteico | 56 |
| 2.6.4 Determinazione del contenuto di carboidrati | 58 |
| 2.7 Analisi statistica | 59 |
| Capitolo 3: Risultati | 61 |
| 3.1 Effetto del tempo di permanenza in reattori continui | 61 |
| 3.1.1 Autotrofia | 61 |
| 3.1.2 Mixotrofia | 64 |
| 3.1.3 Confronto dei meccanismi trofici: Autotrofia, Mixotrofia ed Eterotrofia | 66 |
| 3.1.4 Analisi comparativa del contenuto di clorofilla nei tre meccanismi trofici | 69 |
| 3.1.5 Analisi comparativa del contenuto di carotenoidi nei tre meccanismi trofici | 71 |
| 3.1.6 Analisi comparativa del contenuto di pigmenti nei tre meccanismi trofici | 74 |
| 3.2 Effetto del pH in ingresso | 75 |

| | |
|---|-----|
| 3.3 Effetto della concentrazione di Carbonio organico | 81 |
| 3.4 Effetto della tipologia di substrato | 87 |
| 3.5 Mixotrofia: effetto del rapporto tra luce e carbonio organico | 91 |
| 3.5.1 Analisi comparativa del contenuto di pigmenti in funzione del rapporto luce/carbonio organico | 96 |
| 3.6 Esperimenti in batch | 101 |
| 4. Conclusioni | 105 |
| 5. Bibliografia | 108 |

Abstract

In un contesto globale caratterizzato da sfide crescenti come la crisi climatica, la sicurezza alimentare e la scarsità di risorse naturali, le microalghe emergono come una risorsa strategica per la transizione verso sistemi produttivi più sostenibili. Questo studio esplora il potenziale biotecnologico di *Galdieria sulphuraria*, un'alga estremofila nota per la sua versatilità metabolica e adattabilità a condizioni estreme. Attraverso coltivazioni in sistemi in continuo, sono state analizzate diverse modalità trofiche (fotoautotrofia, eterotrofia e mixotrofia) per ottimizzare la produttività della biomassa e la qualità dei prodotti. Rispetto al regime eterotrofico, l'influenza di variabili operative come il pH in ingresso, la disponibilità e la fonte di carbonio organico sono state investigate. Tale studio ha individuato l'esistenza di livelli ottimali di lavoro, valutati sulla base di indici di prestazione quali la concentrazione e produttività di biomassa, nonché dalle rese di consumo di substrato. L'impiego di sottoprodotti dell'industria casearia, come il permeato del latte, ha permesso di confermare l'elevata flessibilità metabolica della specie, nonché di aprire la strada verso la possibile implementazione di processi microalgali per la valorizzazione di scarti industriali. Relativamente alla mixotrofia infine, uno studio preliminare condotto a diversi tempi di permanenza parallelamente con autotrofia ed eterotrofia, ha evidenziato come elevate disponibilità di carbonio inibiscano la produzione di pigmenti: a tal scopo, è stato investigato l'effetto combinato di carbonio organico e luce incidente per stimolare l'effetto sinergico di fotosintesi e respirazione cellulare, ricercando variazioni significative in produttività di biomassa e produzione di pigmenti.

Introduzione

Il mondo si trova oggi ad affrontare sfide globali complesse, come la crisi climatica, la crescita demografica e la scarsità di risorse naturali, fra cui acqua e cibo. Con la popolazione mondiale destinata a raggiungere i 9,5 miliardi entro il 2050, risulta essere di fondamentale importanza sviluppare soluzioni sostenibili per garantire la sicurezza alimentare e mitigare la malnutrizione. Secondo la *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), la produzione alimentare dovrà aumentare del 70% entro tale data per soddisfare la domanda globale. Un tale incremento produttivo, se basato su pratiche agricole tradizionali, comporta rischi significativi: deforestazione, erosione del suolo, perdita di biodiversità e aumento delle emissioni di gas serra. L'adozione di metodi innovativi diventa quindi indispensabile per minimizzare l'impatto ambientale. In questo contesto le microalghe stanno emergendo come una valida soluzione alternativa grazie alla loro alta produttività, ricchezza di nutrienti e capacità di crescita in condizioni inospitali (ad es. terreni non coltivabili o acque reflue), senza competere con le coltivazioni agricole tradizionali. Con una fotosintesi altamente efficiente, le microalghe offrono una resa per ettaro molto superiore rispetto alle colture tradizionali. Inoltre, esse possono essere coltivate in modo sostenibile utilizzando risorse naturali abbondanti come luce solare e CO₂, contribuendo a ridurre le emissioni di gas serra. Le microalghe rappresentano peraltro, dal punto di vista nutrizionale, una fonte proteica competitiva ricca di aminoacidi essenziali, in grado di sostituire le proteine animali e di fornire acidi grassi omega-3 e omega-6 e pigmenti bioattivi con benefici per la salute umana. Infine, a differenza delle colture terrestri, possono essere raccolte quotidianamente, assicurando una produzione costante tutto l'anno. Nonostante le enormi potenzialità elencate, la produzione industriale di microalghe su larga scala deve ancora superare alcune sfide tecniche ed economiche. Attualmente la coltivazione di microalghe in Europa è limitata ad impianti di piccola scala a causa di costi elevati sia per le infrastrutture che per le operazioni. Per competere efficacemente con le tradizionali fonti alimentari, è necessario sviluppare tecnologie che riducano i costi di produzione e migliorino l'efficienza dei sistemi di coltivazione, rendendo le microalghe una risorsa più accessibile su scala globale. Per ottenere maggiori produttività di biomassa esistono alternative al

metabolismo fotoautotrofico, come l'eterotrofia, che prevede l'uso di substrati organici come fonte energetica, e la mixotrofia, che combina entrambi i metabolismi. Le specie coltivate in regimi eterotrofici e mixotrofici offrono vantaggi significativi in termini di produttività e sostenibilità, consentendo di ottenere biomassa ad un costo inferiore. Inoltre, l'impiego di scarti industriali come sostituti di substrati organici più costosi contribuisce a rendere il processo ancora più economico. In particolare, l'uso delle specie estremofile permette di ridurre il rischio di contaminazione legato all'uso di substrati organici. Il presente lavoro pone, come argomento di discussione, la coltivazione dell'alga estremofila *Galdieria sulphuraria* allo scopo di ottimizzare la produzione in regime eterotrofico e mixotrofico, con valutazioni sperimentali di crescita in sistemi batch e continui. In relazione a quest'ultima configurazione, sono stati analizzati gli effetti di alcune variabili operative, come la disponibilità e la natura della fonte di carbonio organico in eterotrofia, e dell'intensità luminosa in mixotrofia per definire le condizioni ottimali per una soddisfacente produzione di biomassa, valutando tali risultati mediante le rese del processo. La tesi è articolata in tre capitoli: nel primo capitolo, si offre una panoramica su microalghe, con un approfondimento sul settore alimentare e sui sistemi di coltivazione (batch e continui, aperti e chiusi). Nel secondo capitolo sono descritti i materiali e le metodologie adottate e l'approccio statistico per l'elaborazione dei dati. Nell'ultimo capitolo sono presentati e discussi i risultati della campagna sperimentale.

Capitolo 1: Stato dell'arte

Questo capitolo fornisce una panoramica introduttiva sulle microalghe, concentrandosi sulle loro caratteristiche biologiche e potenzialità applicative. Inoltre, vengono descritti i principali metodi di coltivazione, suddividendoli in sistemi aperti e chiusi, ed inoltre in sistemi batch e in continuo.

1.1 Presentazione del contesto

Di fronte alle sfide imposte dal cambiamento climatico, dalla crescente domanda di risorse e dalle limitate disponibilità naturali, la diversificazione delle fonti di produzione alimentare e mangimistica rappresenta una necessità urgente per garantire la sicurezza alimentare a lungo termine (FAO 2021). La pressione su tali risorse è ulteriormente aggravata dalla continua crescita della popolazione globale: dal 1960, la popolazione mondiale è aumentata del 167%, e si stima che entro il 2050 raggiungerà presumibilmente i 10 miliardi di abitanti, con conseguente aumento della domanda alimentare e proteica (United Nations 2022). Secondo l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO), il consumo globale di proteine animali dovrebbe incrementarsi del 14% entro il 2030 rispetto alla media del periodo 2018-2020, evidenziando così la necessità di esplorare fonti proteiche alternative che possano alleggerire la pressione sui sistemi di produzione animale (OECD-FAO 2021). Un'altra considerazione fondamentale è l'impronta ambientale associata alla produzione intensiva di carne e prodotti di origine animale, che contribuisce significativamente alle emissioni di gas serra (GHG) e all'uso intensivo di risorse idriche e territoriali (OECD-FAO 2021). Le emissioni derivanti dal settore zootecnico rappresentano circa il 54% delle emissioni agricole totali a livello globale, con proiezioni di crescita nei prossimi anni (Xu et al. 2021). Inoltre, la produzione di carne bovina richiede un consumo medio di acqua di circa 15.400 L/kg, un valore non sostenibile in un contesto di crescente scarsità idrica e degrado ambientale (Mekonnen and Hoekstra 2010). Le criticità ambientali legate alla zootecnia spingono verso l'adozione di alternative alimentari più sostenibili e a basso impatto ambientale, come le proteine di origine vegetale e microalgale, che necessitano di un uso ridotto di risorse naturali e

generano emissioni di carbonio inferiori rispetto a quelle animali (FAO 2022). A tale scenario si aggiunge il tema della malnutrizione, che rappresenta una delle maggiori sfide sanitarie globali. Secondo l'OMS, nel 2023 circa 148 milioni di bambini sotto i cinque anni soffrivano di ritardo della crescita (*stunting*), 45 milioni di deperimento (*wasting*) e 37 milioni di sovrappeso, indicando un'ampia gamma di problemi nutrizionali (UNICEF et al., 2023; European Parliament). Tra le varie fonti proteiche alternative, le microalghe emergono come una risorsa preziosa e sostenibile, con il vantaggio di poter essere coltivate in ambienti estremi, riducendo così la competizione con le colture tradizionali per risorse quali il suolo e l'acqua (Richmond e Hu, 2013). Le microalghe offrono un'alternativa sostenibile e nutrizionalmente valida per la sicurezza alimentare globale, ma possono promuovere una visione di economia circolare attraverso il riutilizzo degli scarti e la riduzione delle emissioni, rappresentando così una soluzione integrata per affrontare le sfide della crescente domanda di cibo e le limitazioni delle risorse naturali (FAO, 2021; Mata et al., 2010).

1.2 Microalghe e specie estremofile

Le microalghe sono microrganismi unicellulari fotosintetici, sia eucarioti che procarioti, caratterizzati da una notevole biodiversità e diffusi in numerosi ecosistemi, dalle acque salate a quelle dolci. Le microalghe variano in dimensione da pochi micrometri a diversi millimetri e comprendono gruppi come alghe verdi, dorate, rosse, brune e diatomee, appartenenti rispettivamente alle classi *Chlorophyceae*, *Chrysophyceae*, *Rhodophyceae*, *Phaeophyceae* e *Bacillariophyceae* (Zuccaro et al. 2020). Le microalghe possiedono una straordinaria capacità di adattamento, che consente loro di prosperare in ambienti estremi come acque salmastre, sorgenti termali e terreni aridi o inquinati (Arsad et al. 2022; Malavasi et al., 2020). Questa capacità adattativa è evidente nelle specie termoacidofile come *Galdieria sulphuraria*, *Cyanidium caldarium*, *Dunaliella acidophilum* e *Cyanidioschyzon merolae*, le quali non solo possono sopravvivere a temperature elevate, ma sono anche in grado di crescere a pH estremamente bassi, talvolta inferiori a 2 (Hwan et al. 2006; Merola et al. 1981).

Grazie alla loro capacità di convertire la luce solare in energia chimica, le microalghe contribuiscono alla produzione del 50% dell'ossigeno terrestre (Khan et al., 2018; Reza-Solis et al. 2023). L'efficienza fotosintetica delle microalghe può raggiungere il 30% in condizioni ottimali, permettendo una conversione efficace dell'energia luminosa in biomassa ricca di composti bioattivi (Khan et al. 2018). Questa caratteristica le rende una risorsa preziosa e sostenibile per l'industria alimentare, grazie al loro straordinario profilo nutrizionale. Un motivo principale dell'interesse industriale risiede nell'elevato contenuto proteico delle microalghe, che in alcune specie supera quello di molte fonti proteiche vegetali tradizionali (Becker 2004). Per esempio, *Arthrospira maxima* può raggiungere livelli di proteine comparabili o addirittura superiori a quelli del riso e di altri alimenti, rendendola un'opzione valida per sostituire le proteine convenzionali (Becker 2007; Chacón-Lee et al., 2010).

Tabella 1.1 Contenuto proteico, espresso come percentuale di sostanza secca, di differenti specie microalgali e alimenti (Janssen et al., 2022; Canelli et al. 2023; Layman et al., 2009; Jiang et al. 2008; Sekhar et al., 1982; Samicho et al. 2013).

| Fonte proteica | Contenuto proteico % |
|------------------------------|-----------------------------|
| <i>Arthrospira maxima</i> | 56-77 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 30-46 |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | 50-55 |
| <i>Galdieria sulphuraria</i> | 51-64 |
| Uova | 45-50 |
| Frumento | 16,67 |
| Riso | 7-8 |
| Manzo | 75-85 |

Le proteine delle microalghe forniscono un profilo amminoacidico completo, contenendo tutti gli amminoacidi essenziali necessari per l'organismo umano, il che le rende comparabili alle proteine di origine animale. Questa caratteristica le rende ideali per l'inclusione in mangimi per animali e integratori alimentari per l'uomo, soprattutto in contesti dove la disponibilità di proteine è limitata (Barkia et al., 2019; Batista et al. 2013)

Tabella 1.2 Valori amminoacidici raccomandati dalla World Health Organization (WHO) e dalla Food and Agriculture Organization (FAO) rispetto al profilo amminoacidico delle proteine microalgali e di alcuni alimenti convenzionali. (Chacón-Lee et al., 2010). (a) Valori espressi come mg/kg al giorno (WHO et al., 2007). (b) Valori espressi come g/100g di proteine (Becker 2007). (c) Valori espressi come g/100g di proteine (Chacón-Lee et al., 2010). (d) Valori espressi come g/100g di proteine (Samicho et al. 2013). Gli amminoacidi in corsivo sono gli amminoacidi essenziali.

| Amminoacido | WHO FAO | <i>Spirulina platensis</i> | <i>Arthrospira maxima</i> | <i>Chlorella vulgaris</i> | Uovo intero | Frumento | Bistecca di manzo |
|---------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|
| <i>Isoleucina</i> | 20 _a | 6,7 _b | 6,0 _b | 3,8 _b | 5,80 _c | 3,80 _c | 0,976 _d |
| <i>Leucina</i> | 39 _a | 9,8 _b | 8,0 _b | 8,8 _b | 9,0 _c | 6,40 _c | 1,500 _d |
| <i>Valina</i> | 26 _a | 7,1 _b | 6,5 _b | 5,5 _b | 7,20 _c | 4,30 _c | 0,898 _d |
| <i>Lisina</i> | 30 _a | 4,8 _b | 4,6 _b | 8,4 _b | 6,70 _c | 2,70 _c | 1,573 _d |
| <i>Fenilalanina</i> | 25 _a | 5,3 _b | 4,9 _b | 5,0 _b | 5,30 _c | 4,60 _c | 1,549 _d |
| <i>Metionina</i> | 10,4 _a | 2,5 _b | 1,4 _b | 2,2 _b | 3,0 _c | 1,60 _c | 0,576 _d |
| <i>Triptofano</i> | 4 _a | 0,3 _b | 1,4 _b | 2,1 _b | 5,30 _c | - | - |
| <i>Istidina</i> | 10 _a | 2,2 _b | 1,8 _b | 2,0 _b | 2,60 _c | 2,10 _c | 0,595 _d |
| <i>Treonina</i> | 15 _a | 6,2 _b | 4,6 _b | 4,8 _b | 5,30 _c | 2,90 _c | 1,086 _d |
| Tirosina | 25 _a | 5,3 _b | 3,9 _b | 3,4 _b | 4,30 _c | 3,20 _c | 0,876 _d |
| Cisteina | 4,1 _a | 0,9 _b | 0,4 _b | 1,4 _b | 2,10 _c | 2,10 _c | 0,808 _d |
| Alanina | | 9,5 _b | 6,8 _b | 7,9 _b | - | 3,40 _c | 1,048 _d |
| Arginina | | 7,3 _b | 6,5 _b | 6,4 _b | 6,40 _c | 4,30 _c | 1,583 _d |
| Asparagina | | 11,8 _b | 8,6 _b | 9,0 _b | 10,70 _c | 5,0 _c | 1,334 _d |
| Acido glutammico | | 10,3 _b | 12,6 _b | 11,6 _b | 12,30 _c | 27,70 _c | 1,333 _d |
| Glicina | | 5,7 _b | 4,8 _b | 5,8 _b | 3,80 _c | 3,80 _c | 0,734 _d |
| Prolina | | 4,2 _b | 3,9 _b | 4,8 _b | 4,30 _c | 10,10 _c | 0,644 _d |
| Serina | | 5,1 _b | 4,2 _b | 4,1 _b | 7,70 _c | 4,80 _c | 0,877 _d |

Le microalghe rappresentano una fonte preziosa non solo di proteine, ma anche di carboidrati complessi, comprendenti zuccheri semplici, amidi e polisaccaridi come alginati e carragenani. Questi polisaccaridi forniscono energia e agiscono come

prebiotici, favorendo la salute del microbioma intestinale umano e animale (Becker 2004; Pina-Pérez et al. 2017). Rispetto alle fonti vegetali tradizionali di carboidrati, le microalghe offrono benefici specifici per l'alimentazione funzionale. Un altro elemento di rilievo è il contenuto lipidico, ricco di acidi grassi essenziali, in particolare omega-3 e omega-6. Questi acidi grassi polinsaturi (PUFA), noti per i benefici sulla salute cardiovascolare e nello sviluppo cognitivo, sono generalmente scarsi nei vegetali terrestri (Arienti 2016). Le microalghe sono ricche anche di vitamine idrosolubili e liposolubili, come le vitamine B12, e la provitamina A (β -carotene), rappresentando una valida integrazione per diete vegetariane e vegane, dove la vitamina B12, presente quasi esclusivamente in alimenti di origine animale, è spesso carente. Alcune specie, come *Arthrospira* e *Chlorella*, sono in grado di sintetizzare questa vitamina, fornendo una fonte naturale e sostenibile di nutrienti essenziali (Gouveia 2008; Koyande et al. 2019). Dal punto di vista nutraceutico, le microalghe contengono anche pigmenti bioattivi come carotenoidi, clorofille e ficobiliproteine, che non solo giocano un ruolo nella fotosintesi, ma offrono anche proprietà antiossidanti. Per esempio, *Dunaliella salina* può produrre elevate quantità di β -carotene, una provitamina A che potrebbe integrare o sostituire fonti terrestri come carote e pomodori (Koyande et al. 2019). Questi pigmenti sono utilizzati anche nell'industria farmaceutica e cosmetica per le loro proprietà antiossidanti e fotoprotettive, rendendoli un ingrediente prezioso per alimenti nutraceutici e integratori (Grossmann et al., 2020). Grazie a queste caratteristiche, le microalghe rappresentano una risorsa versatile e sostenibile, capace di rispondere alla crescente domanda di fonti alimentari alternative. Oltre alla produzione alimentare, i composti bioattivi delle microalghe trovano applicazione anche nei settori degli integratori alimentari, della cosmetica e della farmaceutica (Milledge 2011). Le microalghe estremofile come *Galdieria sulphuraria*, oltre ad offrire un'alternativa nutrizionalmente valida e sostenibile per la sicurezza alimentare globale, risultano un interessante fonte di produrre estremozimi ed estremoliti (Malavasi et al. 2020). Inoltre, possono promuovere un'economia circolare grazie al riutilizzo degli scarti industriali (Di Cicco et al. 2021; Henkanatte-Gedera et al. 2017; Scherhag and Ackermann 2021). Queste specie possono essere coltivate in terreni sterili o in acque reflue, rendendole una risorsa sostenibile per la produzione di alimenti, mangimi e bioprodotto contribuendo alla

transizione verso un'economia a basse emissioni di carbonio (Abreu et al. 2022; Di Cicco et al. 2021; Vázquez-Romero et al. 2022).

1.2 Meccanismi trofici

Le microalghe rappresentano organismi fotosintetici altamente versatili, in grado di adattarsi a una varietà di ambienti mediante l'impiego di differenti percorsi metabolici per la loro crescita. Oltre alla fotosintesi tradizionale, alcune specie di microalghe sono capaci di svilupparsi in condizioni eterotrofiche, sfruttando fonti di carbonio organico come fonte di energia e carbonio, o in condizioni mixotrofiche, integrando l'assorbimento di luce con l'utilizzo di composti organici. Questa flessibilità metabolica conferisce alle microalghe un elevato potenziale per molteplici applicazioni industriali. I dettagli riguardanti ciascun tipo di metabolismo saranno analizzati nei sottoparagrafi successivi.

1.2.1 Meccanismo fotoautotrofico

La fotoautotrofia, o più semplicemente autotrofia, è un processo chiave per la crescita delle microalghe, in cui queste utilizzano la luce come fonte di energia e la CO₂ come fonte di carbonio per produrre composti organici attraverso la fotosintesi ossigenica. Le microalghe fotoautotrofe convertono l'energia luminosa in adenosina trifosfato (ATP) e nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH₂) tramite le reazioni dipendenti dalla luce, e aventi luogo nelle membrane tilacoidali. Mentre nella successiva fase oscura, grazie all'impiego dei prodotti energetici, quali NADPH₂ e ATP, avviene la fissazione dell'anidride carbonica. Questo processo prende il nome di ciclo di Calvin – Benson, che mediante l'impiego dell'enzima RuBisCO è in grado di fissare la CO₂ e sintetizzare glucosio (Jurić et al. 2013; Masojídek et al., 2013). Questo zucchero è la base per numerosi percorsi metabolici che portano alla produzione di proteine, lipidi e carboidrati, composti vitali per la crescita e lo sviluppo cellulare (Lari and Khosravitar 2021). La “cattura” dei fotoni, che compongono la radiazione luminosa, non potrebbe avvenire senza la presenza di cromofori in grado di assorbirli. Tra i pigmenti, sicuramente il più noto è la clorofilla a, che è associata a delle proteine in modo da formare dei macro-

complessi noti come fotosistemi (Jurić et al. 2013). Ad ausilio dei fotosistemi vi sono presenti anche dei complessi di pigmenti accessori, quali i carotenoidi, che sono utili nella protezione dell'apparato fotosintetico dall'eccesso di radiazione luminosa incidente, evitando la sovrapproduzione e l'accumulo di O₂ e di derivati radicalici di questo, noti come ROS (*Reactive Oxygen Species*) e proteine a formare i *Light Harvesting Complexes* (LHCs). (Edge et al., 1997; Rock 1997). Tra quest'ultime, troviamo le ficobiliproteine, che svolgono un ruolo nei processi di assorbimento della luce, in quanto aumentano significativamente l'area di assorbimento dei fotoni (D'Alessandro et al., 2016).

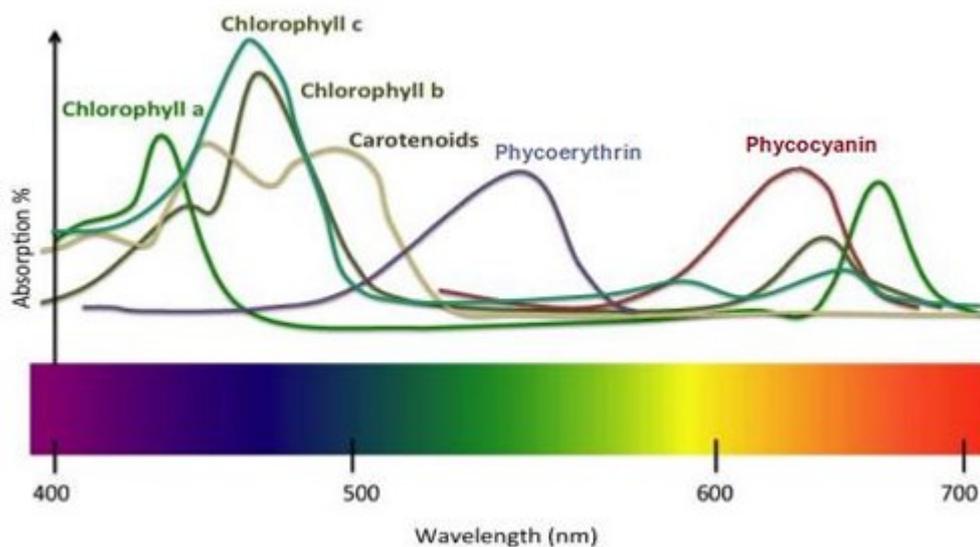


Figura 1.1 Spettro di assorbimento nel PAR di diversi pigmenti presenti nelle microalghe.

Le radiazioni elettromagnetiche nel visibile, con λ compresa tra 400 e 750 nm sono capaci di innescare il processo fotosintetico e, per questo, sono dette *Photosynthetically Active Radiations* (PAR). I diversi pigmenti, infatti, assorbono specifiche lunghezze d'onda nel visibile: le clorofille hanno dei massimi di assorbimento nel blu e nel rosso, i carotenoidi assorbono nel blu e le ficobiline assorbono tra il verde e il rosso (500-650 nm) (Pagels et al. 2020). Uno dei principali vantaggi della coltivazione autotrofa del metabolismo fotoautotrofico è la capacità di catturare e fissare CO₂ atmosferica, contribuendo così alla riduzione dei gas serra. Inoltre, tramite questo metodo la CO₂ viene convertita in prodotti della fotosintesi, come proteine e lipidi. In aggiunta, questo meccanismo trofico presenta un basso rischio di contaminazione da batteri eterotrofi, rendendo la

coltivazione autotrofa particolarmente adatta per grandi impianti all'aperto, come gli open ponds (Daneshvar et al. 2021; Vale et al. 2020). Tuttavia, questo tipo di coltivazione presenta sfide significative, in particolare la dipendenza dalla luce solare: infatti, nelle colture ad alta densità spesso viene riscontrato il fenomeno dell'auto-ombreggiamento, col quale si osserva una ridotta efficienza fotosintetica da parte delle cellule situate nelle aree più interne dei fotobioreattori, a causa di un'esposizione non ottimale alla luce (Abreu et al. 2022). Questo porta a un rallentamento della crescita della biomassa e limita la produttività complessiva. Anche la gestione della CO₂ è critica, poiché la CO₂ disciolta può comprendere meno di 1 mg L⁻¹ del carbonio inorganico disciolto totale quando il mezzo è in equilibrio con l'atmosfera (Daneshvar et al. 2022). Data la sua bassa solubilità della CO₂ nel mezzo di coltura, questo ne limita l'efficienza di assorbimento da parte delle alghe. Tuttavia, non vi si può fare unicamente affidamento sulla CO₂ atmosferica, dato il fatto che nell'atmosfera è presente circa lo 0,039% di anidride carbonica in volume (Kumar et al. 2010). Vi sono dunque necessari meccanismi per concentrare la CO₂ all'interno del mezzo di coltura, tra cui ricorrere all'utilizzo di elevati volumi di CO₂ generata da processi industriali o l'impiego ausiliare di altre fonti di carbonio inorganico, quali il bicarbonato (Abreu et al. 2022). Tuttavia, vi è da considerare che l'impiego di queste fonti supplementari di carbonio inorganico possono rappresentare fino al 50% dei costi totali di produzione della biomassa (Chisti 2013). Infine, nella coltivazione autotrofa, uno degli aspetti critici è la gestione dell'illuminazione, elemento essenziale per sostenere la crescita cellulare e la fotosintesi. L'impiego della luce solare rappresenta un'opzione vantaggiosa poiché è una risorsa naturale, gratuita e abbondante. Tuttavia, nel caso in cui vi si faccia affidamento sulla illuminazione naturale, questo tipo di metabolismo pone limiti alla produttività di biomassa microalgale. Infatti, durante la notte, i composti accumulati durante la fase diurna vengono consumati per ottenere energia (Abiusi et al., 2020). Inoltre, le inevitabili variazioni climatiche e le fluttuazioni stagionali possono compromettere la produttività, causando una riduzione della resa durante i periodi di scarsa illuminazione (Maltsev et al. 2021). Per ovviare a tali limitazioni, l'illuminazione artificiale offre un'alternativa che garantisce una fonte luminosa costante e controllabile. Ciò consente di mantenere elevati livelli di fotosintesi e di crescita anche in assenza di luce naturale. Tuttavia, l'adozione di luce artificiale

La respirazione cellulare nelle microalghe segue differenti percorsi metabolici in base al substrato disponibile. Il glucosio viene metabolizzato grazie all'enzima glucosio deidrogenasi, che ne avvia la trasformazione in assenza di fosforilazione (Baalán et al., 1973). Il glicerolo, invece, viene prima fosforilato a glicerofosfato con ATP e poi convertito in trioso fosfato, seguendo vie enzimatiche che lo trasformano in gliceraldeide-3-fosfato e glicerato (Perez-Garcia et al. 2011). Il lattato è ossidato a piruvato mediante l'enzima d-lattato deidrogenasi, mentre l'acetato è convertito in acetil-CoA con consumo di ATP (Gruber et al., 1974; Perez-Garcia et al. 2011). Questi substrati sono poi processati principalmente attraverso la via del pentoso fosfato (PPP) e il percorso Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Morales-Sánchez et al. 2015). Il PPP è particolarmente significativo, poiché enzimi comuni a questo e al ciclo di Calvin consentono una regolazione coordinata tra il metabolismo del carbonio e la fissazione fotosintetica di CO₂ anche in condizioni di buio (Abreu et al., 2022). Nel metabolismo dell'acetato, il ciclo del gliossilato e il ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA) generano intermedi di carbonio, ATP e NADH, con il ciclo del gliossilato che utilizza specifici enzimi, quali malato sintasi e isocitrato liasi (Morales-Sánchez et al. 2015). Durante la crescita in assenza di luce, l'attività mitocondriale del ciclo TCA e del trasporto di elettroni assicura l'efficienza respiratoria, analogamente a quanto avviene nelle piante superiori (Baalán et al., 1973). Tuttavia, non tutte le specie possono sfruttare questo metabolismo: tra le più studiate in condizioni eterotrofe c'è il genere *Chlorella* la produttività di biomassa eterotrofa in glucosio può essere fino a 27 volte superiore a quella autotrofa (Han et al. 2012) e *Dunaliella sp.* in quanto cresce con molti substrati organici diversi (Abreu et al. 2022; Ruiz et al. 2022). Attualmente, gli zuccheri come il glucosio e il saccarosio sono i principali substrati organici impiegati nella fermentazione delle microalghe (H. Jin et al. 2021). Tuttavia, l'uso di questi zuccheri può comportare costi elevati e impatti sulla sostenibilità del processo, in quanto derivano da colture terrestri, che competono con l'industria alimentare (Barbosa et al. 2023). Per questo motivo, è cruciale sostituirli con substrati organici più economici e a minore impatto ambientale, come gli zuccheri di scarto (H. Jin et al. 2021). Dal punto di vista economico, la coltivazione eterotrofa risulta più vantaggiosa rispetto a quella autotrofa, perché non dipende dalla luce come fonte di energia primaria. Questo permette l'utilizzo di fermentatori comuni

come bioreattori, senza dover ricorrere a fotobioreattori complessi (Perez-Garcia et al. 2011). Inoltre, l'assenza di illuminazione riduce i consumi energetici, eliminando la necessità di illuminazione artificiale, e semplifica il design dei bioreattori, poiché non è più richiesto un elevato rapporto superficie/volume (Abreu et al. 2022). Un ulteriore vantaggio è l'assenza del fenomeno di auto-ombreggiamento tra le cellule, che consente di ottenere densità cellulari notevolmente elevate (H. Jin et al. 2021). Le colture eterotrofe, infatti, mostrano tassi di crescita generalmente superiori, con un aumento significativo della produttività di biomassa (Tocca et al. 2024; Ruiz et al. 2022). Tuttavia, questa modalità presenta alcune sfide, tra cui l'alto rischio di contaminazione microbica dovuto alla presenza di substrati organici, che favoriscono la crescita di batteri e funghi concorrenti. Per evitare questo problema, è necessario mantenere condizioni axeniche, richiedendo una rigorosa sterilizzazione di bioreattori, gas e substrati (Di Caprio et al. 2019). Altri problemi specifici includono la quasi totale perdita dei pigmenti fotosintetici e l'effetto inibitorio di elevate concentrazioni di substrati organici sulla crescita (Ruiz et al. 2022). Per questi motivi, la coltivazione eterotrofa risulta più vantaggiosa per la produzione di grandi quantità di biomassa in tempi ridotti, raggiungendo concentrazioni superiori ai 100g L^{-1} (Bumbak et al. 2011; Jin et al. 2021) e costi di produzione stimati intorno a $1,08\text{ € kg}^{-1}$ di peso secco (Ruiz et al. 2022), contro i 4.5 € kg^{-1} di biomassa secca ottenuta in autotrofia (Tredici et al. 2016; (Fernández et al., 2019).

1.2.3 Meccanismo mixotrofico

Il meccanismo di crescita mixotrofico permette infine di combinare il metabolismo autotrofo ed eterotrofo. In questo sistema, le specie sono in grado di assimilare simultaneamente CO_2 e carbonio organico esogeno, tramite un'azione sinergica di meccanismo fotosintetico e respirativo, rispettivamente. In maniera completamente analoga all'eterotrofia, anche nella mixotrofia la luce non rappresenta il principale fattore limitante, in quanto le microalghe possono crescere utilizzando anche il carbonio organico. Tuttavia, a differenza dell'eterotrofia, l'utilizzo combinato della luce permette di mantenere la biosintesi di prodotti fotosintetici, come i pigmenti e i carotenoidi, che sono di grande valore commerciale (Daneshvar et al. 2021; Lari

and Khosravitar 2021). Uno degli aspetti più vantaggiosi della mixotrofia è la possibilità di ottenere una crescita cellulare rapida e una maggiore produzione di biomassa rispetto ai modelli trofici puramente autotrofi o eterotrofi. Tuttavia, per alcune specie, si osserva una produttività superiore rispetto ai singoli meccanismi autotrofi ed eterotrofi, mentre per altre questa differenza non risulta altrettanto significativa (Abreu et al. 2022). Nella coltivazione mixotrofica, il fabbisogno di luce è ridotto rispetto alla crescita fotoautotrofa, poiché l'alga può sopperire alla fotosintesi con il metabolismo eterotrofico (Daneshvar et al. 2021). Inoltre, ciò rende il processo meno dipendente dalle fluttuazioni ambientali della luce, migliorando la flessibilità e l'efficienza produttiva del sistema (Abreu et al. 2022). La coesistenza dei processi respiratori e fotosintetici in condizioni mixotrofe, resa possibile dalla presenza di strutture dedicate a entrambi i metabolismi, genera un equilibrio dinamico interno alla cellula: la CO₂ prodotta dalla respirazione viene utilizzata nella fotosintesi, mentre l'ossigeno generato dalla fotosintesi viene consumato dalla respirazione, riducendo così la necessità di fornire CO₂ o ossigeno dall'esterno (Abiusi et al., 2020). Questo ciclo interno di gas rende la coltivazione mixotrofa un processo quasi a bilancio neutro di carbonio, riducendo le emissioni di CO₂ rispetto ai modelli eterotrofi, dove fino al 60% del carbonio organico può essere perso sotto forma di CO₂ (Abiusi et al. 2020; Abreu et al. 2022). Nel complesso, tuttavia, si osserva una produzione netta di CO₂, poiché il quantitativo generato supera quello consumato durante la fotosintesi (Abreu et al. 2022). Questo fenomeno è anche una delle ragioni per cui nelle colture mixotrofiche si registra un abbassamento del pH (Candido et al., 2020). Tuttavia, non tutte le specie di microalghe sono capaci di crescita mixotrofa, inoltre la gestione delle condizioni di crescita in mixotrofia richiede un attento bilanciamento tra la disponibilità di luce e di carbonio organico (Abiusi et al. 2020). Un'eccessiva concentrazione di substrati organici o un'intensità luminosa troppo elevata possono causare fotoinibizione o inibizione della respirazione, riducendo l'efficienza del processo (Kong et al. 2020). Studi recenti hanno anche proposto una forma particolare di mixotrofia, nota come "fotoeterotrofia", in cui il metabolismo cellulare si adatta in base alla disponibilità di carbonio organico e luce, passando dall'autotrofia all'eterotrofia a seconda delle condizioni ambientali (Abiusi et al. 2020; Daneshvar et al. 2021; Mondal et al. 2017). Grazie alla flessibilità metabolica e alla maggiore

resa di biomassa, questo approccio offre un enorme potenziale per applicazioni industriali, quali la produzione di biocarburanti e prodotti nutraceutici, oltre che per il trattamento delle acque reflue (Daneshvar et al. 2021; Khan et al. 2022; Khan et al., 2018).

1.3 Fattori che influenzano la crescita delle microalghe

1.3.1 *Disponibilità di nutrienti*

Le microalghe necessitano di una vasta gamma di nutrienti per svolgere i loro processi metabolici, che possono essere suddivisi in macronutrienti e micronutrienti in base alle quantità richieste. Inoltre, è necessario che questi siano in quantità sufficienti e in forme chimicamente accessibili per le microalghe (Daneshvar et al. 2021). Tra i macronutrienti essenziali vi sono il carbonio (C), l'azoto (N) e il fosforo (P), che giocano un ruolo cruciale nella crescita e nello sviluppo delle microalghe.

Il carbonio è il principale componente della biomassa, rappresentando fino al 65% del peso secco delle alghe (Markou et al., 2014). Esso è fondamentale per la fotosintesi, durante la quale viene assimilato sotto forma di CO_2 , carbonato o bicarbonato per la coltivazione autotrofa, mentre in condizioni eterotrofe viene assorbito sotto forma di substrati organici come glucosio o acetato (Mohsenpour et al. 2021; Zuccaro et al. 2020). La disponibilità di carbonio inorganico nell'acqua è influenzata da fattori come pH e temperatura, che determinano la forma in cui il carbonio si presenta (CO_2 , HCO_3^- o CO_3^{2-}) (Juneja et al., 2013). Dall'altra parte, principali modi di assorbimento del carbonio organico nelle cellule sono la diffusione, il trasporto attivo e la fosforilazione (Perez-Garcia et al. 2011)

L'azoto, che costituisce circa il 7-11% del peso secco delle microalghe, è un altro elemento fondamentale, essenziale per la sintesi di proteine, acidi nucleici (DNA, RNA), amminoacidi e pigmenti fotosintetici come la clorofilla (Markou et al. 2014). L'azoto può essere fornito alle colture di microalghe in diverse forme, sia inorganiche (nitrati, nitriti e ammonio) che organiche (urea, amminoacidi), a seconda del tipo di specie algale e delle condizioni di crescita (Ravindran et al. 2016; Richmond 2004). In generale si è evidenziato l'ordine in cui le microalghe preferiscono utilizzare l'azoto inorganico è $\text{NH}_4^+ > \text{NO}_3^- > \text{N}_2$ e non utilizzano

altre fonti di azoto finché non viene utilizzato tutto l'ammonio (Hsieh-Lo et al. 2019).

Il fosforo, sebbene presente in quantità minori tra 0,05% e il 3,3% del peso secco (Grobbelaar 2004). È coinvolto in processi metabolici chiave, sottoforma di nucleosidi trifosfati, che fungono da valuta energetica universale nella cellula. Inoltre, costituisce parte integrante di molecole essenziali come proteine, DNA, RNA e fosfolipidi (Dyhrman 2016). La composizione può variare notevolmente tra i taxa e in funzione della fisiologia. Tuttavia, è spesso uno dei fattori limitanti più importanti per la crescita. Ciò, è dovuto alla sua disponibilità, in quanto il fosforo ha la tendenza di legarsi facilmente ad altri ioni, come il carbonato e il ferro, formando precipitati che ne limitano l'assorbimento da parte delle alghe. Il fosforo viene comunemente fornito sotto forma di ortofosfato (PO_4^{2-}) (Richmond 2004).

Oltre a C, N e P, le microalghe richiedono altri micronutrienti in concentrazioni minori. Nonostante le basse quantità richieste sono essenziali come supporto per molte funzioni biologiche. Tra questi il ferro (Fe) e manganese (Mn) che agiscono come cofattori enzimatici, mentre il calcio (Ca) lo si ritrova in strutture cellulari come la parete (Khan et al. 2018; Markou et al. 2014). La corretta gestione e fornitura di questi nutrienti è fondamentale per ottimizzare la crescita e la produttività delle microalghe nelle colture industriali.

1.3.2 Luce

La luce è un elemento fondamentale nella crescita delle microalghe fotosintetiche, influenzando in maniera significativa la loro produttività, composizione biochimica e resa in biomassa. Come visto in precedenza la luce può essere fornita in modo naturale o artificiale, entrambe con i propri vantaggi e svantaggi; tuttavia, l'uso di sorgenti luminose avanzate, come i LED monocromatici, permette di modulare l'illuminazione in modo preciso, adattando la composizione spettrale della luce alle esigenze specifiche della coltura. I LED, oltre a essere più efficienti dal punto di vista energetico rispetto alle lampade tradizionali, consentono di scegliere lunghezze d'onda specifiche per stimolare la produzione di composti desiderati, migliorando l'efficienza fotosintetica e riducendo i costi operativi (Borella et al.,

2022; Porto et al. 2022; Schulze et al. 2014). I principali attributi della luce che ne determinano l'efficacia sono l'intensità, lo spettro, e il fotoperiodo, ovvero l'alternanza di cicli luce-buio. Per quanto riguarda l'intensità luminosa, la fotosintesi risponde a questa seguendo una curva di risposta caratterizzata da tre fasi: limitazione della luce, saturazione e fotoinibizione.

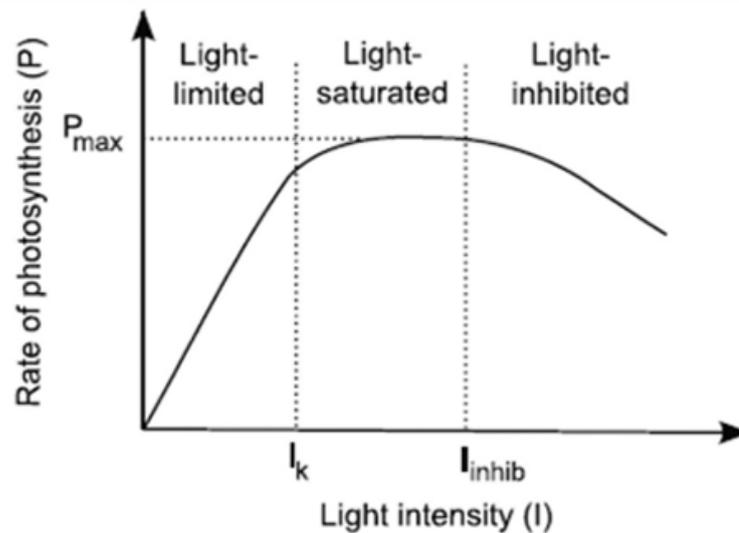


Figura 1.3 Relazione tra intensità luminosa e tasso di fotosintesi (Béchet et al., 2013).

A basse intensità di luce, il tasso di fotosintesi aumenta in modo lineare con l'incremento dell'intensità luminosa, poiché la fotosintesi è limitata dalla disponibilità di fotoni. Una volta raggiunta la saturazione della luce, la fotosintesi non aumenta ulteriormente e può subire un calo se l'intensità luminosa diventa eccessiva, causando fotoinibizione. Questo è un fenomeno che può danneggiare l'apparato fotosintetico e compromettere la crescita cellulare (Béchet et al. 2013; Daneshvar et al. 2021; Khan et al. 2018). Anche lo spettro che si vuole utilizzare gioca un ruolo altrettanto cruciale nei processi metabolici delle microalghe. La luce blu, con lunghezze d'onda comprese tra 450 e 490 nm, favorisce l'accumulo di acidi grassi poli-insaturi (PUFAs) e lipidi, mentre la luce rossa stimola la fotosintesi e la divisione cellulare. La luce verde, invece, è associata alla produzione di pigmenti fotosintetici, come la clorofilla e le ficobiliproteine (Habibi et al., 2019; Jin et al. 2021). Infine, altro parametro importante è la durata dell'illuminazione. L'uso di cicli luce-buio può ottimizzare la fotosintesi, riducendo il rischio di fotoinibizione e migliorando l'efficienza nell'assorbimento della luce. Inoltre, i cicli di buio permettono alle microalghe di riparare eventuali danni ai fotosistemi, promuovendo

la stabilità e la salute della coltura nel lungo periodo (Yustinadiar et al., 2020). Questo approccio consente anche di ridurre il consumo energetico, aspetto essenziale per la sostenibilità economica delle colture su larga scala (Maltsev et al. 2021; Zanolla et al. 2022). La combinazione ottimale di intensità luminosa, lunghezza d'onda e fotoperiodo può variare a seconda della specie di microalga coltivata (Zuccaro et al. 2020).

1.3.3 pH

Il pH è un parametro fondamentale che influenza numerosi aspetti del metabolismo e della crescita delle microalghe, tra cui l'assorbimento di nutrienti, l'attività enzimatica e la disponibilità di carbonio inorganico e fosforo. La maggior parte delle specie di microalghe preferisce un pH compreso tra 6 e 8, condizioni che favoriscono l'ottimizzazione dei processi metabolici e la crescita cellulare (Brindhadevi et al. 2021; Zuccaro et al. 2020). Tuttavia, alcune specie estremofile, come quelle acidofile, sono capaci di prosperare in condizioni di pH estremamente bassi, inferiori a 3, dimostrando un'elevata tolleranza a pH acidi. Un esempio significativo è rappresentato da *Galdieria sulphuraria*, un'alga acidofila che è in grado di crescere in modo autotrofo a pH 2 (Banihashemi et al. 2023). Il controllo del pH nelle colture di microalghe è spesso ottenuto mediante insufflazione di CO₂ o aggiunta di acidi organici o inorganici, in modo da contrastare eventuali variazioni dovute alla degradazione di metaboliti o all'attività fotosintetica. Con particolare riferimento alle colture eterotrofiche e mixotrofiche, anche il carbonio organico può essere fortemente influenzato dal pH del mezzo, essendo che ambienti estremamente acidi possono indurre fenomeni di decomposizione degli zuccheri, quali disidratazione, frammentazione. (Shallenberger et al., 1983). Mantenere il pH stabile è essenziale per garantire la disponibilità di nutrienti chiave come fosfati e ammonio, oltre a regolare il trasferimento dei gas (Daneshvar et al. 2021). In aggiunta valori di pH più bassi possono essere sfruttati per ridurre il rischio di contaminazione da parte di batteri e microrganismi indesiderati (Scherhag and Ackermann 2021).

1.3.4 Temperatura

La temperatura gioca un ruolo cruciale nel metabolismo, nella fotosintesi e nella crescita delle microalghe, influenzando direttamente processi come la fissazione della CO₂ e l'assorbimento di nutrienti. Le microalghe mesofile, che rappresentano la maggior parte delle specie impiegate a livello industriale, proliferano in condizioni ottimali di temperatura, generalmente comprese tra 24 e 35°C (Zuccaro et al. 2020). Tuttavia, esistono anche microalghe psicrofile, che crescono a temperature inferiori ai 15°C, e termofile, che prosperano a temperature superiori ai 50°C, dimostrando la notevole variabilità termica che può caratterizzare queste specie (Varshney et al. 2015). Non sono stati segnalati organismi fotosintetici che crescano oltre i 75 °C, probabilmente a causa dell'instabilità delle clorofille oltre questa soglia (Varshney et al. 2015). Sebbene temperature al di fuori dell'intervallo ottimale possano ridurre l'efficienza della fotosintesi e la crescita complessiva, esse possono essere sfruttate per indurre condizioni di stress e stimolare la produzione di metaboliti di valore, come gli acidi grassi polinsaturi (PUFAs) e altri lipidi (Paliwal et al. 2017; Zuccaro et al. 2020). Le conseguenze di temperature superiori ai valori ottimali di crescita delle microalghe sono generalmente considerate più dannose rispetto agli effetti delle basse temperature. L'impatto negativo delle alte temperature è comunemente attribuito allo stress termico, che può compromettere l'attività enzimatica, portando all'inattivazione e alla denaturazione degli enzimi, fino a danneggiare le proteine essenziali per la fotosintesi (Salvucci et al., 2004). In risposta a condizioni termiche eccessive, le microalghe adottano strategie di adattamento specifiche, che variano a seconda della specie, per minimizzare i danni (Ras et al., 2013). Da un punto di vista matematico, tale comportamento biologico è evidenziato da una curva a campana (Ras et al. 2013), che evidenzia come la crescita aumenti gradualmente con l'incremento della temperatura fino a raggiungere un massimo, seguito da un rapido declino oltre la soglia ottimale.

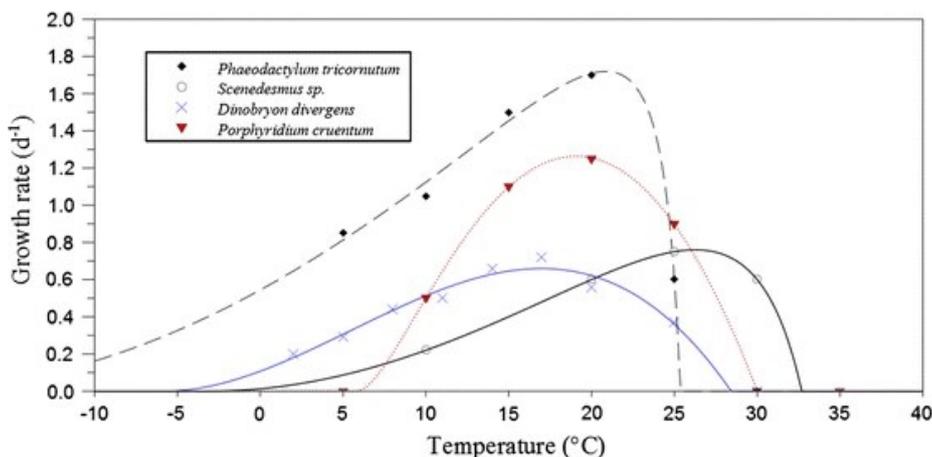


Figura 1.4: Effetto della temperatura sui tassi di crescita delle microalghe.

La curva illustrata nella figura 1.5 mostra chiaramente l'impatto della temperatura sui tassi di crescita delle microalghe. Tale curva è tipicamente asimmetrica, con un aumento asintotico della crescita fino a raggiungere il picco, oltre il quale si verifica una repentina diminuzione (Ras et al., 2013).

1.4 Strategie per la coltivazione delle microalghe su larga scala

La coltivazione industriale delle microalghe presenta numerose sfide, soprattutto per quanto riguarda l'ampliamento del processo su larga scala. Se il controllo delle condizioni operative è relativamente semplice su scala di laboratorio, lo stesso diventa più complesso a livello industriale, dove l'ottimizzazione della produttività richiede uno studio approfondito delle metodologie e dei sistemi di coltivazione (Benner et al. 2022). Rispetto alle prime, è possibile annoverare coltivazioni in batch ed in continuo tra i metodi principali, mentre strutturalmente parlando il criterio distingue tali sistemi in aperti e chiusi. In entrambi i casi, la scelta del sistema di coltivazione e della metodologia utilizzata deve essere ponderata in funzione degli obiettivi di produzione. Ad esempio, per produzioni su larga scala, come la biomassa per bioenergia, i sistemi aperti possono risultare più adatti, mentre per applicazioni ad alto valore aggiunto, come la produzione di composti bioattivi, i sistemi chiusi offrono maggiore affidabilità e qualità (Abdur Razzak et al. 2024).

1.4.1 Batch

La coltivazione in **batch** è una delle metodologie più diffuse per la crescita delle microalghe a livello commerciale, grazie alla sua semplicità e facilità di implementazione.

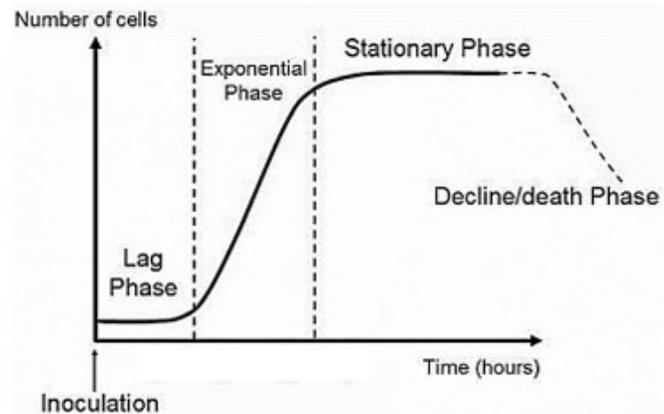


Figura 1.5: Schema crescita batch.

Una volta inoculato il sistema con una quantità nota di biomassa microalgale, il processo batch segue diverse fasi: inizialmente, nella fase di adattamento (**lag**), le cellule si acclimatano alle condizioni ambientali, con una crescita minima. Successivamente, durante la fase esponenziale, le cellule si moltiplicano rapidamente perché la velocità specifica di crescita diventa costante e pari al massimo valore ottenibile (Wanner and Egli 1990). Nel momento in cui si ha la limitazione di un qualsiasi nutriente, subentra la fase stazionaria, nella quale non si ha una crescita netta della coltura in quanto velocità di crescita e di morte si equivalgono. Infine, nella fase di morte le cellule iniziano a morire per mancanza di disponibilità di nutrienti, portando ad una progressiva riduzione della popolazione nella coltura (Richmond 2004); solitamente ciò si presenta in concomitanza, a causa della carenza di micronutrienti (Fernandes et al. 2015). Sebbene il metodo batch sia efficiente per la produzione di biomassa e metaboliti secondari, presenta come principale svantaggio una produttività non costante; questo perché alterando costantemente la disponibilità di nutrienti la velocità di crescita tende a variare sempre. Inoltre, la biomassa prodotta presenta una qualità variabile, in quanto durante le diverse fasi di crescita le cellule subiscono cambiamenti morfologici e funzionali (Lee and Shen 2004). A questo si aggiungono ulteriori problematiche in ottica di processo, come i tempi di inattività per la pulizia

e il riavvio del sistema, che portano ad una ulteriore riduzione della produttività, nonché maggiori richieste di manodopera, acqua e sostanze chimiche (Vale et al. 2020).

1.4.2 Reattori in continuo

La coltivazione continua rappresenta una metodologia alternativa a quella batch, progettata per mantenere un controllo stabile e prolungato delle condizioni di crescita. A livello operativo, la coltivazione continua prevede un flusso di terreno fresco in ingresso e un flusso in uscita che rimuovono la biomassa in eccesso e parte del terreno consumato.

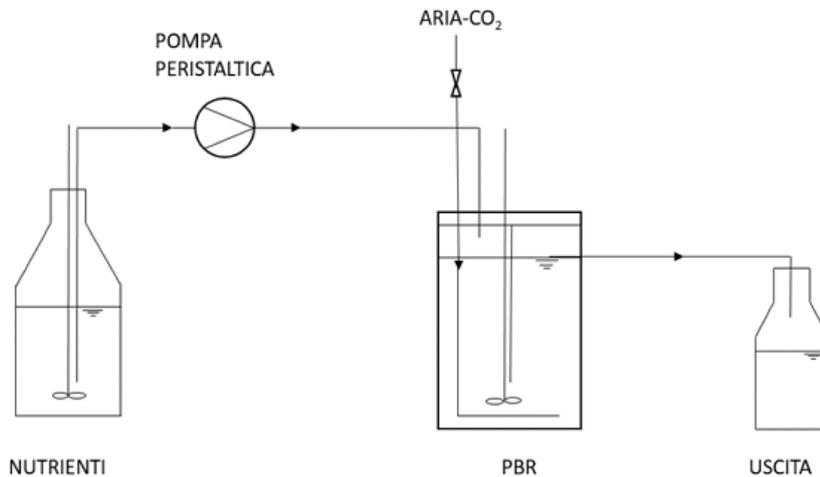


Figura 1.6: Schema sistema continuo.

L'aumento della concentrazione cellulare nel fotobioreattore (PBR) risulta dalla differenza tra la crescita e la rimozione della biomassa (Lee and Shen 2004). Per un intervallo di tempo infinitesimale, il bilancio di materia della specie è espresso come segue (Fernandes et al. 2015):

$$V_r \frac{dC_X}{dt} = \mu C_X V + \dot{V}_{in} C_{X,in} - \dot{V}_{out} C_{X,out} \quad (1.1)$$

dove V_r è il volume di lavoro (L), dC_X/dt rappresenta l'accumulo di biomassa nel bioreattore ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), μ è il tasso di crescita specifico (h^{-1}), $C_{X,in}$ e $C_{X,out}$ sono rispettivamente le concentrazioni di biomassa in ingresso e in uscita (g L^{-1}), \dot{V}_{in} e \dot{V}_{out} rappresentano le portate volumetriche in ingresso e uscita (L h^{-1}) (Fernandes

et al. 2015; Richmond 2004). Il sistema è configurato affinché nuovo terreno sterile sia introdotto alla stessa velocità con cui viene rimosso $\dot{V}_{in} = \dot{V}_{out} = \dot{V}$, mantenendo così costante il volume nel reattore. In tale condizione, l'equazione si semplifica come segue:

$$\frac{dC_X}{dt} = \left(\mu - \frac{\dot{V}}{V_r}\right) C_X \quad (1.2)$$

dove il termine \dot{V}/V_r rappresenta il tasso di diluizione D della coltura (h^{-1}) (Lee and Shen 2004).

$$\frac{dC_X}{dt} = (\mu - D)C_X \quad (1.3)$$

Dopo una fase iniziale di adattamento la biomassa si stabilizza ad un valore costante, noto come stato stazionario, per cui il termine di accumulo netto di biomassa è nullo (Fernandes et al. 2015):

$$\frac{dC_X}{dt} = 0 \quad (1.4)$$

da cui risulta che le cellule crescono ad una velocità che equivale al tasso di diluizione:

$$\mu = D \quad (1.5)$$

Grazie a questo processo, la coltura può essere mantenuta in crescita per tempi indefiniti con caratteristiche costanti, sia quantitative che qualitative (Fernandes et al. 2015). Ciò rende il sistema ideale per studi sull'assimilazione dei nutrienti, la produzione di metaboliti secondari e la risposta delle cellule a stimoli ambientali specifici, in un contesto ottimale per la modellazione (Gresham and Dunham 2014).

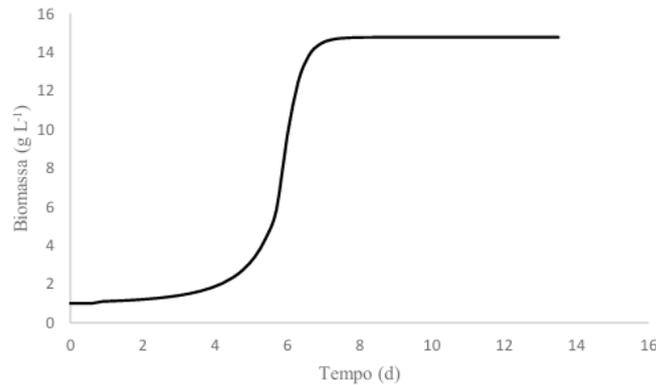


Figura 1.7 Profilo tipico della concentrazione di biomassa in un reattore in continuo.

Dal reciproco del tasso di diluizione è possibile ricavare un altro parametro operativo chiave, ovvero il tempo di permanenza τ , o tempo di ritenzione idraulica, definito come il rapporto tra il volume del reattore (V_r) e la portata volumetrica (\dot{V}) (Uppal et al., 1976):

$$\tau = \frac{V_r}{\dot{V}} \quad (1.6)$$

Tale variabile indica quanto a lungo ogni cellula rimane nel reattore. Cambiando il tempo di permanenza si alterano le condizioni di crescita, alle quali le cellule si adattano in un periodo transitorio che dura circa tre o quattro volte il tempo di residenza (Trentin et al. 2021). Tra i principali metodi di coltivazione continua, si distingue il chemostato, in cui il tasso di crescita è controllato dalla diluizione, e il turbidostato, che mantiene costante la densità cellulare mediante un feedback di controllo (Lee and Shen 2004). Quest'ultimo risulta vantaggioso per microrganismi a crescita lenta o con cicli cellulari complessi e in ambienti con substrati inibitori o vicini al tasso di crescita massimo (Fernandes et al. 2015). Rispetto al batch, la coltivazione continua offre vantaggi significativi per le applicazioni industriali, in quanto questo sistema permette di ridurre i tempi morti tra le produzioni e garantendo una crescita più rapida. Inoltre, consente l'eliminazione della fase di lag della crescita, garantendo una produzione maggiore e costante nel tempo (Lee and Li 2017). Grazie all'automazione e alla minore necessità di intervento umano, è possibile contenere i costi operativi. Infine, il sistema continuo, una volta raggiunto lo stato stazionario, offre stabilità di performance di coltivazione, elevata riproducibilità e la possibilità di studiare con precisione variabili operative (Peter et

al. 2022a). Tuttavia, tali sistemi non sono privi di problematiche. In primis, l'installazione degli impianti comporta costi e tempi maggiori. Inoltre, causa dei tempi di coltivazione dilatati nel tempo e al fatto che tale modalità di base è un sistema “aperto”, aumenta di conseguenza la probabilità di contaminazione da parte di microrganismi indesiderati e di mutazioni genetiche della specie coltivata (Fernandes et al. 2015; Vale et al. 2020).

1.4.3 Sistemi aperti

I **sistemi aperti** per la coltivazione delle microalghe, conosciuti anche come **open ponds** o **raceway ponds**, sono largamente utilizzati su scala industriale per la loro economicità e semplicità di costruzione e manutenzione (Chisti 2016). Questi sistemi consistono in vasche poco profonde, dove la coltura viene mescolata da pale rotanti per garantire la circolazione delle alghe e dei nutrienti, al fine di ottenere una cultura omogenea. Tuttavia, uno dei principali svantaggi di questi sistemi è l'incapacità di controllare in modo preciso parametri cruciali per la crescita, come il pH, la temperatura e la disponibilità di luce e CO₂, che vengono facilmente influenzati dalle condizioni atmosferiche e stagionali (Fernandes et al. 2015; Jerney and Spilling 2020; Khan et al. 2022). Inoltre, essendo esposti all'ambiente, gli open ponds sono altamente suscettibili a contaminazioni da microrganismi indesiderati e inquinanti atmosferici, che possono compromettere la resa e la qualità della coltura (Tredici et al. 2016).

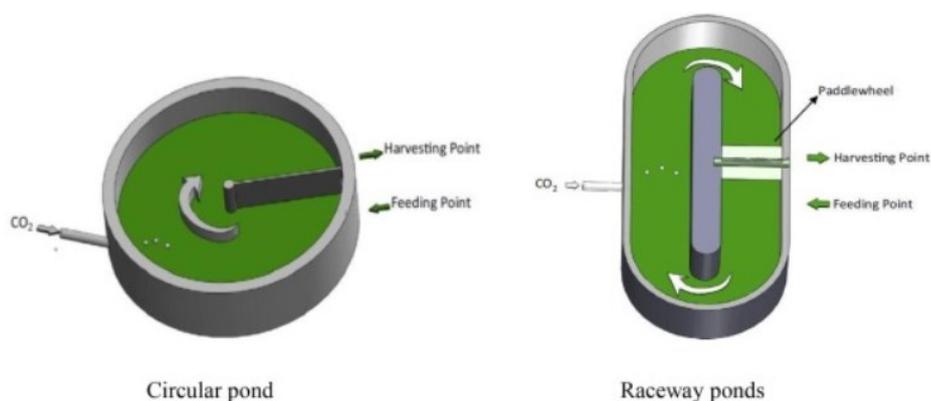


Figura 1.8: Schematizzazione di alcune tipologie di open ponds (Kiran et al., 2014).

Nonostante questi limiti, i sistemi aperti restano una scelta economica, soprattutto per la produzione di composti a basso valore, come la biomassa per la nutrizione animale. Alcune soluzioni, come l'impiego di *High Rate Algal Ponds* (HRAP) che utilizzano acque reflue e sfruttano la simbiosi con batteri eterotrofi, sono state sviluppate per migliorare l'efficienza e ridurre i costi operativi (Rawat et al. 2011).

1.4.4 Sistemi chiusi

I sistemi chiusi per la coltivazione delle microalghe, noti come fotobioreattori (*Photobioreactors* - PBRs), offrono un ambiente controllato che consente di monitorare e ottimizzare i parametri di crescita, riducendo il rischio di contaminazioni rispetto ai sistemi aperti (Fernandes et al. 2015). Essendo poi utilizzati principalmente per la coltivazione in autotrofia, tali reattori sono generalmente costruiti con materiali trasparenti come polivinil-cloruro o il plexiglass, oltre al vetro (Dange et al. 2022): entrambe le plastiche sono economiche, mentre il vetro risulta più dispendioso, anche se è altamente durevole e rappresenta l'unico materiale che consente la sterilizzazione termica. Sempre da un punto di vista costruttivo, vengono adottate geometrie specifiche atte a massimizzare la superficie di irraggiamento, per espletare al meglio il metabolismo fotosintetico della specie e migliorare così le efficienze di produzione (Zhang et al. 2016). Inoltre, un'efficiente mescolazione del mezzo risulta cruciale per garantire che tutte le cellule ricevano un'illuminazione adeguata, prevenendo fenomeni di ombreggiamento o stratificazione termica e assicurando una distribuzione omogenea dei nutrienti, e una crescita omogenea all'interno del reattore (Terry et al., 1985) Rispetto ad i sistemi aperti, l'evaporazione dell'acqua è molto meno incentivata, consentendo anche sotto questo aspetto una migliorata gestione (Calderon et al., 2022). Uno dei principali vantaggi dei PBR è la possibilità di coltivare un numero maggiore di specie algali rispetto ai sistemi aperti (Tredici et al. 2016). Il controllo accurato di parametri come temperatura, pH e luce rende i PBR più produttivi e adatti alla produzione di biomassa e composti ad alto valore aggiunto, da impiegare nei settori nutraceutici e farmaceutici, anche se richiedono investimenti e costi di manutenzione più elevati (Jerney et al., 2020). Questi sistemi sono inoltre ideali per coltivare alghe in regioni più fredde, dove le vasche aperte

non sono praticabili a causa del rischio di congelamento, aprendo nuove possibilità di esplorazione. Tuttavia, i PBR presentano anche alcuni svantaggi, in particolare la gestione degli scambi gassosi, poiché mantenere un giusto equilibrio tra anidride carbonica e ossigeno può risultare complesso nei sistemi chiusi (Jerney and Spilling 2020). Tra i principali tipi di PBR troviamo le colonne verticali, i flat panel e i reattori tubulari, ognuno dei quali offre specifici vantaggi e limitazioni.

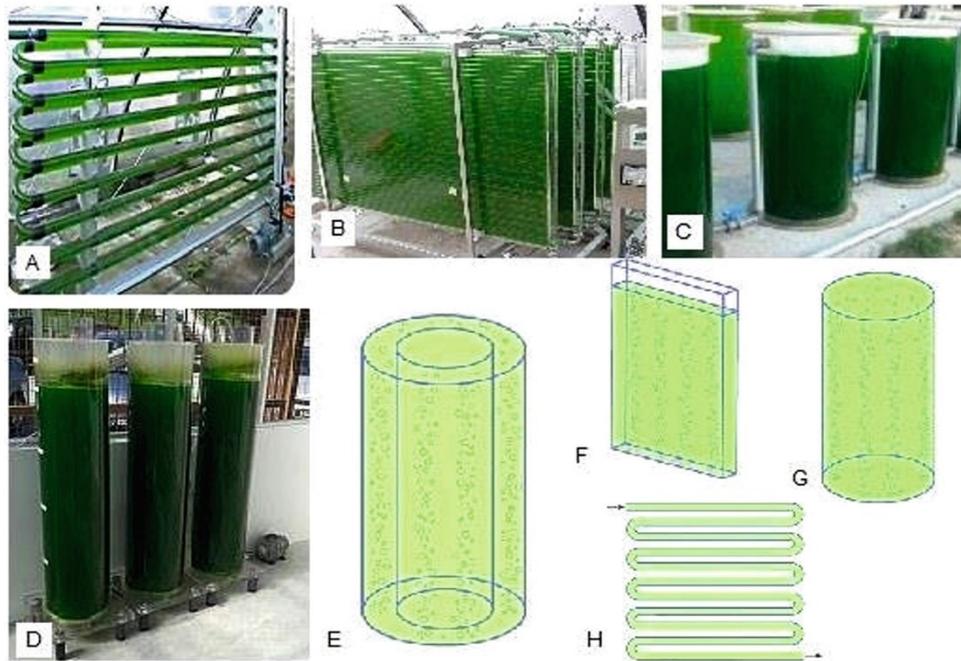


Figura 1.9: Diversi tipi di fotobioreattori per la coltivazione di alghe.: (a) tubolare, (b) piastra, (c) colonna e (d) anulare. E–H – rappresentazione diagrammatica dei fotobioreattori: (e) anulare, (f) piastra, (g) colonna, (h) tubolare (Ficara et al. 2014).

1.4.2.1 Reattori a colonna

I reattori a colonna, o fotobioreattori a colonna, sono sistemi cilindrici semplici ed efficienti per la coltivazione di microalghe. Dotati di un diffusore di gas situato nella parte inferiore, questi reattori utilizzano bolle d'aria o gas per facilitare la miscelazione, migliorare il trasferimento di CO₂ e rimuovere l'ossigeno prodotto durante la fotosintesi. Possono essere classificati in due categorie principali: reattori a colonna a bolle e reattori a sollevamento d'aria. I reattori a colonna a bolle sono caratterizzati dall'assenza di parti in movimento, il che li rende economici e facili da mantenere, mentre i reattori a sollevamento d'aria offrono una miscelazione più efficiente grazie a un design che prevede il ricircolo continuo del liquido attraverso

una zona di risalita e una zona di discesa. La capacità di questi reattori di ottimizzare il trasferimento di massa e calore li rende ideali per la coltivazione di microalghe ad alta densità, anche in sistemi più grandi. Uno dei vantaggi principali dei reattori a colonna è la possibilità di ottimizzare il rapporto tra superficie illuminata e volume, garantendo un'esposizione uniforme alla luce. Tuttavia, il diametro delle colonne non deve superare i 0,2 m per garantire un'adeguata disponibilità di luce nelle regioni interne del reattore e prevenire problemi di auto-ombreggiamento (Ahmad et al. 2021; Benner et al. 2022; Zuccaro et al. 2020)

1.4.2.2 Reattori flat panel

I fotobioreattori a flat panel (PBR) sono sistemi chiusi progettati per ottimizzare l'uso della luce grazie al loro elevato rapporto superficie illuminata/volume. Composti da due piastre unite, il loro spessore determina la lunghezza del percorso della luce, influenzando direttamente la densità cellulare ottimale (*optimal cell density, OCD*) e la produttività della biomassa. In generale, una minore lunghezza del percorso luminoso porta a una maggiore efficienza nella crescita microalgale (Wang, Lan, and Horsman 2012; Ahmad et al. 2021). L'agitazione può essere fornita sia tramite bolle d'aria, sia mediante agitazione meccanica. Tuttavia, possono presentare problemi di incrostazione e sedimentazione delle cellule sulle pareti del reattore, che rappresentano un ostacolo per lo scaling-up a volumi maggiori (Zuccaro et al. 2020; Benner et al. 2022). Questi reattori, quindi, offrono un'efficienza luminosa ottimale, ma richiedono un'attenta gestione dei processi di manutenzione e pulizia.

1.6 *Galdieria sulphuraria*

Galdieria sulphuraria è un'alga rossa unicellulare appartenente alla classe delle *Cyanidiophyceae*, note per la loro capacità di prosperare in condizioni ambientali estreme. *G. sulphuraria* si distingue per la sua capacità di sopravvivere in ambienti acidi (pH 0-4), ad alte temperature (fino a 56°C) e in presenza di elevate concentrazioni di metalli pesanti e sali (Banihashemi et al. 2023; Gross et al. 1998). Dal punto di vista biologico, *G. sulphuraria* presenta una morfologia semplice

costituita da cellule sferiche a parete spessa, contenenti un cloroplasto multilobato, uno o più mitocondri, un nucleo, e riserve energetiche intracellulari (Modeste et al. 2019). Una delle sue peculiarità è la versatilità metabolica, che consente una crescita sia autotrofica che mixotrofica ed eterotrofica. È in grado di utilizzare una vasta gamma di fonti di carbonio, tra cui zuccheri e alcoli, rendendola un organismo ideale per processi di coltivazione in condizioni variabili (Gross and Schnarrenberger 1995): da un punto di vista genomico, e rispetto ad altre specie della stessa classe, *G. sulphuraria* infatti è dotata di un maggior numero di trasportatori di monosaccaridi, il che spiega la sua versatilità nel crescere su molteplici fonti di carbonio (Ciniglia et al. 2004). Studi recenti hanno confermato che *G. sulphuraria* può essere coltivata con successo in fermentatori, dove le sue condizioni di crescita in ambienti estremamente acidi inibiscono la proliferazione di altri microrganismi, riducendo così il rischio di contaminazione (Pleissner et al., 2021): ad esempio, studi hanno dimostrato che *Galdieria sulphuraria* può essere coltivata in condizioni axeniche a pH 2, riducendo la popolazione batterica del 98% e rimuovendo tutti i patogeni presenti nelle acque reflue urbane non sterilizzate (Henkanatte-Gedera et al. 2017). La capacità di *G. sulphuraria* di adattarsi a diverse fonti di carbonio, insieme alla sua tolleranza a condizioni ambientali estreme, la rende anche un candidato interessante per la produzione di biomassa ad alto valore aggiunto. Ad esempio, studi recenti hanno dimostrato che *G. sulphuraria* potrebbe essere utilizzata come ingrediente attivo nei prodotti per la cura della pelle, in particolare per ridurre gli effetti dell'acne (Massa et al. 2019). L'uso di *G. sulphuraria* nel recupero di nutrienti e metalli pesanti dalle acque reflue è un altro campo di grande interesse: le sue caratteristiche estremofile permettono infatti di impiegarla in processi di biorisanamento, dove si è dimostrata efficace nel rimuovere fosfati e terre rare (Minoda et al. 2015), ed esperimenti di coltivazione in larga scala all'aperto hanno evidenziato la capacità della specie di depurare le acque reflue urbane (Selvaratnam et al. 2014). Nonostante la bassa produttività della biomassa in condizioni autotrofiche rispetto ad altre specie di alghe, come *Chlorella* o *Chlamydomonas*, *G. sulphuraria* eccelle in condizioni eterotrofiche, dove può produrre elevate concentrazioni di biomassa (fino a 100 g L⁻¹ di peso secco) e mostrare una produttività di oltre 50 g L⁻¹ al giorno (Schmidt et al., 2005; Graverholt and Eriksen 2007). Questa straordinaria capacità di crescita rende *G.*

sulphuraria particolarmente adatta alla coltivazione in bioreattori ad alta densità. Inoltre, essa presenta un notevole potenziale per la produzione di polisaccaridi extracellulari, che possono trovare applicazioni in ambito industriale. Questi polisaccaridi, grazie alle loro proprietà immunomodulanti e alla capacità di promuovere la formazione ossea, potrebbero essere impiegati come additivi o ingredienti attivi in prodotti alimentari e farmaceutici. (Martinez-Garcia et al., 2016). Inoltre questa combinazione di caratteristiche rende l'alga un potenziale candidato per una varietà di altre applicazioni biotecnologiche, tra cui la produzione sostenibile di syngas attraverso pirolisi e gassificazione, un campo ancora poco sviluppato (Banihashemi et al. 2023).

1.6.1 Profilo nutrizionale

Le carenze nutrizionali, in particolare la malnutrizione proteica e la carenza di microelementi, rappresentano un problema di salute pubblica su scala globale. Le proteine sono un macronutriente essenziale per il corpo umano, poiché forniscono gli aminoacidi necessari per la crescita, la riparazione dei tessuti e il corretto funzionamento di numerosi processi biologici (Jiang et al. 2023). Tuttavia, un gran numero di persone nel mondo non riesce a soddisfare il proprio fabbisogno proteico a causa di vari fattori fisiologici, sociali ed economici, il che porta a una riduzione della quantità e qualità dei nutrienti nella dieta (Jiang et al. 2023).

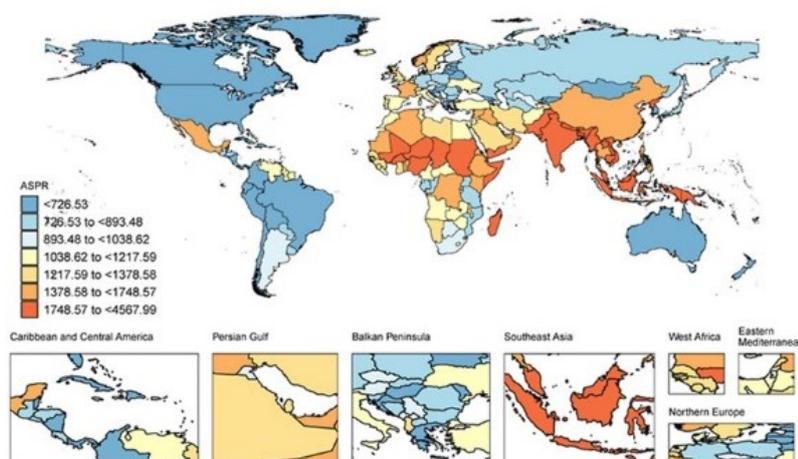


Figura 1.10: Stato di malnutrizione proteico-energetica tra tutti i paesi/territori nel 2019.

In questo contesto, le microalghe, e in particolare *Galdieria sulphuraria*, stanno emergendo come una fonte proteica alternativa promettente, soprattutto per le popolazioni che hanno accesso limitato a fonti proteiche convenzionali. *G. sulphuraria* è nota per il suo elevato contenuto proteico, che può variare dal 51% al 64% del peso secco a seconda delle condizioni di coltivazione e del ceppo, come evidenziato dallo studio di Canelli et al. (2023). In confronto ad altre microalghe più comunemente note, come *Chlorella* e *Spirulina*, *G. sulphuraria* presenta un profilo amminoacidico più bilanciato, comprendente tutti gli aminoacidi essenziali, inclusi quelli contenenti zolfo, come metionina e cisteina, che sono generalmente scarsi nelle fonti vegetali (Abiusi et al. 2024). Questo la rende particolarmente adatta ad integrare diete deficitarie in aminoacidi solforati, cruciali per numerose funzioni corporee, tra cui la sintesi proteica e la protezione contro lo stress ossidativo (Abiusi, Moñino Fernández, et al. 2022). Inoltre, il contenuto di triptofano, asparagina e glutammina è particolarmente rilevante: secondo i dati recenti, questi tre aminoacidi costituiscono circa un quarto del contenuto totale di aminoacidi in *G. sulphuraria* (Canelli et al., 2023). Oltre al contenuto proteico, la qualità delle proteine è determinante: *G. sulphuraria* risulta infatti conforme ai requisiti FAO per la composizione di aminoacidi essenziali necessari per l'alimentazione umana, rendendola una risorsa di elevato valore nutrizionale (Abiusi et al., 2022). Oltre a spiccare tra le microalghe più impiegate nel settore alimentare, il profilo amminoacidico di *G. sulphuraria* eccelle anche nel confronto con la soia, la principale fonte di proteine vegetali in tutto il mondo (Abiusi, Moñino Fernández, et al. 2022). Altro aspetto importante da considerare è la bioaccessibilità di tali proteine, tanto importante quanto la quantità della frazione proteica. In genere, la bioaccessibilità dei nutrienti intracellulari da microalghe intere è limitata dalla parete cellulare indigeribile (Canelli et al. 2020). Nello specifico, *G. sulphuraria* ha una parete cellulare unica, contenente basse quantità di cellulosa e fino al 55% di proteine (Bailey and Staehelin 1968; Oesterhelt et al. 2008). Nel tratto digerente umano, non ci sono enzimi capaci di digerire la cellulosa, mentre le proteine sono facilmente idrolizzabili, il che spiega la buona bioaccessibilità delle proteine in alcuni ceppi. Tuttavia, è da evidenziare una bioaccessibilità proteica variabile tra il 40% e l'82%, dovuta alla diversa composizione biochimica e morfologia della parete cellulare delle diverse specie di questa famiglia (Canelli et

al. 2020; Canelli et al. 2023). Inoltre, la cellulosa insolubile costituente le pareti cellulari è in grado di raggiungere il colon e di stimolare la crescita della microflora positiva, contribuendo così al miglioramento dell'ecosistema intestinale umano. Tale struttura contribuisce alla sua elevata stabilità e ne aumenta la bioaccessibilità proteica in condizioni specifiche (Canelli et al. 2023). Quando coltivato in modo eterotrofico, *G. sulphuraria* contiene in genere circa il 20-40% (p/p) di proteine (Graziani et al. 2012; Massa et al. 2019; Pleissner et al 2021), mentre la coltivazione autotrofa e mixotrofa produce un contenuto proteico più elevato, fino al 64-72% (p/p) (Abiusi et al. 2022; Cheng et al. 2019). Inoltre, la bassa quantità di lipidi totali e la percentuale limitata di acidi grassi polinsaturi possono influenzare positivamente il tempo di conservazione limitando la degradazione ossidativa, che solitamente rappresenta un problema importante quando le microalghe vengono incorporate negli alimenti (Graziani et al. 2012). Nonostante tutte queste caratteristiche positive di tale biomassa, le microalghe essiccate non hanno finora acquisito un'importanza significativa come cibo o ingredienti alimentari. Ciò è dovuto principalmente a ostacoli sensoriali: la consistenza simile a una polvere della biomassa essiccata ed il colore verde scuro soprattutto generano bassa attrattività da parte dei consumatori. È interessante però notare che quando *G. sulphuraria* viene coltivata in modo eterotrofico, diminuisce o, in alcuni casi, perde quasi completamente il suo contenuto di pigmenti (Graziani et al. 2012; Perez Saura et al. 2022), migliorando la desiderabilità del prodotto rispetto alla controparte autotrofica. Questo, insieme al bilanciato profilo amminoacidico e all'elevata concentrazione di fibre insolubili, rende *G. sulphuraria* un ingrediente versatile per l'industria alimentare e nutraceutica, con potenziali applicazioni nel miglioramento della salute intestinale e nella prevenzione della malnutrizione.

1.7 Scopo della tesi

Nel panorama attuale, caratterizzato da un costante incremento demografico e da una crescente domanda di risorse alimentari, la necessità di fonti di cibo alternative e sostenibili è divenuta pressante. I metodi agricoli convenzionali, pur essendo essenziali, si rivelano spesso onerosi in termini di impatto ambientale e limitati nella capacità di rispondere a una richiesta globale in continua espansione. Le microalghe, e in particolare le specie estremofile come *Galdieria sulphuraria*, offrono una valida opportunità di sviluppo di sistemi produttivi eco-sostenibili, in grado di integrare principi di economia circolare e di massimizzare l'efficienza d'uso delle risorse. La presente tesi si propone di esplorare il potenziale di crescita e produzione di biomassa di *G. sulphuraria* sotto diversi regimi trofici, con un'attenzione particolare alla coltivazione in sistemi continui, oltre che in batch. La ricerca indaga l'influenza delle principali variabili operative, come il tempo di permanenza e la concentrazione di substrato organico, al fine di ottimizzare le condizioni di coltura per ottenere una produttività elevata e costante, nonché di massimizzare le performance di coltivazione mediante appositi indicatori di resa. L'approfondimento dell'utilizzo di vari substrati organici, compresi scarti agro-industriali, consente inoltre di valutare il potenziale di questa alga per l'impiego di risorse rinnovabili e di facile reperibilità, trasformando materiali di scarto in valore produttivo. Con questo approccio, il lavoro contribuisce a definire strategie sostenibili per la coltivazione su larga scala di *G. sulphuraria*, ponendo le basi per un'applicazione industriale che risponda alle esigenze di sostenibilità e riduzione dei costi, essenziali per l'industria alimentare e dei mangimi.

Capitolo 2: Materiali e Metodi

2.1 Ceppo algale e condizioni di coltivazione

L'axenicità della specie microalgale *Galdieria sulphuraria* SAG 21.92 (Fig. 2.1), proveniente dalla collezione di colture di alghe dell'Università di Göttingen, Germania (SAG), è stata garantita preservandola in bottiglie Quickfit Drechsel® da 250 mL, con un diametro di 5 cm, a una temperatura costante di 30°C ed esposte a una luce continua con un'intensità luminosa di 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La miscelazione delle colture è stata assicurata attraverso l'insufflazione di aria atmosferica arricchita al 5% (v/v) di CO₂, combinata con l'agitazione fornita da un agitatore magnetico situato sul fondo delle bottiglie.

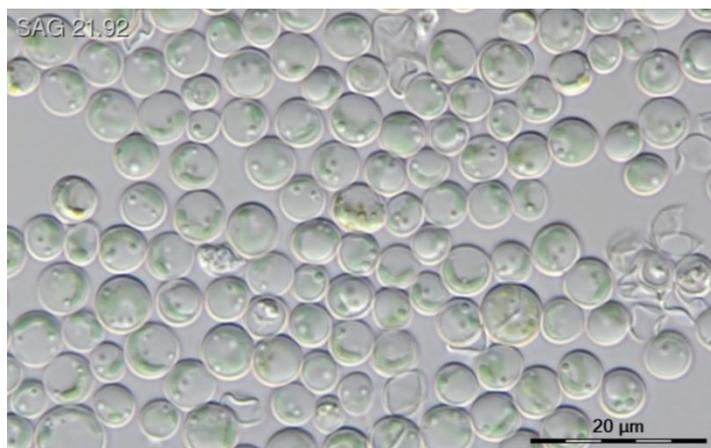


Figura 2.1 Immagine al microscopio di *Galdieria sulphuraria* SAG 21.

Per quanto riguarda i nutrienti, in una bottiglia è stato aggiunto il terreno MAM (Modified Allan Medium) per adattare la specie alle condizioni autotrofiche, mentre in parallelo, è stata preparata una seconda coltura di *Galdieria sulphuraria* SAG 21.92 in condizioni mixotrofiche: questo mediante l'arricchimento del terreno MAM con glucosio a 15 g L⁻¹, ovvero con una concentrazione equivalente di carbonio organico (g_C L⁻¹) pari a 6 g_C L⁻¹. Queste colture sono state utilizzate come preinoculi nelle varie campagne sperimentali, con regolari diluizioni effettuate usando i corrispettivi terreni sterili per mantenere la crescita in fase esponenziale.



Figura 2.2 Immagine a) preinoculo in autotrofia b) preinoculo in mixotrofia.

La composizione dettagliata del mezzo, acidificato a pH 2 con acido solforico al 95-98% previa sterilizzazione in autoclave a 120°C è mostrata in tabella 2.1 (Allen 1968).

Tabella 2.1 Formulazione terreno MAM arricchito.

| Componente | Concentrazione [g L⁻¹] |
|---|--|
| <i>NaCl</i> | 0.02 |
| <i>(NH₄)₂SO₄</i> | 5,6 |
| <i>MgSO₄·7H₂O</i> | 0.6 |
| <i>K₂HPO₄</i> | 0,5 |
| <i>CaCl₂·2H₂O</i> | 0,02 |
| <i>C₆H₈O₇·xFe³⁺·yNH₃</i> | 0,02 |
| <i>CuSO₄·5H₂O</i> | 1.37*10 ⁻³ |
| <i>(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O</i> | 4.2 * 10 ⁻³ |
| <i>ZnSO₄·7H₂O</i> | 18 |
| <i>CoCl₂·6H₂O</i> | 8.6 * 10 ⁻⁵ |
| <i>MnCl₂·4H₂O</i> | 4.6 * 10 ⁻³ |
| <i>H₃BO₃</i> | 1.14 * 10 ⁻² |

Per le campagne sperimentali focalizzate sull'analisi delle performance di crescita in condizioni eterotrofiche e mixotrofiche, il terreno MAM di partenza è stato modificato ad hoc con l'introduzione di alcuni substrati organici, quali glucosio (*Sigma-Aldrich*), lattosio (*Sigma-Aldrich*), e galattosio (*Tokyo Chemical Industry co.*). Inoltre, è stato utilizzato il permeato di latte come fonte di carbonio organico per valutare la possibilità di coltivare *Galdieria sulphuraria* da scarti dell'industria casearia. Tale substrato è stato fornito dall'azienda Centrale del latte di Vicenza ed è stato caratterizzato attraverso diverse analisi chimiche, per determinare il contenuto di glucosio, di fosfati, di carbonio organico e azoto.

Tabella 2.2 Caratterizzazione permeato del latte. TC: Carbonio Totale; IC: Carbonio Inorganico Totale; TOC: Carbonio Organico Totale; TN: Azoto Totale; Carboidrati Totali; Fosfati Totali.

| Componente | Concentrazione [g L ⁻¹] |
|---|-------------------------------------|
| <i>IC</i> | 0,179 |
| <i>TOC</i> | 21,122 |
| <i>TN</i> | 0,198 |
| <i>C₆H₁₂O₆</i> | 36,627 |
| <i>PO₄³⁻</i> | 1,169 |
| <i>pH</i> | 6,9 |



Figura 2.3 Permeato del latte.

2.2 Modalità di coltivazione

2.2.1 Coltivazione in continuo

Per indagare l'effetto delle variabili operative sulla crescita di *Galdieria sulphuraria* in condizioni ottimali, è stata utilizzata la coltivazione in continuo. Questo sistema permette di studiare parametri come ad esempio il tempo di residenza, l'intensità luminosa e la concentrazione di nutrienti ideali per massimizzare la produttività di biomassa. Al fine di esaminare l'influenza delle singole variabili operative, è stato adottato l'approccio "one-factor-at-a-time", che consente di analizzare una variabile alla volta mantenendo le altre costanti: in questo modo si garantisce così un'analisi mirata degli effetti di ciascun parametro di crescita sul sistema algale.

2.2.1.1 Flat panel

Gli esperimenti in modalità continua sono stati eseguiti coltivando *Galdieria sulphuraria* all'interno di fotobioreattori flat panel in policarbonato con un volume di lavoro pari a 200 ml, uno spessore di 2 cm e un'area illuminata di 80 cm² (Fig. 2.4). Il terreno in ingresso viene introdotto mediante l'uso di una pompa peristaltica multicanale (205S/CA, *Watson Marlow Fluid Technology Group*), che permette di regolare la portata in entrata in accordo con il tempo di permanenza desiderato impostando la velocità della pompa, si può imporre la portata in entrata e, quindi, il tempo di permanenza τ , secondo l'equazione 1.6. Il terreno e la biomassa in eccesso vengono eliminati dal sistema attraverso l'uscita, costituita da un "troppo pieno". La portata in uscita eguaglia quella in entrata, perciò il volume all'interno del reattore (V_r) è mantenuto costante. La condizione di perfetta miscelazione è garantita dalla presenza di un agitatore magnetico posto sul fondo del reattore e dal sistema di aerazione, permettendo di approssimare il sistema ad un CSTR (*Continuous Stirred-Tank Reactor*). I reattori sono mantenuti ad una temperatura nell'intorno dell'ottimo di crescita, pari a 45°C (Oesterhelt et al., 1999), all'interno di un incubatore termostato (Frigomeccanica Andreaus s.r.l.). In regime di mixotrofia, l'illuminazione continua è stata fornita da una lampada LED bianca impostata all'intensità desiderata e un *bubbling* costante d'aria fornito mediante una pompa (*Oase living water*), e sterilizzata mediante filtro da 0,22 μm installato lungo la linea.

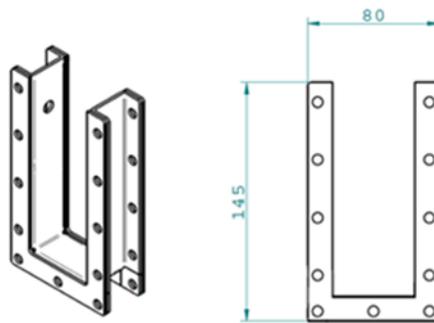


Figura 2.4 Vista isometrica e frontale del fotobioreattore utilizzato per la coltivazione in continuo di *Galdieria sulphuraria* SAG 21.92.

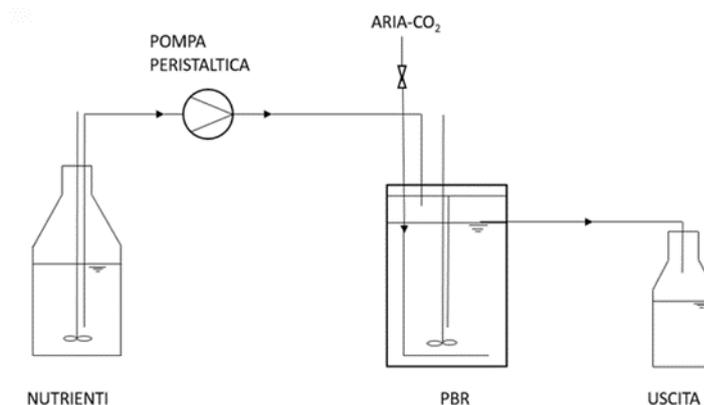


Figura 2.5 Rappresentazione schematica di un reattore in continuo.

Nel corso dello studio in continuo, si è proceduto innanzitutto a investigare gli effetti della concentrazione di carbonio organico in ingresso e del tempo di permanenza sulla crescita della biomassa. Per la concentrazione di carbonio organico equivalente, sono stati selezionati due livelli: 0,6 e 6,0 g_C L⁻¹. Per quanto concerne il tempo di permanenza, sono stati testati i seguenti valori: 0,9, 1,5 e 3 giorni. Gli esperimenti sono stati condotti mantenendo costanti le seguenti condizioni operative: adeguata aerazione, temperatura di 45°C, terreno MAM acidificato a pH 2 mediante acido solforico e arricchito con glucosio. Il glucosio è stato filtrato sotto cappa biologica con filtri da 0,22 μm per garantire l'asepsi, permettendo così di ottenere le concentrazioni di carbonio organico equivalente desiderate. Tutti gli esperimenti sono stati condotti utilizzando un'intensità luminosa incidente pari a 75 μmol m⁻² s⁻¹. A confronto sono stati condotti anche degli esperimenti in autotrofia, alle medesime condizioni tolto il carbonio organico. Le specifiche condizioni testate sono riportate nella Tabella 2.3.

Tabella 2.3 Studio dell'effetto del tempo di permanenza.

| Numero condizioni | Substrato organico | Regime di coltivazione | Concentrazione substrato organico [gc L ⁻¹] | Tempo di permanenza a τ [giorni] | Fonte |
|-------------------|--------------------|------------------------|---|---------------------------------------|------------------|
| 1 | Glucosio | Mixotrofia | 6 | 0,9 | Questa tesi |
| 2 | | | | 1,5 | Questa tesi |
| 3 | | | | 2 | Vivarelli (2023) |
| 4 | | | | 3 | Questa tesi |
| 5 | / | Autotrofia | / | 0,9 | Questa tesi |
| 6 | | | | 1,5 | Questa tesi |
| 7 | | | | 2 | Vivarelli, 2023 |
| 8 | | | | 3 | Questa tesi |

Successivamente, è stato indagato l'effetto combinato dell'intensità luminosa e della disponibilità di carbonio organico sulla crescita della biomassa. Questa analisi ha consentito di esplorare come la variazione simultanea di queste due variabili possa influenzare il metabolismo mixotrofo della specie. Gli esperimenti sono stati condotti mantenendo costanti alcune condizioni operative fondamentali: aerazione adeguata, temperatura di 45°C, utilizzo di terreno MAM acidificato a pH 2 mediante acido solforico e arricchito con glucosio, così da raggiungere le concentrazioni desiderate di carbonio organico equivalente. Inoltre, è stato fissato un tempo di permanenza pari a 1,5 giorni. Le specifiche condizioni sperimentali adottate, che includono le diverse intensità luminose e le concentrazioni di carbonio organico, sono riportate in dettaglio in Tabella 2.4.

Tabella 2.4 Effetto del rapporto intensità luminosa-carbonio organico in regime mixotrofico.

| Numero condizione | Substrato organico | Concentrazione substrato organico [g L⁻¹] | Intensità luminosa I₀ [μmol m⁻² s⁻¹] |
|--------------------------|---------------------------|---|--|
| 9 | Glucosio | 0,6 | 75 |
| 10 | | | 150 |
| 11 | | 1,3 | 75 |
| 12 | | | 150 |
| 13 | | 3,0 | 75 |
| 14 | | | 150 |

2.2.1.2 Sistema IDEA

Le unità di bioreattori IDEA, prodotte da IDEA Bioprocess Technology srls, sono sistemi modulari progettati per coltivazioni in processi batch, fed-batch e continui. La configurazione consiste in quattro moduli in parallelo, garantendo così un'elevata efficienza nella gestione delle prove sperimentali. Ogni modulo di consiste in un bioreattore cilindrico in vetro, e di una camicia esterna riscaldante collegata ad un bagnetto termostatico a circolazione per il controllo della temperatura di lavoro. Da un punto di vista operativo il sistema è stato impiegato per la coltivazione eterotrofica di *Galdieria sulphuraria* in continuo: ciò è stato reso possibile dalla presenza, per ciascun reattore, di una pompa peristaltica per l'aggiunta del terreno di coltura fresco, e di un troppo pieno, che garantisce un volume operativo costante pari a 235 mL. Per mantenere le condizioni di crescita ottimali della specie, il sistema è stato termostato ad una temperatura pari a 45°C. In aggiunta, ogni bioreattore è dotato di un pH-metro integrato e di una linea d'aria sterile con filtro da 0,22 μm, mentre sul fondo del recipiente è presente un agitatore magnetico per garantire una buona miscelazione del mezzo. Come per il setup sperimentale adottato nella sezione 2.2.1.1, il regime operativo permette di approssimare tali reattori a dei CSTR. Il sistema può essere controllato e monitorato

tramite un display, dal quale è possibile regolare il regime delle pompe peristaltiche (e quindi il tempo di permanenza dei reattori) e monitorare in tempo reale il pH. Ai fini sperimentali, sono state realizzate delle coperture esterne che oscurassero la coltura in modo da operare in regime fermentativo, come riportato in Figura 2.6.

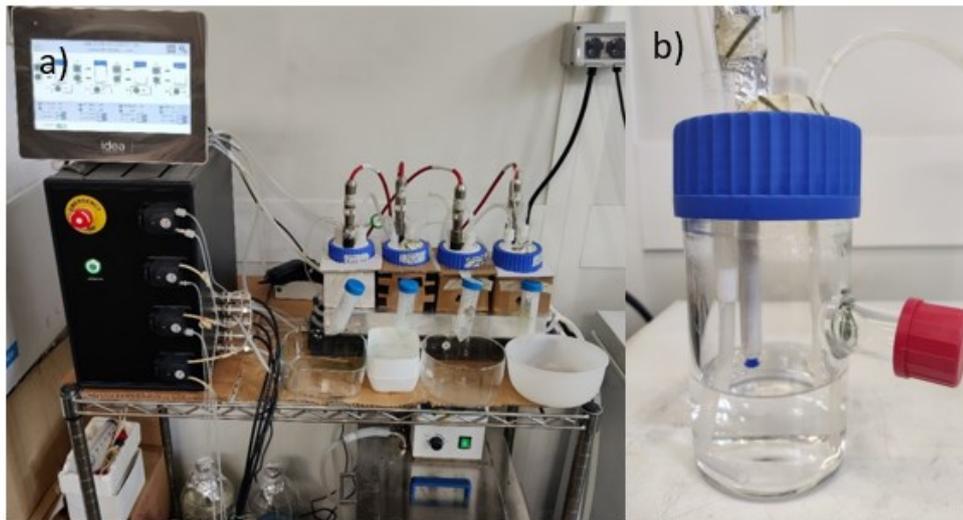


Figura 2.6 a) Sistema IDEA e b) Dettaglio del reattore.

Nella prima fase sperimentale, è stato utilizzato un terreno di coltura MAM, opportunamente modificato con l'aggiunta di carbonio organico alla concentrazione desiderata. Questa modifica è stata eseguita mediante filtrazione sterile attraverso filtri da $0,22\ \mu\text{m}$, sotto cappa biologica. La temperatura è stata mantenuta costantemente intorno al valore ottimale di 45°C . Per queste condizioni sperimentali in continuo, il tempo di permanenza (τ) è stato fissato a 2 giorni, in linea con l'approccio sperimentale "*one-factor-at-a-time*". In primo luogo, è stato investigato l'effetto del pH in ingresso sulle prestazioni di crescita, il terreno è stato acidificato a seguenti valori; 1, 2, 3 e 5. Successivamente, si è valutato l'effetto della concentrazione di carbonio organico equivalente, utilizzando il glucosio come substrato e mantenendo il pH in ingresso a 2, un tempo di residenza di 2 giorni e una temperatura intorno ai 45°C . Infine, l'effetto del substrato, modificando quindi l'origine del carbonio organico è stata condotta utilizzando glucosio, lattosio, galattosio e permeato del latte. La concentrazione di carbonio organico equivalente all'interno del terreno scelta per questi esperimenti è pari di $6\ \text{g C L}^{-1}$ e lasciando invariate le altre variabili sperimentali. Le condizioni testate per la coltivazione eterotrofica in regime continuo sono riportate nella Tabella 2.5.

Tabella 2.5 Panoramica degli esperimenti di coltivazione di *G. sulphuraria* in regime eterotrofico.

| Effetto del pH in ingresso | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|--|-----------------------|-----------------------|
| Numero condizione | Substrato organico | Concentrazione di carbonio organico equivalente [gc L⁻¹] | pH in ingresso | Fonte dei dati |
| 15 | Glucosio | 6,0 | 1 | Questa tesi |
| 3 | | | 2 | Vivarelli (2023) |
| 16 | | | 3 | Questa tesi |
| 17 | | | 5 | Questa tesi |

| Effetto della concentrazione di carbonio organico equivalente [gc L⁻¹] | | | | |
|--|---------------------------|--|-----------------------|-----------------------|
| Numero condizione | Substrato organico | Concentrazione di carbonio organico equivalente [gc L⁻¹] | pH in ingresso | Fonte dei dati |
| 18 | Glucosio | 0,6 | 2 | Questa tesi |
| 19 | | 3,0 | | Questa tesi |
| 3 | | 6,0 | | Vivarelli, (2023) |
| 20 | | 12,0 | | Questa tesi |

Effetto della tipologia di substrato

| Numero condizione | Substrato organico | Concentrazione equivalente di carbonio organico [g _C L ⁻¹] | pH in ingresso | Fonte dei dati |
|-------------------|--------------------|---|----------------|-----------------|
| 3 | Glucosio | 6,0 | 2 | Vivarelli, 2023 |
| 21 | Lattosio | | | Questa tesi |
| 22 | Galattosio | | | Questa tesi |
| 23 | Permeato | | | Questa tesi |

2.2.4 Coltivazione in batch

Per valutare l'efficienza di consumo del substrato organico da parte di *G. sulphuraria* in condizioni eterotrofiche è stato condotto un esperimento in batch, utilizzando delle beute Erlenmeyer da 250 ml (Fig. 2.7). A supporto della crescita è stato integrato un sistema di aerazione di aria sterile, mediante l'impegno di filtri da 0,22 µm, mentre degli agitatori magnetici sono stati impiegati per mantenere le condizioni di perfetta miscelazione. La temperatura è stata regolata a 45°C mediante incubatore termostato. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato biologico, su un volume di partenza pari a 210 mL: di questi, 10 mL di biomassa sono stati adeguatamente diluiti in 200 mL di MAM arricchito con glucosio a 15 g L⁻¹, per ottenere in tutte e tre le repliche un'egual concentrazione di partenza. Gli esperimenti sono poi stati monitorati per sette giorni fino al raggiungimento della fase stazionaria.



Figura 2.7 Esperimenti in batch per la coltivazione eterotrofica di *G. sulphuraria*.

2.3 Monitoraggio della crescita cellulare

2.3.1 Densità ottica

La misurazione della densità ottica (OD) è fondamentale per monitorare la crescita microalgale e valutare la concentrazione cellulare delle colture nel tempo. Questa tecnica sfrutta la legge di *Lambert-Beer*, secondo cui esiste una relazione lineare tra l'assorbanza (A) del campione e la sua concentrazione (C), espressa dall'equazione 2.1:

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (2.1)$$

dove ε è il coefficiente di assorbimento molare, specifico per ogni sostanza e dipendente dalla lunghezza d'onda utilizzata, e l rappresenta il cammino ottico, nel nostro caso di 1 cm. Le misurazioni sono state eseguite utilizzando uno spettrofotometro a doppio raggio (Shimadzu® UV-1900) che, grazie alla divisione del fascio luminoso, consente di misurare simultaneamente sia il campione che il bianco, costituito dal terreno di coltura impiegato negli esperimenti per eliminare il contributo della torbidità del mezzo. Le misure di OD sono state effettuate principalmente a una lunghezza d'onda di 750 nm, scelta per evitare l'assorbimento della luce da parte dei pigmenti fotosintetici come le clorofille e i carotenoidi, che assorbono a lunghezze d'onda inferiori, nel visibile. In questo modo, il valore di assorbanza rilevato è esclusivamente legato alla diffrazione della luce dovuta alle

cellule in sospensione, permettendo una valutazione accurata della crescita biomassa. Tuttavia, sono state eseguite anche misurazioni a 680 nm per determinare l'assorbimento specifico della clorofilla a, che ha il suo picco in questa regione spettrale, offrendo un ulteriore parametro per il monitoraggio della crescita algale. Per garantire che le misurazioni rientrassero nell'intervallo di linearità della legge di *Lambert-Beer*, ossia tra 0,1 e 1, i campioni con valori di assorbanza superiori a 1 sono stati opportunamente diluiti con il terreno di coltura prima della misurazione. Il valore finale è quindi ottenuto moltiplicando il valore misurato per il fattore di diluizione applicato. Ogni misurazione è stata effettuata in doppio per assicurare la precisione dei dati, e i campioni sono stati mescolati prima dell'analisi per evitare la sedimentazione delle cellule, che potrebbe alterare i risultati.

2.3.2 Peso secco

La misura del peso secco (DW) rappresenta uno dei metodi più accurati per determinare la concentrazione di biomassa all'interno di una coltura, espressa in grammi per litro (g L^{-1}). Rispetto alla densità ottica (OD), che offre una risposta rapida sulla crescita cellulare ma poco accurata, il DW consente di ottenere informazioni più precise e rigorose sulla reale quantità di biomassa presente. Questo metodo è utilizzato su base giornaliera durante gli esperimenti batch, mentre negli esperimenti in continuo, è impiegato solamente una volta raggiunta la condizione di stato stazionario della coltura. In quest'ultimo caso, si richiedono almeno quattro misure di DW consecutive che mostrino valori stabili per confermare il regime stazionario. Il protocollo per la determinazione del peso secco prevede diversi passaggi. Innanzitutto, si utilizzano filtri di nitrocellulosa con pori di diametro 0,22 μm (Whatman®) che vengono essiccati in forno a una temperatura compresa tra 105 °C e 110 °C per un periodo di almeno 10-15 minuti, al fine di eliminare l'umidità residua. Successivamente, i filtri vengono pesati su una bilancia ad alta precisione (Atilon Acculab Sartorius Group®) con una sensibilità di 10^{-4} g per ottenere il valore di tara. Il filtro viene posizionato su un imbuto buchner in acciaio connesso ad una beuta da vuoto, grazie alla quale avviene la filtrazione di un volume noto di biomassa: negli esperimenti batch, per non alterare eccessivamente

il volume della coltura, sono stati utilizzati 5 mL, mentre per gli esperimenti in continuo, si è preferito condurre la misura con 10 mL di campione.

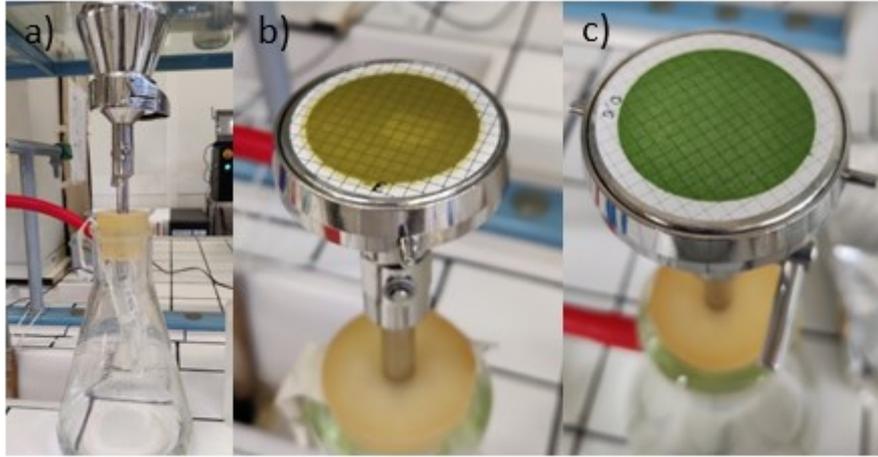


Figura 1.8 a) Beuta da vuoto; b) Peso secco di un campione di *G.sulphuraria* coltivata eterotroficamente; c) Peso secco di un campione in mixotrofia.

Dopo la filtrazione, il filtro contenente la biomassa viene essiccato nuovamente in forno per almeno 2 ore a 105-110 °C, e di seguito pesato per determinare il peso lordo. La concentrazione di biomassa (C_X) viene calcolata utilizzando l'equazione 2.2:

$$DW [g/L] = \frac{\text{Peso lordo} - \text{Tara}}{\text{Volume filtrato}} \quad (2.2)$$

Il campione di filtrato non ritenuto dal filtro viene conservato a -18 °C per ulteriori analisi successive.

2.4 Bilanci di materia ed energia

La produttività di biomassa (P_X) è una misura fondamentale per valutare l'efficienza della crescita cellulare, sia in modalità batch che in continuo. Essa rappresenta la quantità di biomassa prodotta per unità di tempo e volume del reattore e viene calcolata con diverse formule a seconda del sistema di coltivazione adottato. In un sistema batch la produttività di biomassa P_X ($g L^{-1} \text{giorno}^{-1}$) è determinata, in accordo con Minyuk, Sidorov, and Solovchenko (2020), come nell'equazione 2.3:

$$P_{X, \text{Batch}} = \frac{C_{X, \text{Finale}} - C_{X, \text{Iniziale}}}{T_{\text{Finale}} - T_{\text{Iniziale}}} \quad (2.3)$$

dove $C_{X,Finale}$ e $C_{X,Iniziale}$ sono le concentrazioni di biomassa (g L^{-1}) secondo il peso secco negli istanti finali ed iniziali dell'esperimento rispettivamente, mentre $(T_{Finale} - T_{Iniziale})$ è l'intervallo di tempo considerato (giorni). Quest'ultimo si riferisce all'intera durata dell'esperimento batch per la produttività della biomassa.

In un sistema continuo, invece, la produttività si calcola come in equazione 2.4, considerando la concentrazione media di biomassa (C_X) e il tempo di permanenza nel reattore (τ), espresso come:

$$P_{X,CSTR} = \frac{C_X}{\tau} \quad (2.4)$$

Questa modalità assume che la concentrazione di biomassa rimanga costante nel tempo allo stato stazionario. Un parametro correlato alla produttività volumetrica è la resa di biomassa su substrato ($Y_{X|S}$), che indica l'efficienza con cui la biomassa converte il substrato di carbonio organico in biomassa. La resa è calcolata tramite il rapporto tra la concentrazione di carbonio nella biomassa (C_X) e quella fornita alla coltura come substrato (C_S):

$$Y_{X|S} = \frac{[C_X]}{[C_S]} \quad (2.5)$$

Il contenuto carbonio organico immagazzinato nella biomassa, si tratta di una misura di quanto carbonio viene effettivamente assorbito dalle cellule di microalghe (o altra biomassa) rispetto al carbonio disponibile nell'ambiente di coltura. Viene determinato calcolando la differenza tra il carbonio totale presente nel terreno di coltura all'inizio ($C_{C,Coltura}$) e il carbonio che rimane nel terreno dopo il processo di filtrazione ($C_{C,Filtrato}$). La quantità di carbonio accumulata viene quindi normalizzata per la concentrazione di biomassa C_X , per ottenere il parametro q_C come mostrato nell'equazione 2.6.

$$C_{C,Biomassa} = C_{C,Coltura} - C_{C,Filtrato} \quad e \quad q_C = \frac{C_{C,Biomassa}}{C_X} \quad (2.6)$$

Per quanto riguarda l'azoto presente nella biomassa, il calcolo viene fatto in maniera analoga a quanto presentato sopra per il contenuto di carbonio in biomassa. Infatti, tale valore si ottiene dalla normalizzazione della concentrazione di azoto assunta dalla biomassa, come differenza tra quella totale fornita dal terreno ($C_{N,Coltura}$) e

quella residua nel filtrato ($C_{N,Filtrato}$), e la relativa concentrazione di biomassa del sistema C_X . La procedura è presentata in equazione 2.7.

$$C_{N,Biomassa} = C_{N,Coltura} - C_{N,Filtrato} \quad e \quad q_N = \frac{C_{N,Biomassa}}{C_X} \quad (2.7)$$

2.5 Altre misure di monitoraggio della crescita

La *back irradiance* è stata misurata quotidianamente mediante l'impiego di un fotoradiometro (*Delta OHM*). Inoltre il pH è stato monitorato quotidianamente mediante l'impiego del pHmetro *Hanna* (codice HI 9124).

2.6 Misure analitiche

Nel corso della campagna sperimentale, sono state condotte diverse analisi chimiche e biochimiche. Tali analisi sono state eseguite per valutare la quantità di proteine, carboidrati, pigmenti e il rapporto C/N in ciascuna condizione, allo scopo di monitorare i cambiamenti metabolici della microalga *Galdieria sulphuraria* SAG 21.92 alle varie condizioni di crescita.

2.6.1 Carbonio e Azoto totale

L'analisi della concentrazione di carbonio e azoto nei campioni è stata effettuata utilizzando l'analizzatore TOC-LCPH Shimadzu®, dotato di modulo TNM-L per la quantificazione dell'azoto totale (TN). Questo strumento consente la misurazione accurata di carbonio totale (TC), carbonio organico totale (TOC), carbonio inorganico (IC) e azoto totale (TN) attraverso tecniche di combustione ossidativa catalitica e chemiluminescenza. Nel caso del carbonio, i campioni sono sottoposti a combustione a 680°C, trasformando il carbonio organico in CO₂, successivamente quantificato mediante un rilevatore infrarosso non distruttivo (NDIR). Per l'azoto, i campioni vengono trattati a 720°C per convertire tutti i composti azotati in monossido di azoto (NO). Il gas risultante passa nel modulo TNM-L, dove reagisce con ozono (O₃) formando biossido di azoto eccitato (NO₂*). Il ritorno allo stato fondamentale del NO₂* genera radiazione UV, la cui intensità è proporzionale alla

concentrazione di azoto nel campione. Indipendentemente dalla tipologia di analisi che si intende eseguire, lo strumento fornisce i risultati in termini areali, dai quali è possibile risalire ai corrispondenti valori di concentrazione [mg L^{-1}] mediante le opportune curve di calibrazione per ogni tipologia di analisi. A tal proposito, qualora opportuno, i campioni sono stati diluiti in fase preparatoria con acqua Milli-Q per garantire che la loro concentrazione rientrasse nei limiti di sensibilità dello strumento, tarato tra $5 \mu\text{g L}^{-1}$ e 100mg L^{-1} .

2.6.2 Analisi dei pigmenti

Il protocollo per la quantificazione spettrofotometrica di clorofilla a (Chl a) e carotenoidi (Car) prevede il prelievo di 1 ml di campione di biomassa, che viene sottoposto a centrifugazione per 10 minuti a 13500 rpm al fine di separare la biomassa dal surnatante. Previa rimozione di quest'ultimo, il pellet viene risospeso con un isovolume di N, N-dimetilformammide (DMF), un solvente organico in grado di estrarre i pigmenti idrofobici dalla biomassa. Occorre notare che da questo step in poi, il protocollo prevede di lavorare il più possibile al riparo dalla luce per evitare la degradazione dei pigmenti, fotosensibili. Per completare l'estrazione, i campioni vengono quindi conservati a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ per almeno 24 ore. Si procede in seguito con un'ulteriore centrifugazione alle condizioni di cui sopra, in modo tale da separare il surnatante contenente i pigmenti dalla biomassa residua. Il surnatante viene quindi prelevato, eventualmente diluito con DMF (nel caso in cui l'assorbanza del campione di partenza sia maggiore di 1), posto in cuvette di quarzo e analizzato mediante spettrofotometro (Shimadzu® UV-1900) in un range di lunghezze d'onda compreso tra 350 e 750 nm, utilizzando come bianco di riferimento il DMF. La quantificazione analitica dei pigmenti viene infine ottenuta applicando le seguenti equazioni (Wellburn 1994) ai dati di assorbanza a specifiche lunghezze d'onda:

$$Chla [\mu\text{g mL}^{-1}] = (Abs_{664} - Abs_{750}) \cdot D \cdot \varepsilon \cdot \left(\frac{V_{DMF}}{V_{biomassa}} \right) \quad (2.9)$$

$$Car [\mu\text{g mL}^{-1}] = [(Abs_{461} - Abs_{750}) - (Abs_{664} - Abs_{750})] \cdot D \cdot \varepsilon \cdot \left(\frac{V_{DMF}}{V_{biomassa}} \right) \quad (2.10)$$

In queste equazioni, ϵ è il coefficiente di assorbimento molare, che per la clorofilla ha un valore di 11,92, mentre per i carotenoidi di 4. Il parametro D invece rappresenta il fattore di diluizione.

2.6.3 Determinazione del contenuto proteico

Per l'estrazione e quantificazione delle proteine nelle alghe verdi, è stato utilizzato il saggio BCA, come descritto da (Smith et al. 1985). Un campione di 1 mL, opportunamente diluito, viene centrifugato a 13.500 rpm per 10 minuti. Dopo la rimozione del surnatante, il pellet cellulare rimanente viene risospeso in 1 mL di NaOH 1M e successivamente sottoposto a bollitura a 100°C per 30 minuti per favorire la lisi cellulare e la solubilizzazione delle proteine. Dopo questa fase, i campioni vengono centrifugati nuovamente a 1.500 rpm per 1 minuto per far depositare il pellet. Si prelevano 50 μ L di surnatante, che vengono aggiunti a 1 mL di reagente BCA, preparato miscelando solfato di rame e acido bicinconinico (BCA) in un rapporto 1:50 v/v. Una volta aggiunto il reagente, i campioni vengono incubati a 60°C per 15 minuti, necessari per permettere alle proteine e ai peptidi nel campione di ridurre gli ioni rameici (Cu^{2+}) a rameosi (Cu^+) in ambiente alcalino, che formano poi un complesso color porpora con l'acido bicinconinico. L'assorbanza di tali campioni reagiti viene misurata utilizzando uno spettrofotometro impostato alla lunghezza d'onda di 562 nm, alla quale l'addotto BCA- Cu^+ mostra il massimo di assorbimento. La concentrazione proteica viene calcolata utilizzando la corrispondente retta di calibrazione, ottenuta da prove su soluzioni standard di albumina di siero bovino (BSA). La retta di calibrazione è descritta dall'equazione 2.11 e Figura 2.11:

$$C_{Proteine} (\mu\text{g mL}^{-1}) = 1144,2 \cdot Abs_{562} - 85,12 \quad \text{con} \quad R^2 = 0,998 \quad (2.11)$$

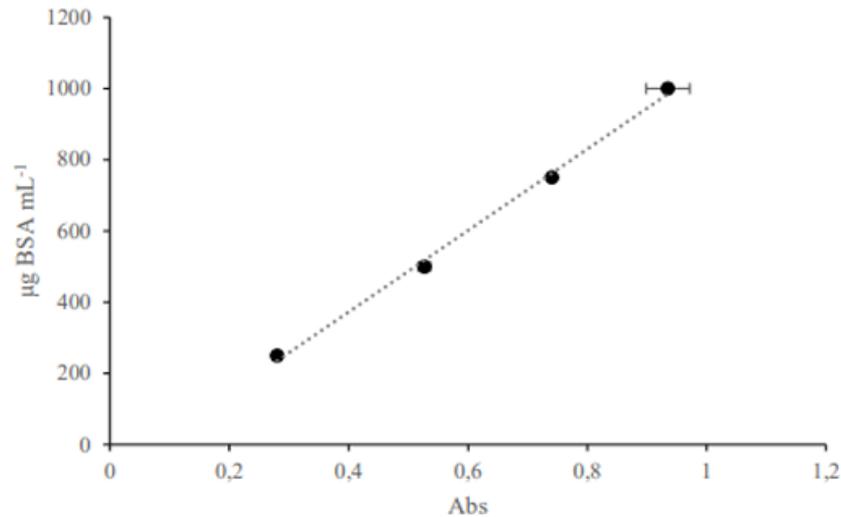


Figura 2.11 Retta di taratura per la quantificazione delle proteine in *Galdieria sulphuraria*.

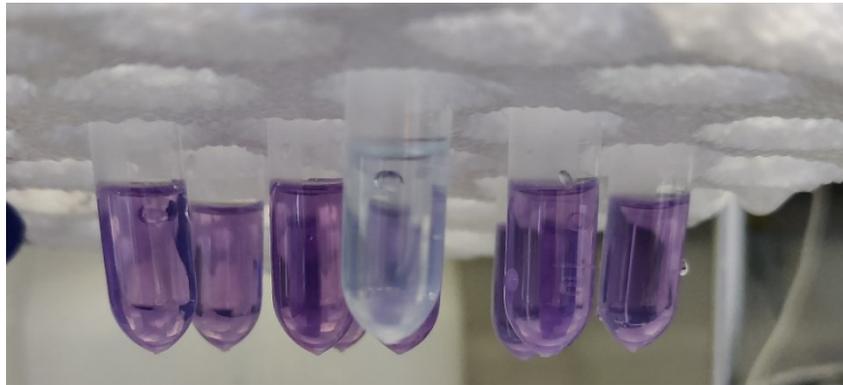


Figura 2.12 Immagine di campioni di proteine di *G. sulphuraria*. a seguito della reazione colorimetrica. Notare come i campioni di biomassa reagiti presentino colorazione violacea, mentre il bianco mantiene una colorazione differente in quanto non è interessato da alcuna reazione.

Successivamente sulla base della concentrazione di proteine, viene calcolata la **resa proteica** $Y_{Proteine|X}$ [$\text{g}_{\text{proteine}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$] come rapporto tra la quantità totale di proteine estratte $C_{Proteine}$ [$\mu\text{g mL}^{-1}$] e la biomassa iniziale C_X , come in equazione 2.12.

$$Y_{Proteine|X} = \frac{C_{Proteine}}{C_X} \quad (2.12)$$

Specificatamente per gli esperimenti in continuo, è possibile anche ricavare la produttività proteica $P_{Proteine}$, [$\text{mg L}^{-1} \text{giorno}^{-1}$], che si determina generalmente come il prodotto della concentrazione proteica specifica $C_{Proteine}$ [$\mu\text{g mL}^{-1}$] e il tasso di diluizione D [giorni^{-1}], come in equazione 2.13.

$$P_{Proteine} = C_{proteine} \cdot D \quad (2.13)$$

2.6.4 Determinazione del contenuto di carboidrati

L'analisi quantitativa dei carboidrati interni alla biomassa è stata eseguita utilizzando il metodo chimico dell'antrone. Si tratta di un metodo colorimetrico che prevede la reazione dei carboidrati con una soluzione composta da 2 g L⁻¹ di antrone, 71% v/v di acido solforico e 29% v/v di acqua deionizzata, e che porta alla formazione di un composto colorato che può essere rilevato spettrofotometricamente.

Nello specifico, il protocollo prevede il prelievo di 100 µL di campione opportunamente diluito a cui vengono aggiunti 900 µL di reagente (il bianco di riferimento è invece costituito da 100 µL di acqua deionizzata). I campioni vengono quindi posti in un bagnetto termostato a 100°C per 10 minuti. A questa temperatura l'acido solforico idrolizza i polisaccaridi in monosaccaridi, i quali subiscono disidratazione producendo idrossimetilfurfurale (HMF). Quest'ultimo reagisce con l'antrone producendo un complesso colorato verde-bluastro che viene successivamente misurato allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 625 nm. Dal valore di assorbanza risultante, la concentrazione effettiva dei carboidrati viene calcolata utilizzando una retta di taratura (in equazione 2.14) ottenuta utilizzando concentrazioni note di glucosio.

$$C_6H_{12}O_6 [g L^{-1}] = 0,2024 * Abs_{625} + 0,0132 \quad (2.14)$$

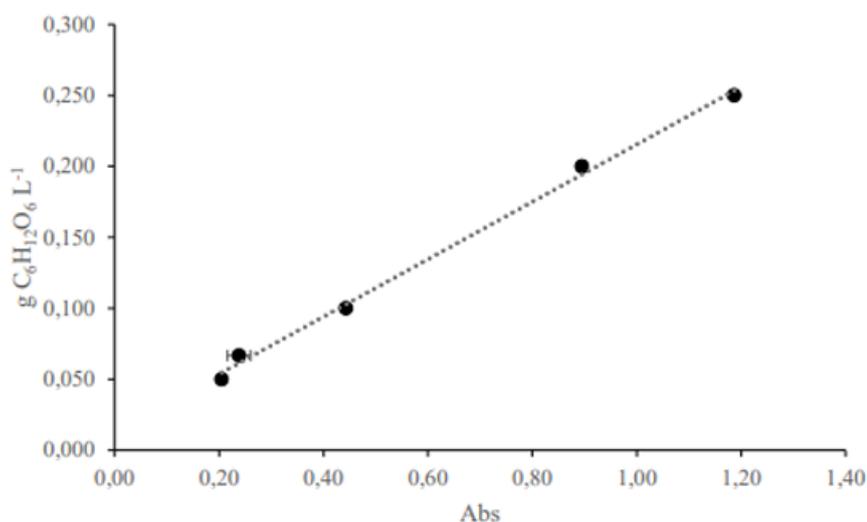


Figura 2.13 Retta di taratura per la quantificazione dei carboidrati in *G. sulphuraria*.

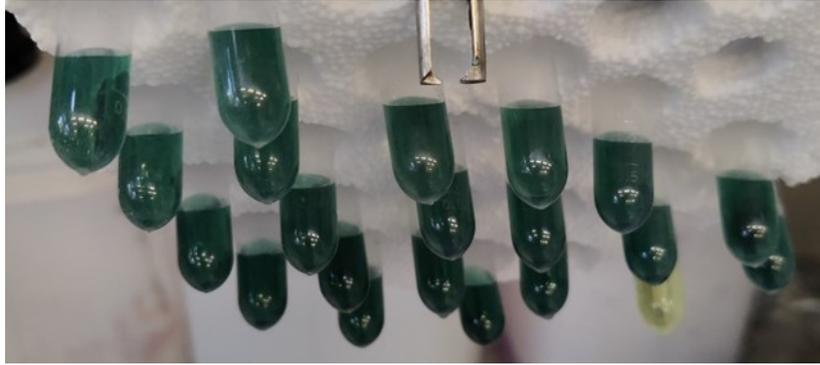


Figura 2.14 Immagine dei campioni di carboidrati di *G. sulphuraria* a seguito della reazione colorimetrica. Notare come i campioni di biomassa reagiti presentino colorazione verde, mentre il bianco mantiene una colorazione differente in quanto non è interessato da alcuna reazione.

Dato che questo protocollo è stato condotto su condizioni che coinvolgevano substrati organici già presenti nei terreni di coltura, al fine di poter stimare correttamente il contenuto di carboidrati nella biomassa è stato necessario eliminare il contributo fornito da tali fonti, mediante delle analisi preliminari ad hoc sui mezzi stessi. Inoltre, i risultati ottenuti permettono di derivare la **resa di carboidrati sulla biomassa** $Y_{Carbo|X}$ [$\text{g}_{\text{carboidrati}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$] in equazione (2.16), che si tratta di un parametro importante per valutare la capacità dell'alga di convertire i nutrienti disponibili in carboidrati, riportando il valore per unità di biomassa secca:

$$Y_{Carbo|X} = \frac{C_{Carboidrati}}{C_X} \quad (2.16)$$

dove $C_{Carboidrati}$ è la quantità di carboidrati [$\text{g}_{\text{Carboidrati}} \text{L}^{-1}$].

2.7 Analisi statistica

Le analisi statistiche dei dati sperimentali sono state eseguite utilizzando il software MINITAB®, con l'obiettivo di valutare la significatività delle differenze osservate tra le condizioni sperimentali. In primo luogo, è stato applicato un test ANOVA a una via (one way ANOVA) per confrontare le medie delle variabili d'interesse in condizioni con varianze omogenee. In presenza di differenze significative tra le medie, è stato utilizzato il test di Tukey per identificare quali gruppi si distinguessero tra loro. In questi casi, la significatività statistica è stata fissata a un p-value < 0,05, corrispondente a un livello di confidenza del 95%. Quando il requisito di omogeneità delle varianze non risultava soddisfatto, si è ricorsi al test non parametrico di Kruskal-Wallis, un'alternativa all'ANOVA che consente di

confrontare medie in condizioni di varianze disuguali, garantendo un'analisi robusta anche in tali situazioni. Per rappresentare graficamente i risultati, il test di Tukey è stato utilizzato anche per creare gruppi di confronto, mantenendo costante il livello di confidenza al 95%.

Capitolo 3: Risultati

3.1 Effetto del tempo di permanenza in reattori continui

Il tempo di permanenza rappresenta una variabile operativa fondamentale nei sistemi di coltivazione continua, poiché può essere regolata dall'operatore in base alle specifiche esigenze di processo. Esso viene calcolato come rapporto tra il volume del reattore e la portata volumetrica in ingresso, e costituisce una delle principali variabili che influenzano la produttività di biomassa microalgale. Comprendere l'effetto del tempo di permanenza sulla produttività è cruciale per ottimizzare le condizioni di crescita delle microalghe. A tal fine, sono stati condotti esperimenti per analizzare l'impatto della variazione del tempo di permanenza sulla concentrazione media di biomassa e sulla produttività, impiegando tutti e tre i meccanismi trofici: autotrofico, eterotrofico e mixotrofico. È importante sottolineare che, in questo confronto, i dati riguardanti gli esperimenti in eterotrofia sono stati ricavati dal lavoro di Vivarelli (2023).

3.1.1 Autotrofia

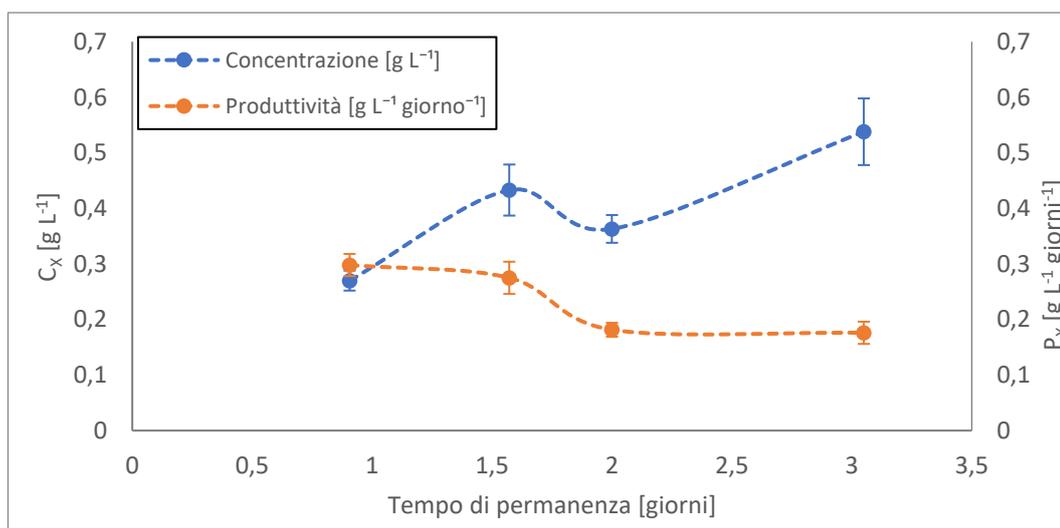


Figura 3.1 Andamento C_X e P_X in autotrofia in funzione del τ , Le linee tratteggiate sono state aggiunte per identificare meglio gli andamenti delle variabili.

Il grafico mostra l'andamento della concentrazione di biomassa (C_X) e della produttività di biomassa (P_X) in funzione del tempo di permanenza (τ) in condizioni autotrofiche, evidenziando una relazione inversa tra le due variabili. In generale, all'aumentare del tempo di permanenza si osserva un incremento progressivo della concentrazione di biomassa (C_X) (Ramos Tercero et al. 2014), mentre la produttività (P_X) tende a diminuire, un fenomeno comune nelle colture continue di microalghe in autotrofia, dove l'effetto di auto-ombreggiamento limita la produttività con tempi di permanenza più elevati (Tang et al. 2012). Per quanto riguarda C_X , questo andamento risulta caratteristico dell'effetto del tempo di permanenza sull'accumulo di biomassa. Trend analoghi sono stati riscontrati anche per altre specie con rese e tempi di permanenza differenti in base alla specie (Borella et al., 2021; Peter et al. 2022). A tempi di permanenza brevi, la concentrazione di biomassa aumenta in modo significativo: si passa da circa $0,27 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ a τ 0,9 giorni fino a $0,54 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ a τ 3 giorni. Con l'aumentare del tempo di permanenza, tuttavia, l'aumento di C_X tende a stabilizzarsi. A τ uguale a 3 giorni la concentrazione raggiunge un massimo di circa $0,54 \text{ g L}^{-1}$, indicando una stabilizzazione. Questo andamento potrebbe risultare asintotico, ovvero oltre un certo tempo di permanenza, l'accumulo di biomassa non aumenta in modo proporzionale, poiché il sistema si avvicina a un equilibrio dove le risorse e le condizioni di crescita iniziano a limitare ulteriori aumenti significativi. Tuttavia, il punto corrispondente a τ di 2 giorni si discosta da questo ipotetico andamento asintotico, probabilmente a causa di problematiche accorse durante tale condizione sperimentale. Per verificare l'affidabilità di questo dato e confermare la validità del trend, sarebbe opportuno ripetere l'esperimento in queste condizioni. In termini di produttività di biomassa (P_X), si osserva una tendenza inversa. Uno dei pochi studi presenti in letteratura condotti in condizioni di coltivazione continua su *Galdieria sulphuraria*, realizzato da Baer et al. (2016) a un tempo di permanenza (τ) di 1,44 giorni, ha riportato una produttività areale massima di $0,30 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$, ottimizzando lo spettro della radiazione luminosa. Concludendo che la massima produzione di biomassa per tale specie, si ottiene sotto illuminazione con luce rossa (625 nm), mentre la luce verde (525 nm) e blu (490 nm) portano a una ridotta produzione di biomassa (Baer et al. 2016; Buckeridge 2022). Tuttavia, questi risultati risultano inferiori rispetto a quelli ottenuti nel presente studio.

Con l'aumentare del tempo di permanenza, la produttività diminuisce gradualmente, fino a raggiungere un minimo di circa $0,17 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$ a τ 3 giorni. Come anticipato sopra, il calo riflette l'effetto dell'auto-ombreggiamento nella cultura, dove la densità cellulare crescente riduce la disponibilità di luce per ciascuna cellula, limitando l'efficienza fotosintetica complessiva (Sloth et al., 2006 Sforza et al., 2015). Inoltre, un tempo di permanenza prolungato riduce il ricambio del substrato e dei nutrienti, essenziale per sostenere elevati tassi di crescita. Precedenti studi in letteratura hanno riportato andamenti simili C_X e P_X in funzione del tempo di permanenza τ anche per altre specie microalgali. Tuttavia, emerge chiaramente che gli effetti del tempo di permanenza e dell'intensità luminosa sulla crescita e sulla produttività sono fortemente specie-specifici (Borella, Sforza, et al. 2021). Nonostante ciò, il tempo di permanenza svolge un ruolo cruciale e generale nel determinare le prestazioni complessive del sistema, influenzando in modo significativo i parametri di crescita indipendentemente dalla specie considerata (McGinn et al. 2012; Pastore et al. 2018). La Tabella 3.1 offre una panoramica dettagliata dei valori medi di C_X e P_X per diversi tempi di permanenza (τ), con le rispettive deviazioni standard e i risultati dell'analisi statistica.

Tabella 3.1 Andamento C_X e P_X in autotrofia in funzione del τ . Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| Tempo di permanenza τ [giorni] | C_X [g L ⁻¹] | P_X [g L ⁻¹ giorni ⁻¹] | Fonte |
|--|----------------------------|---|-------------|
| 0,9 | $0,27 \pm 0,02^A$ | $0,3 \pm 0,02^D$ | Questa tesi |
| 1,5 | $0,43 \pm 0,05^B$ | $0,28 \pm 0,03^E$ | Questa tesi |
| 2 | $0,36 \pm 0,03^{AB}$ | $0,18 \pm 0,01^F$ | Questa tesi |
| 3 | $0,54 \pm 0,06^D$ | $0,17 \pm 0,02^E$ | Questa tesi |

In sintesi, questi dati confermano l'esistenza di un equilibrio ottimale nel tempo di permanenza. Un valore di τ pari a 1,5 giorni si configura come il compromesso ideale per ottenere sia una buona concentrazione di biomassa (C_X) sia una produttività (P_X) relativamente elevata, ottimizzando l'accumulo di biomassa senza compromettere in modo eccessivo la produttività complessiva del sistema.

3.1.2 Mixotrofia

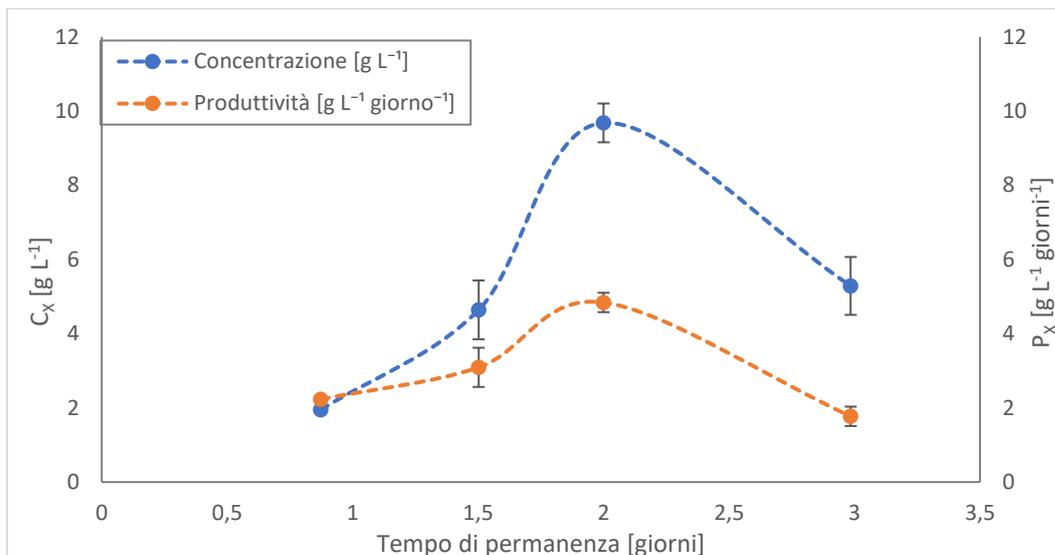


Figura 3.2 Andamento C_X e P_X in mixotrofia in funzione del τ . Le linee tratteggiate sono state aggiunte per identificare gli andamenti delle variabili in questione.

Il grafico mostra l'evoluzione della concentrazione di biomassa (C_X) e della produttività (P_X) in funzione del tempo di permanenza (τ) in condizioni di coltivazione mixotrofica. A differenza dei precedenti esperimenti in autotrofo, si osserva un andamento a campana per C_X : inizialmente, la concentrazione di biomassa cresce rapidamente con l'incremento di τ , passando da circa $1,95 \text{ g L}^{-1}$ a τ di 0,9 giorni a un picco di circa $9,68 \text{ g L}^{-1}$ a τ di 2 giorni. Questo incremento iniziale suggerisce che tempi di permanenza moderati permettano alle cellule di accumulare biomassa in modo efficiente, favoriti da una disponibilità prolungata di nutrienti e di tempo per la crescita. Tuttavia, oltre questo valore ottimale di τ , si nota una riduzione della concentrazione di biomassa, che scende a circa $5,29 \text{ g L}^{-1}$ a τ di 3 giorni. Questo comportamento indica che tempi di permanenza eccessivi potrebbero non essere altrettanto vantaggiosi, forse a causa di una limitazione nella disponibilità di nutrienti freschi o di accumuli di sostanze di scarto nel sistema. Il trend della produttività (P_X) mostra un comportamento molto simile rispetto a C_X , con un picco a tempi di permanenza intermedi e una riduzione a τ prolungati. In particolare, P_X raggiunge il massimo a τ di 2 giorni, con un valore di circa $4,84 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$, evidenziando come questo sia il tempo di permanenza ottimale per sostenere un'elevata produttività. Il valore ottimale di P_X a τ di 2 giorni rappresenta un equilibrio tra l'apporto di nutrienti organici, la capacità delle cellule di utilizzarli

efficientemente, e il ricambio del mezzo. Oltre questo punto, con un aumento del tempo di permanenza a 3 giorni, la produttività scende a circa $1,77 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$. Questo calo può essere interpretato come il risultato di un basso tasso di diluizione che limita il rinnovamento del substrato e dei nutrienti essenziali, riducendo quindi la capacità delle cellule di mantenere un elevato tasso di crescita.

Tabella 3.2 Andamento C_X e P_X in mixotrofia in funzione del τ . Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| Tempo di permanenza τ [giorni] | C_X [g L ⁻¹] | P_X [g L ⁻¹ giorni ⁻¹] | Fonte |
|--|----------------------------|---|------------------|
| 0,9 | $1,95 \pm 0,06^A$ | $2,23 \pm 0,06^D$ | Questa tesi |
| 1,5 | $4,64 \pm 0,79^B$ | $3,09 \pm 0,53^E$ | Questa tesi |
| 2 | $9,68 \pm 0,52^C$ | $4,84 \pm 0,26^F$ | Vivarelli (2023) |
| 3 | $5,29 \pm 0,78^B$ | $1,77 \pm 0,26^G$ | Questa tesi |

In conclusione, il tempo di permanenza ottimale di 2 giorni rappresenta un compromesso ideale per massimizzare sia la concentrazione di biomassa che la produttività in condizioni di coltivazione mixotrofica. Questo intervallo temporale permette di ottenere i rendimenti massimi, bilanciando l'apporto di nutrienti e il tempo di utilizzo da parte delle cellule. Tuttavia, a tempi di permanenza inferiori o superiori a questa soglia, la produttività e l'accumulo di biomassa tendono a ridursi, evidenziando come la scelta del τ sia una variabile critica per ottimizzare le performance complessive del sistema di coltivazione.

3.1.3 Confronto dei meccanismi trofici: Autotrofia, Mixotrofia ed Eterotrofia

3.1.3.1 Produttività di biomassa

Il Grafico 3.3 illustra l'andamento di produttività di biomassa P_X , espressa in $\text{mg L}^{-1}\text{giorno}^{-1}$, per i tre meccanismi trofici (autotrofia, eterotrofia e mixotrofia) in funzione del tempo di permanenza. Questi dati, in combinazione con la Tabella 3.3, che riporta i valori medi di P_X allo stato stazionario, offrono una visione completa dell'influenza delle diverse condizioni trofiche e dei tempi di permanenza sulle performance di crescita.

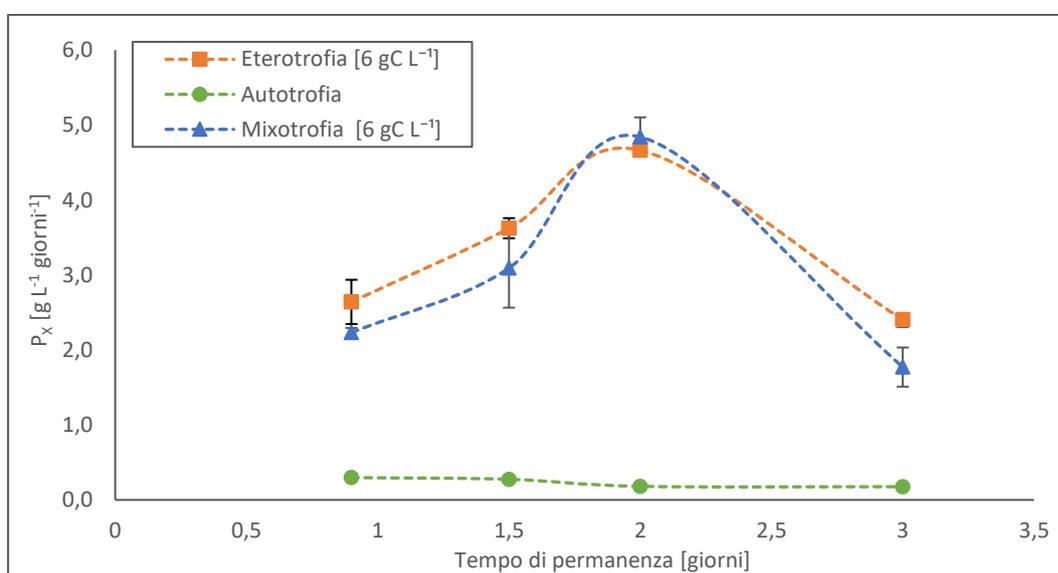


Figura 3.3 Andamento P_X in autotrofia, mixotrofia ed eterotrofia in funzione del τ . Le linee tratteggiate sono state aggiunte per identificare meglio gli andamenti delle variabili.

Il grafico confronta l'andamento della produttività areale di biomassa (P_X) in funzione del tempo di permanenza (τ) per tre diverse modalità metaboliche: autotrofia. Per quanto riguarda le condizioni in eterotrofia e mixotrofia, sono state condotte alla stessa concentrazione iniziale di carbonio organico pari a 6 gC L^{-1} . La produttività volumetrica di biomassa durante la crescita autotrofa a τ 1,5 è rispettivamente 11 e 13 volte inferiore rispetto a quella osservata nelle modalità mixotrofa ed eterotrofa. Questo risultato evidenzia la limitata capacità delle cellule di questa specie di crescere in condizioni esclusivamente fotoautotrofe, in cui la luce è l'unico fattore energetico disponibile per supportare la fotosintesi. Tali differenze sono state riscontrate in modo analogo in uno dei pochi lavori presenti

in letteratura condotto in modalità continua con *Galdieria sulphuraria* da Buckeridge (2022). La scarsa produttività osservata è probabilmente legata all'intensità luminosa limitata o all'efficienza intrinseca del metabolismo autotrofo, che risulta meno performante rispetto ai metabolismi che possono sfruttare il carbonio organico disponibile. La crescita mixotrofa e quella eterotrofa, invece, mostrano una produttività areale notevolmente superiore, il che suggerisce che la presenza di carbonio organico come fonte energetica principale (eterotrofia) o combinata con l'energia derivante dalla fotosintesi (mixotrofia) consente una maggiore efficienza nel supportare la crescita cellulare. Tale differenza tra il meccanismo autotrofico e quelli eterotrofo e mixotrofo, osservata negli esperimenti condotti in continuo, è stata riscontrata anche nel lavoro Buckeridge (2022) a τ 8 giorni, con rispettivamente una produttività di $0,08 \pm 0,01$, $0,12 \pm 0,01$ e $0,19 \pm 0,2$ $\text{g L}^{-1}\text{giorni}^{-1}$. Un'analisi più approfondita dei trend di mixotrofia ed eterotrofia rivela un andamento analogo tra le due modalità metaboliche. Entrambe mostrano un incremento della produttività (P_X) con l'aumentare del tempo di permanenza, raggiungendo un valore massimo a τ 2 giorni, seguito da una diminuzione per tempi di permanenza superiori. Di conseguenza, il comportamento della coltura in mixotrofia tende a rispecchiare quello osservato in eterotrofia, come confermato dall'analisi statistica. Questo a causa dell'incapacità di sfruttare appieno il potenziale del regime mixotrofico in tali condizioni (Abiusi, Moñino Fernández, et al. 2022; Zhu et al. 2023). Tuttavia queste osservazioni sono in contrasto con il lavoro presentato da Buckeridge (2022), la produttività di biomassa coltivata in condizioni mixotrofiche risultava essere più del doppio rispetto a quella osservata in condizioni eterotrofiche. È importante sottolineare che le loro condizioni sperimentali prevedevano una concentrazione di glucosio pari a $1,8 \text{ g L}^{-1}$ (equivalente a $0,72 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$) e un'intensità luminosa di $94,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A queste condizioni, l'accumulo di biomassa risultava limitato dalla disponibilità di glucosio, che veniva completamente consumato. In tale condizione di limitazione da substrato organico, e in combinazione a un'intensità luminosa maggiore ha permesso di ottenere una mixotrofia pura, con un contributo significativo della fotosintesi al metabolismo cellulare (Buckeridge 2022). Al contrario, il comportamento simile tra il metabolismo eterotrofo e mixotrofo osservato in questo lavoro suggerisce che, in entrambe le modalità, la disponibilità di carbonio organico

rappresenti il fattore dominante nel supportare la crescita cellulare. Questa eccessiva abbondanza del substrato organico sembra sopprimere il contributo dalla fotosintesi in *Galdieria sulphuraria*. In presenza di glucosio, l'evoluzione di O₂ è stata repressa anche nelle cellule illuminate come riscontrato da Oesterhelt et al. (2007). Il confronto evidenzia significative differenze nei valori di produttività (P_X) tra autotrofia, eterotrofia e mixotrofia ai vari tempi di permanenza (τ) con queste ultime che garantiscono produttività significativamente maggiori grazie all'uso del carbonio organico come fonte energetica. Questi risultati sottolineano l'importanza di ottimizzare i tempi di permanenza e le condizioni operative per massimizzare la produttività in sistemi etero- e mixotrofici.

Tabella 3.3 Valori di P_X in autotrofia, eterotrofia e mixotrofia in funzione del τ . Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| Tempo di permanenza τ [giorni] | Autotrofia | Mixotrofia | Eterotrofia |
|--|---|---|---|
| | P_X [gL ⁻¹ giorni ⁻¹] | P_X [gL ⁻¹ giorni ⁻¹] | P_X [gL ⁻¹ giorni ⁻¹] |
| 0,9 | 0,30 ± 0,02 ^A | 2,23 ± 0,06 ^C | 2,64 ± 0,30 ^D |
| 1,5 | 0,28 ± 0,03 ^A | 3,09 ± 0,53 ^E | 3,62 ± 0,14 ^E |
| 2 | 0,18 ± 0,01 ^B | 4,84 ± 0,26 ^G | 4,66 ± 0,06 ^G |
| 3 | 0,18 ± 0,02 ^B | 1,77 ± 0,26 ^I | 2,40 ± 0,09 ^D |

Questi risultati, supportati dai dati di Vivarelli (2023) per l'eterotrofia, suggeriscono che la selezione del regime trofico e la regolazione del tempo di permanenza siano fattori determinanti per ottimizzare la produttività di biomassa. La letteratura attuale supporta collettivamente il grande potenziale della coltura mixotrofica nel migliorare la produttività della biomassa e dei bioprodotto microalgali con sinergia del metabolismo della luce e dei carboni organici (Pang et al. 2019). La mixotrofia, se opportunamente supportata da un bilanciamento tra fonti di carbonio organico e inorganico e da condizioni luminose adeguate, emerge come la strategia preferibile per sistemi di coltivazione intensivi, offrendo una flessibilità superiore che può essere sfruttata efficacemente per la produzione di pigmenti, come dimostrato nella sezione 3.5.

3.1.4 Analisi comparativa del contenuto di clorofilla nei tre meccanismi trofici

Il Grafico 3.4 illustra la concentrazione di clorofilla totale, espressa in mg L^{-1} , per i tre meccanismi trofici (autotrofia, eterotrofia e mixotrofia) in funzione del tempo di permanenza. Questi dati, in combinazione con la Tabella 3.5, che riporta la clorofilla normalizzata sulla biomassa, offrono una visione completa dell'influenza delle diverse condizioni trofiche e dei tempi di permanenza sulla produzione di clorofilla.

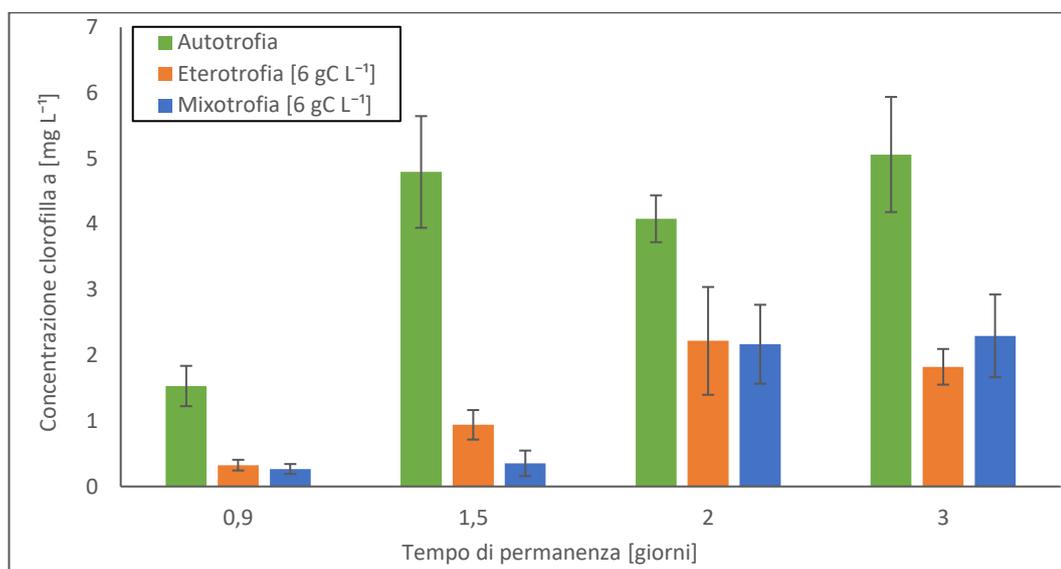


Figura 3.4 Contenuto clorofilla totale espressa mg L^{-1} per i tre meccanismi trofici (autotrofia, eterotrofia e mixotrofia) in funzione del tempo di permanen

Tabella 3.5 Clorofilla normalizzata sulla biomassa con confronto tra i diversi meccanismi trofici, in funzione del tempo di permanenza. Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| Contenuto di clorofilla [mg g^{x-1}] | | | |
|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Tempo di permanenza τ [giorni] | Autotrofia | Eterotrofia | Mixotrofia |
| 0,9 | 5,67 ± 0,76 ^A | 0,14 ± 0,02 ^D | 0,14 ± 0,04 ^D |
| 1,5 | 11,07 ± 0,79 ^B | 0,17 ± 0,04 ^D | 0,08 ± 0,03 ^D |
| 2 | 11,24 ± 0,21 ^B | 0,24 ± 0,09 ^{DE} | 0,22 ± 0,05 ^E |
| 3 | 9,41 ± 0,58 ^C | 0,26 ± 0,03 ^E | 0,43 ± 0,06 ^F |

In condizioni **autotrofiche**, la concentrazione di clorofilla raggiunge un picco significativo a τ 2 giorni, superando i 5 mg L⁻¹. La Tabella 3.5 conferma questo andamento, mostrando un valore massimo di clorofilla normalizzata di 11,24 mg g^{x-1}. Questo risultato suggerisce che un tempo di permanenza di 2 giorni sia ottimale per la produzione di clorofilla in condizioni di esposizione alla luce. Superato questo tempo, la concentrazione di clorofilla diminuisce, scendendo a circa 4,5 mg L⁻¹ a τ 3 giorni, con un contenuto normalizzato di 9,41 mg g^{x-1}. Tale calo può essere attribuito a effetti di auto-ombreggiamento e alla competizione per la luce tra le cellule, che riducono l'efficacia fotosintetica. L'analisi statistica evidenzia differenze significative tra i vari tempi di permanenza, confermando che l'accumulo massimo di clorofilla si ottiene intorno ai 1,5-2 giorni. In **eterotrofia**, la concentrazione di clorofilla resta molto bassa e stabile a tutti i tempi di permanenza, con valori compresi tra circa 0,1 e 0,2 mg L⁻¹. La stabilità di questi valori, come riportato in Tabella 3.5, conferma la mancata esigenza di clorofilla in assenza di luce. Le cellule eterotrofiche, non dovendo effettuare fotosintesi, non richiedono elevate quantità di pigmenti fotosintetici (Buckeridge 2022; Graziani et al. 2012; Salbitani et al., 2020). In condizioni **mixotrofiche** la concentrazione di clorofilla aumenta progressivamente con l'aumento del tempo di permanenza, passando da circa 0,3 mg L⁻¹ a τ 0,9 giorni fino a quasi 2 mg L⁻¹ a τ 3 giorni. La Tabella 3.5 mostra un incremento analogo nel contenuto di clorofilla normalizzata, da 0,14 mg

gX^{-1} a $0,43 \text{ mg gX}^{-1}$. Questo andamento suggerisce che, in mixotrofia, l'attuale rapporto tra carbonio organico e luce, caratterizzato da un eccesso di carbonio organico, non consenta alle cellule di sfruttare appieno il loro apparato fotosintetico. Per *G. sulphuraria*, così come per *G. partita*, è stato riportato che il glucosio riduce il numero di pigmenti fotosintetici (Stadnichuk et al. 1998). Di conseguenza, la sintesi di clorofilla, pur sufficiente a sostenere una fotosintesi di base, tuttavia rimane significativamente inferiore rispetto ai livelli osservati in autotrofia pura. Questo squilibrio porta a performance in termini di produzione di pigmenti che risultano sorprendentemente simili a quelle dell'eterotrofia, dove la fotosintesi è completamente inattiva. L'eccesso di carbonio organico sembra dunque condizionare negativamente la capacità delle cellule di attivare pienamente i processi fotosintetici, come osservato in precedenza da limitandone il contributo alla crescita complessiva, come osservato in precedenza da (Oesterhelt et al. 2007; Zhu et al. 2023).

3.1.5 Analisi comparativa del contenuto di carotenoidi nei tre meccanismi trofici

Il Grafico 3.5 mostra invece la concentrazione di carotenoidi in funzione del tempo di permanenza nei tre regimi trofici, un andamento che riflette le diverse strategie cellulari per adattarsi alla luce e alle fonti di carbonio, ulteriormente dettagliato nella Tabella 3.6.

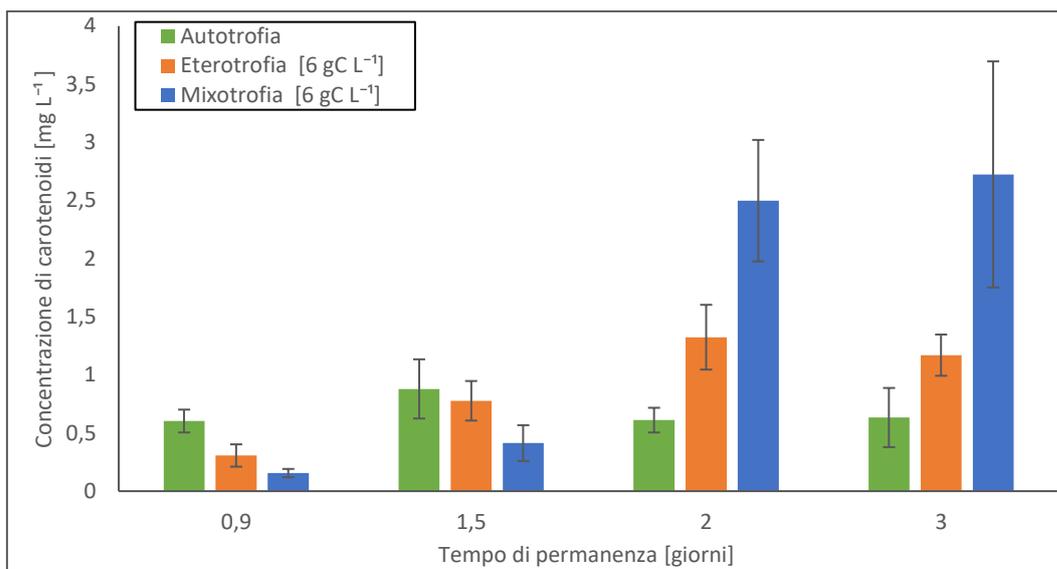


Figura 3.5 Contenuto carotenoidi totali espressa mg L⁻¹ per i tre meccanismi trofici (autotrofia, eterotrofia e mixotrofia) in funzione del tempo di permanenza.

Tabella 3.6 Carotenoidi normalizzata sulla biomassa con confronto tra i diversi meccanismi trofici, in funzione del tempo di permanenza. Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| Contenuto di carotenoidi [mg g _x ⁻¹] | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Tempo di permanenza τ [giorni] | Autotrofia | Eterotrofia | Mixotrofia |
| 0,9 | 2,23 ± 0,22 ^A | 0,13 ± 0,03 ^C | 0,08 ± 0,02 ^C |
| 1,5 | 3,20 ± 0,25 ^A | 0,14 ± 0,03 ^C | 0,09 ± 0,02 ^C |
| 2 | 3,37 ± 0,06 ^B | 0,14 ± 0,03 ^C | 0,26 ± 0,04 ^D |
| 3 | 3,60 ± 0,07 ^B | 0,17 ± 0,02 ^C | 0,52 ± 0,11 ^E |

In **autotrofia**, la concentrazione di carotenoidi aumenta progressivamente con il tempo di permanenza, da 2,23 mg g_x⁻¹ a τ 0,9 giorni fino a 3,60 mg g_x⁻¹ a τ 3 giorni. L'analisi statistica mette in evidenza differenze significative tra i tempi di permanenza nei vari regimi trofici, sottolineando come il meccanismo trofico influisca sulla concentrazione di carotenoidi. In condizioni eterotrofiche, la concentrazione di carotenoidi rimane minima e costante, variando tra 0,13 mg g_x⁻¹ e 0,17 mg g_x⁻¹. Questo comportamento riflette l'assenza di necessità di protezione

fotosintetica in assenza di luce. La stabilità di questi valori, ulteriormente confermata dall'analisi statistica, dimostra che non vi sono differenze significative in funzione del tempo di permanenza. In mixotrofia, invece, si osserva un incremento significativo nella concentrazione di carotenoidi all'aumentare del tempo di permanenza, passando da $0,08 \text{ mg g}_X^{-1}$ a τ 0,9 giorni fino a $0,52 \text{ mg g}_X^{-1}$ a τ 3 giorni. Questo andamento, sostenuto dall'analisi statistica, suggerisce che le cellule mixotrofiche mantengono una sintesi attiva di carotenoidi, sebbene i livelli rimangano inferiori rispetto a quelli osservati in autotrofia. Dal confronto tra i tre regimi trofici emergono alcune osservazioni chiave: l'autotrofia massimizza la produzione di carotenoidi come risposta diretta alla luce, l'eterotrofia mantiene livelli minimi e costanti in assenza di esposizione luminosa, e la mixotrofia presenta una produzione intermedia, con un incremento significativo ai tempi di permanenza più lunghi. In conclusione, il tempo di permanenza e il meccanismo trofico influenzano in maniera sostanziale sia la concentrazione di clorofilla che quella dei carotenoidi. L'autotrofia, specialmente a tempi intermedi, si conferma ottimale per massimizzare la sintesi di pigmenti fotosintetici, mentre l'eterotrofia limita drasticamente la produzione di pigmenti. La mixotrofia rappresenta una soluzione intermedia e bilanciata, particolarmente utile per coltivazioni mirate alla produzione moderata di pigmenti fotosintetici destinati a specifiche applicazioni biotecnologiche. Questi risultati offrono indicazioni preziose per l'ottimizzazione delle condizioni di coltura in base agli obiettivi specifici di produzione.

3.1.6 Analisi comparativa del contenuto di pigmenti nei tre meccanismi trofici

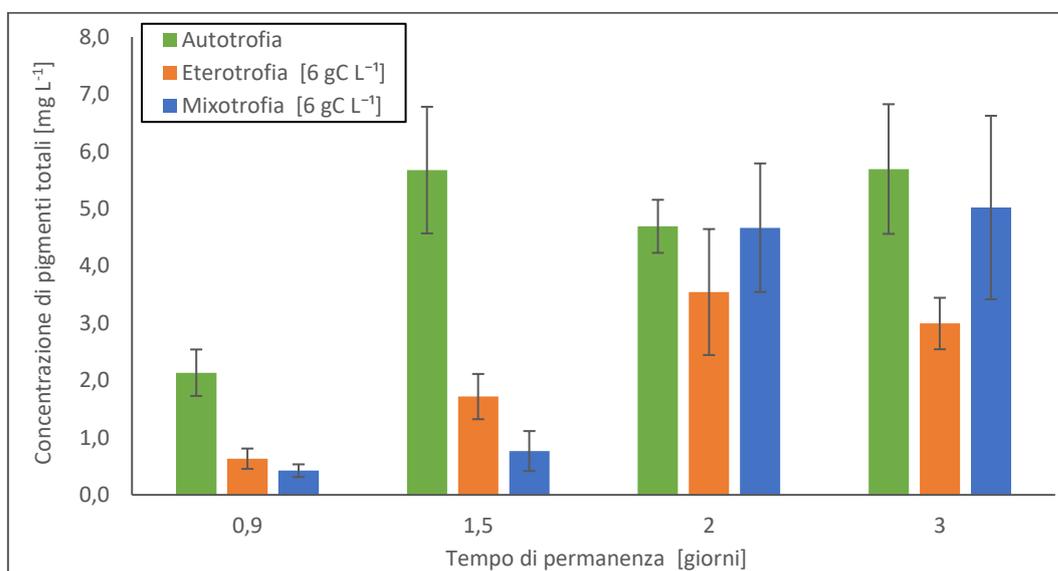


Figura 3.6 Contenuto assoluto di pigmenti totali espressa mg L⁻¹ per i tre meccanismi trofici (autotrofia, eterotrofia e mixotrofia) in funzione del tempo di permanenza

Il Grafico 3.6 rappresenta la concentrazione totale di pigmenti (clorofilla e carotenoidi) in funzione del tempo di permanenza per i tre meccanismi trofici. Questo andamento riflette le diverse capacità delle cellule di sintetizzare pigmenti in risposta alla disponibilità di luce e alla fonte di carbonio nelle varie condizioni. In **autotrofia**, la concentrazione totale di pigmenti risulta penalizzata a tempi di permanenza troppo brevi, tutta via all'aumentare del τ si osserva un aumento del contenuto di pigmenti, un picco a τ 1,5 giorni, con un valore superiore a 6 mg L⁻¹. All'aumentare ulteriormente del tempo di permanenza si osserva un andamento asintotico come descritto in precedenza da (Borella et al., 2021). Tuttavia, a tempi di permanenza più lunghi, come τ 2 giorni, la concentrazione totale scende a circa 4,6 mg L⁻¹, suggerendo limitazioni dovute a fenomeni di auto-ombreggiamento e competizione per la luce. In **eterotrofia**, i pigmenti sono presenti a concentrazioni molto basse e rimangono relativamente costanti, tra 0,5 e 1,5 mg L⁻¹, confermando che le cellule non richiedono pigmenti fotosintetici in assenza di luce. In **mixotrofia**, la concentrazione di pigmenti aumenta con il tempo di permanenza, passando da valori simili a quelli dell'eterotrofia a circa 4 mg L⁻¹ a τ 3 giorni. Tale aumento è riconducibile al fatto che nelle ultime due condizioni si riscontra un forte aumento dei carotenoidi, probabilmente dovuto a condizioni di stress indotte nella

coltura (Lamers et al. 2010; Sun et al. 2018). Tale fenomeno si è riscontrato anche per *G. partita*, dove in regime eterotrofo e mixotrofo si verifica un aumento del contenuto dei carotenoidi (Stadnichuk et al. 1998). Questo andamento intermedio suggerisce che le cellule mixotrofiche sfruttino sia la luce sia la fonte organica di carbonio, producendo pigmenti sufficienti per la fotosintesi senza raggiungere i livelli dell'autotrofia. In conclusione, il tempo di permanenza e il tipo di meccanismo trofico influenzano significativamente il contenuto di pigmenti nelle cellule. L'autotrofia, a tempi di permanenza intermedi, rappresenta la condizione ottimale per massimizzare il contenuto di pigmenti, mentre l'eterotrofia limita questa produzione al minimo. La mixotrofia rappresenta un equilibrio tra le condizioni autotrofiche ed eterotrofiche, configurandosi come una strategia flessibile per la coltivazione, caratterizzata da un contenuto moderato di pigmenti (Abiusi et al., 2020). Tuttavia, con le specifiche condizioni di luce e carbonio organico adottate in questi esperimenti, non è stato possibile ottenere un incremento significativo nella produzione di pigmenti. Questo limite sarà oggetto di ulteriore analisi e approfondimento nella sezione 3.5, al fine di identificare le condizioni ottimali per massimizzare la sintesi pigmentaria in regime mixotrofico. Questi risultati possono essere sfruttati per ottimizzare la coltivazione in funzione degli obiettivi di produzione, come la massimizzazione della resa in pigmenti fotosintetici per applicazioni biotecnologiche.

3.2 Effetto del pH in ingresso

In questi esperimenti è stata analizzata l'influenza del pH sulla crescita e produttività di *Galdieria sulphuraria*, con l'obiettivo di individuare i livelli di pH ottimali per massimizzare l'efficienza di crescita della microalga. Sono stati monitorati i valori di pH in ingresso e in uscita e misurate la concentrazione di biomassa (C_X) e la produttività (P_X) a diversi livelli di pH (1, 2, 3 e 5), fornendo così una base comparativa per comprendere come variazioni di pH influenzino la resa complessiva del sistema di coltivazione.

Tabella 3.7 Valori di pH in ingresso e valori medi in uscita. Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| pH in ingresso | pH in uscita | Fonte |
|----------------|--------------|------------------|
| 1 | 0,75 ± 0,06 | Questa tesi |
| 2 | 1,59 ± 0,03 | Vivarelli (2023) |
| 3 | 1,94 ± 0,25 | Questa tesi |
| 5 | 2,07 ± 0,08 | Questa tesi |

La Tabella 3.7 riporta i valori medi di pH in uscita rispetto ai pH iniziali di ingresso utilizzati negli esperimenti. I dati mostrano una tendenza generale all'acidificazione del terreno di coltura, evidenziando una progressiva riduzione del pH in uscita rispetto al valore iniziale. Tale acidificazione riflette un effetto diretto del metabolismo di *Galdieria sulphuraria*, legato alla produzione netta di 6 moli di CO₂ per ogni mole di glucosio consumata (Abreu et al. 2022; Oesterhelt et al. 2007; Schmidt et al., 2005). Gli esperimenti condotti da Oesterhelt et al. (2007) hanno evidenziato l'acidificazione del mezzo da parte di *Galdieria sulphuraria*. I valori iniziali di pH testati variavano tra 1 e 8, il che ha permesso di osservare che i livelli di pH pari a 1 e 2 non subiscono variazioni significative. Tuttavia, all'aumentare del pH iniziale, soprattutto per valori vicini alla neutralità o addirittura alcalini, si osserva una marcata acidificazione del mezzo, con valori finali di pH stabilizzati intorno a 2,5-3. Questi risultati indicano che *Galdieria sulphuraria* presenta un metabolismo in grado di acidificare l'ambiente di coltura, un adattamento che probabilmente avvantaggia la microalga in condizioni estreme. D'ora in avanti, i valori di pH considerati saranno quelli effettivi misurati nel mezzo di coltura, anziché quelli del mezzo in ingresso.

Tabella 3.8 Valori di concentrazione di biomassa e di produttività in funzione dei vari pH. Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| pH in uscita | C_x [g L ⁻¹] | P_x [g L ⁻¹ giorni ⁻¹] | Fonte |
|--------------|----------------------------|---|----------------|
| 0,75 | 3,57 ± 0,50 ^A | 1,73 ± 0,24 ^E | Questa tesi |
| 1,59 | 9,33 ± 0,12 ^B | 4,66 ± 0,06 ^F | Vivarelli 2023 |
| 1,94 | 7,66 ± 0,50 ^C | 3,83 ± 0,25 ^G | Questa tesi |
| 2,07 | 5,41 ± 0,29 ^D | 2,84 ± 0,15 ^H | Questa tesi |

L'analisi della concentrazione di biomassa (C_x) e della produttività (P_x) di *Galdieria sulphuraria* in funzione del pH mostra come il metabolismo della microalga sia ottimizzato in condizioni fortemente acide. La tabella evidenzia che a pH 1,59 si raggiungono i valori massimi di concentrazione e produttività di biomassa, con C_x pari a 9,33 g L⁻¹ e P_x di 4,66 g L⁻¹ giorno⁻¹, come riportato da Vivarelli (2023).

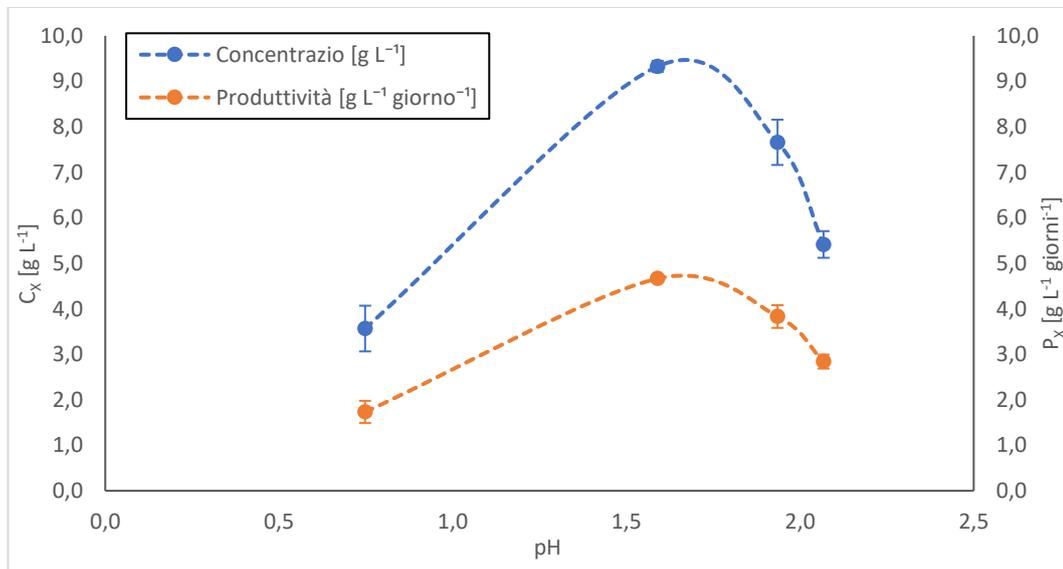


Figura 3.7 Andamento C_x e P_x di coltivazioni eterotrofiche in funzione del pH in uscita. Le linee tratteggiate sono state aggiunte per identificare meglio gli andamenti delle variabili.

Come si può osservare dal grafico 3.7, questo livello di pH rappresenta il punto ottimale per la crescita di *Galdieria*. Il grafico rappresenta una tipica curva a campana centrata sul valore ottimale, con una stabilità dei risultati testimoniata dalle basse deviazioni standard, che indicano una ridotta variabilità nei dati. A

supporto di questa osservazione, l'analisi statistica conferma una differenza significativa rispetto alle altre condizioni. A pH 0,74, la concentrazione media di biomassa è di $3,57 \text{ g L}^{-1}$ e la produttività è di $1,73 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$. Sebbene si osservi crescita a questo livello di pH. Questo effetto potrebbe essere spiegato dal fatto che a pH così estremamente bassi possono causare degradazione degli zuccheri queste condizioni estreme risultano meno favorevoli per massimizzare la produzione di biomassa rispetto al pH 1,59. Questo fenomeno potrebbe essere attribuito al fatto che, in condizioni di pH estremamente acido, si verifica un incremento nella degradazione chimica del glucosio a HMF (idrossimetilfurfurale), come evidenziato da Lim et al., (2023). L'HMF, a sua volta, è noto per compromettere la crescita cellulare, in quanto può provocare danni significativi ai mitocondri, come descritto da Allen et al. (2010). A pH 1,94, la concentrazione di biomassa e la produttività scendono rispettivamente a $7,66 \text{ g L}^{-1}$ e $3,83 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$, pur rimanendo superiori ai valori registrati a pH 0,75. Infine, a pH 2,07, si osserva un ulteriore calo della concentrazione di biomassa e della produttività, con C_X pari a $5,41 \text{ g L}^{-1}$ e P_X di $2,84 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$. In sintesi, questi risultati confermano che *Galdieria sulphuraria* è altamente adattata a condizioni di acidità estrema, in accordo con i primi studi condotti da Gross et al., (1995) e successivamente confermati da numerosi studi (Buckeridge 2022; Reeb 2010). Questo fenomeno, come evidenziato dallo studio di Oesterhelt et al., (1999), sarebbe da attribuirsi a una correlazione tra il pH del mezzo e l'assorbimento del carbonio organico disponibile. Infatti, dallo studio emerge che l'assorbimento massimo di glucosio si verifica a pH 2, mentre si riduce al 75% a pH 1 e cessa completamente oltre pH 7. La gestione del pH, con particolare attenzione al controllo dell'effetto acidificante della CO_2 prodotta in eterotrofia, rappresenta dunque una variabile cruciale per ottimizzare la crescita e la produzione di biomassa. L'analisi delle rese di consumo del carbonio organico nel sistema di coltura permette di comprendere l'efficienza di conversione del carbonio fornito alla coltura (C_{TER}) in biomassa e in CO_2 alle diverse condizioni operative. I parametri chiave considerati sono:

1. **Contenuto di carbonio organico nel terreno (C_{TER}):** rappresenta il totale di carbonio organico inizialmente disponibile nel mezzo, ossia il carbonio totale fornito alla coltura.

2. **Contenuto di carbonio organico nel reattore (C_{BIO}):** indica il carbonio organico presente nella biomassa e nel terreno non ancora consumato. In generale, C_{BIO} risulta inferiore a C_{TER} poiché parte del carbonio iniziale è stato consumato dalla biomassa per produrre CO_2 , e quindi non è più rilevato come carbonio organico tramite l'analizzatore TOC
3. **Contenuto di carbonio organico nel filtrato (C_{FIL}):** rappresenta il carbonio organico residuo non consumato dal metabolismo microalgale.

A partire da questi, sono stati identificati tre indicatori di resa: il contenuto di carbonio organico in biomassa ($Y_{C/X}$), la resa di consumo di carbonio organico ($Y_{cons,C}$), e la resa di consumo di carbonio organico per il mantenimento cellulare ($Y_{mant,C}$). Per quanto riguarda il primo, l'indice $Y_{C/X}$ rappresenta il contenuto di carbonio organico immagazzinato nella biomassa, e si calcola come:

$$Y_{C/X} = \frac{C_{BIO} - C_{FIL}}{C_X} \quad (3.1)$$

rappresentando infatti il quantitativo di carbonio consumato per la produzione di biomassa, e successivamente normalizzato rispetto a quest'ultima. La resa di consumo di carbonio organico ($Y_{cons,C}$) invece deriva dal precedente indice, normalizzando però il precedente termine a numeratore sul quantitativo di carbonio organico inizialmente a monte del sistema:

$$Y_{cons,C} = \frac{C_{BIO} - C_{FIL}}{C_{TER}} \quad (3.2)$$

Di norma, questo valore non dovrebbe superare l'80%, considerata la resa teorica massima di un metabolismo eterotrofo, poiché una parte del carbonio viene persa come CO_2 destinata al mantenimento (Abiusi et al. 2021; Heijnen 1994). Per concludere, la resa $Y_{mant,C}$ permette di quantificare la quantità relativa di carbonio organico utilizzato per il mantenimento della coltura, ovvero la quota di carbonio destinata alla produzione di CO_2 . Tale indice viene calcolato come mostrato nell'equazione 3.3:

$$Y_{mant,C} = \frac{C_{TER} - C_{BIO}}{C_{TER}} \quad (3.3)$$

Tabella 3.9 Valori di $Y_{C/X}$, $Y_{cons,C}$ e $Y_{mant,C}$ per i vari esperimenti.

| pH in uscita | $Y_{C/X}$ [%] | $Y_{cons,C}$ [%] | $Y_{mant,C}$ [%] |
|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 0,75 | 53 ± 14 ^A | 32 ± 11 ^A | 12 ± 3 ^{AB} |
| 1,59 | 42 ± 4 ^A | 65 ± 5 ^B | 20 ± 5 ^A |
| 1,94 | 45 ± 2 ^A | 63 ± 5 ^B | / |
| 2,07 | 43 ± 0 ^A | 44 ± 2 ^A | 8 ± 3 ^B |

I valori medi di $Y_{C/X}$ variano tra il 42% e il 53% nei diversi pH testati, con una maggiore variabilità osservata a pH 1 rispetto agli altri valori. L'analisi statistica indica l'assenza di differenze significative tra le condizioni di pH per questo parametro, supportando l'ipotesi che il contenuto di carbonio incorporato nella biomassa rimanga costante indipendentemente dalle condizioni operative. Questo risultato è coerente con la letteratura, che riporta un contenuto medio di carbonio in biomassa intorno al 50% da Graverholt et al. (2007) e Sloth et al. (2006), e conferma la tendenza alla stabilità di $Y_{C/X}$ in condizioni sperimentali diverse. Spostando poi l'attenzione verso l'efficacia del consumo di substrato, i valori di $Y_{cons,C}$ mostrano un massimo tra pH 1,59 e 1,94, con una resa del 65% e del 63% rispettivamente, dimostrando che queste condizioni favoriscono l'efficienza nell'utilizzo del carbonio organico per la produzione di biomassa, e si confermano maggiori rispetto alle rese ottenute da Graverholt et al., (2007) nei suoi esperimenti in continuo. A pH 0,75 e pH 2,07 invece, la resa scende al 32% e 44%, rispettivamente, con differenze statisticamente significative tra i gruppi. L'analisi statistica indica una significativa superiorità per pH 1,59 e pH 1,93, rispetto agli altri pH, confermando che questi valori di pH sono ottimali per l'impiego del carbonio organico nella produzione di biomassa (Oesterhelt et al. 1999b). Ovviamente questo discorso sulle rese si completa osservando le rese di mantenimento del sistema alle varie condizioni operative. L'andamento di $Y_{mant,C}$ in funzione del pH mostra un'influenza significativa delle condizioni di acidità sulla quota di carbonio organico destinata al mantenimento energetico della biomassa. A un pH di 0,75, $Y_{mant,C}$ si attesta al 12%, con una deviazione standard di 3%, indicando che in condizioni di elevata acidità una porzione considerevole di

carbonio viene impiegata per il mantenimento. Questo valore aumenta sensibilmente a pH 1,59, raggiungendo il 20% (deviazione standard di 5%), suggerendo che a un livello di acidità meno estremo, una percentuale maggiore di carbonio organico viene destinata ai processi energetici di mantenimento. Al contrario, al pH più alto di 2,07, $Y_{mant,C}$ si riduce all'8%, con una deviazione standard di 3%, riflettendo una diminuzione della quota di carbonio consumata per il mantenimento man mano che l'ambiente si avvicina a condizioni meno acide. Questo andamento complessivo suggerisce che la forte acidità comporta un dispendio energetico più elevato per la microalga, mentre a pH meno estremi il carbonio disponibile può essere impiegato più efficacemente per la crescita piuttosto che per il mantenimento. In conclusione, dai risultati emerge che il pH del terreno influisce in modo significativo sulla distribuzione del carbonio organico tra biomassa e CO₂. Il pH 1,59 risulta ottimale sia per il contenuto di carbonio nella biomassa ($Y_{C/X}$) che per la resa di consumo ($Y_{cons,C}$), evidenziando un'efficienza elevata nel convertire il carbonio disponibile in biomassa, con minori perdite per mantenimento. Al contrario, pH estremamente acidi o prossimi alla neutralità tendono a ridurre l'efficienza complessiva, aumentando le perdite di carbonio come CO₂ e diminuendo il rendimento in biomassa. Questi risultati sono essenziali per ottimizzare le condizioni di coltura e massimizzare la produttività della biomassa, garantendo al contempo un uso efficiente del carbonio organico fornito inizialmente.

3.3 Effetto della concentrazione di Carbonio organico

In questo studio, è stata esaminata l'influenza della concentrazione di carbonio organico disponibile nel mezzo di coltura sulla crescita e sulla produttività della biomassa in condizioni eterotrofiche. Sono state investigate diverse concentrazioni del substrato organico, valutando la concentrazione di biomassa finale (C_X) e la produttività (P_X), nonché i coefficienti di resa relativi all'efficienza di conversione del carbonio ($Y_{C/X}$), alla frazione di carbonio organico consumato per la produzione di biomassa ($Y_{cons,C}$) e alla quota di carbonio impiegata per il mantenimento

cellulare ($Y_{mant,c}$). I dati sono stati sottoposti a un'analisi statistica per evidenziare differenze significative tra le condizioni sperimentali.

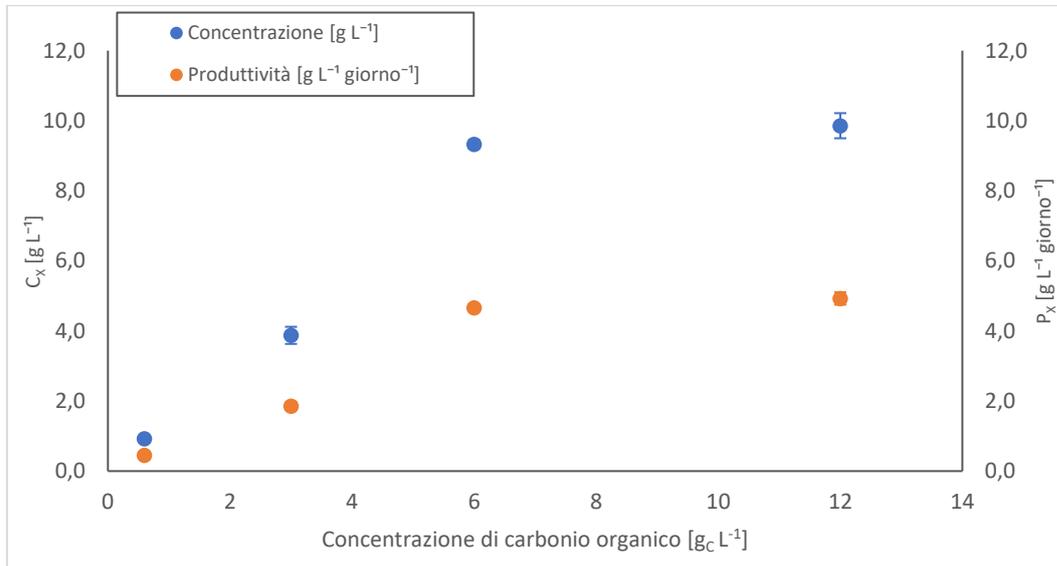


Figura 3.8 Andamento C_X e P_X in eterotrofia in funzione della concentrazione di carbonio organico nel mezzo [g_C L⁻¹].

Il grafico 3.8 illustra l'andamento della concentrazione di biomassa (C_X) e della produttività (P_X) in funzione della concentrazione di carbonio organico disponibile nel mezzo di coltura. Entrambe le variabili mostrano un andamento caratterizzato da un progressivo incremento fino a raggiungere una soglia di saturazione. È importante sottolineare che il trend della produttività risulta analogo a quello della biomassa, in quanto il tempo di permanenza investigato è stato mantenuto costante, garantendo così una correlazione diretta tra le due grandezze. Questo andamento riflette il tipico modello descritto da Monod, secondo cui, nelle fasi iniziali, la disponibilità di substrato costituisce il principale fattore limitante per la crescita cellulare e l'accumulo di biomassa. Con l'aumento della concentrazione di substrato, la velocità di crescita specifica della popolazione microbica aumenta progressivamente, fino a stabilizzarsi in un plateau, indicativo del raggiungimento della velocità massima di crescita (μ_{max}), oltre la quale la disponibilità di substrato non rappresenta più un fattore limitante (Monod 1949). In particolare, a basse concentrazioni di carbonio organico, l'accumulo di biomassa risulta limitato, suggerendo che le cellule non dispongano di una quantità sufficiente di substrato per raggiungere il loro pieno potenziale di crescita (Sloth et al., 2006). Con l'aumento della concentrazione di carbonio, il sistema risponde positivamente, e sia

C_X che P_X aumentano in modo significativo. Tuttavia, a partire da $6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$ nel terreno di coltura, l'ulteriore incremento della concentrazione di carbonio organico a disposizione del sistema non produce più aumenti significativi né in termini di concentrazione e né in termini di produttività di biomassa. Questo plateau suggerisce che il sistema ha raggiunto una condizione di saturazione, dove il carbonio disponibile in eccesso non può più essere utilizzato in modo efficiente dalle cellule. Come dimostrato da Pan et al. (2024), un eccesso di substrato organico non comporta ulteriori benefici probabilmente a causa della saturazione dei sistemi metabolici o di altre limitazioni di natura ambientale, come l'aerazione. Questo andamento sottolinea l'importanza di ottimizzare la concentrazione di carbonio organico nel mezzo per evitare inutili sprechi di substrato e potenziali effetti negativi da sovraccarico di nutrienti.

Tabella 3.10 Valori di C_X e P_X in eterotrofia in funzione della concentrazione di carbonio organico equivalente nel mezzo [$\text{g}_C \text{ L}^{-1}$]. Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| Concentrazione substrato organico [$\text{g}_C \text{ L}^{-1}$] | C_X [g L^{-1}] | P_X [$\text{g L}^{-1} \text{ giorni}^{-1}$] | Fonte |
|---|-----------------------------|---|------------------|
| 0,6 | $0,93 \pm 0,03^A$ | $0,46 \pm 0,01^E$ | Questa tesi |
| 3 | $3,88 \pm 0,24^B$ | $1,86 \pm 0,12^F$ | Questa tesi |
| 6 | $9,33 \pm 0,12^C$ | $4,66 \pm 0,06^G$ | Vivarelli (2023) |
| 12 | $9,86 \pm 0,36^D$ | $4,93 \pm 0,18^H$ | Vivarelli (2023) |

La Tabella 3.11 riporta i valori di concentrazione di biomassa (C_X) e produttività (P_X) in condizioni eterotrofiche al variare della concentrazione di carbonio organico nel mezzo, espressa in $\text{g}_C \text{ L}^{-1}$. Si conferma una chiara relazione positiva tra l'aumento della concentrazione di substrato organico e l'incremento sia della concentrazione di biomassa che della produttività, fino a raggiungere una fase di plateau. A una concentrazione di carbonio organico pari a $0,6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$, C_X ha un valore medio di $0,93 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$, mentre P_X è pari a $0,46 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$; a termine di paragone, questi valori risultano maggiori rispettivamente a C_X $0,63 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ e P_X di $0,08 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$ (ricavata mediante l'equazione 2.4) quelli ottenuti da (Buckeridge 2022) a τ 8 giorni con una concentrazione di glucosio

pari a $1,8 \text{ g L}^{-1}$ (ovvero circa $0,7 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$). Ad ogni modo, tali valori bassi indicano che la crescita e la produttività della biomassa sono limitate dalla bassa disponibilità di substrato, insufficiente a supportare elevati tassi di crescita. A concentrazioni più elevate, come nel caso della condizione a $12 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$, C_X si riscontra un ulteriore incremento, raggiungendo $9,86 \pm 0,36 \text{ g L}^{-1}$, con P_X pari a $4,93 \pm 0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$. Questi risultati indicano che, superata una certa soglia di concentrazione di substrato organico, l'efficienza di conversione in biomassa tende a stabilizzarsi. La Tabella 3.12 riporta, inoltre, i valori medi e le deviazioni standard di tre parametri di resa relativi all'utilizzo del carbonio organico nei vari esperimenti: la resa di conversione del carbonio in biomassa ($Y_{C/X}$), la resa di consumo di carbonio ($Y_{cons,C}$) e la resa di mantenimento ($Y_{mant,C}$), che riflette la frazione di carbonio destinata alla produzione di CO_2 , utilizzata per il mantenimento della coltura.

Tabella 3.11 Valori di $Y_{C/X}$, $Y_{cons,C}$ e $Y_{mant,C}$ per i vari esperimenti. Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| Concentrazione substrato organico [g_C L⁻¹] | $Y_{C/X}$ [%] | $Y_{cons,C}$ [%] | $Y_{mant,C}$ [%] |
|---|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 0,6 | 34 ± 2^A | 75 ± 1^A | 26 ± 5^A |
| 3 | 40 ± 2^B | 57 ± 6^B | 29 ± 7^A |
| 6 | 42 ± 4^B | 65 ± 5^{AB} | 20 ± 5^A |

A partire dai dati raccolti, si possono trarre diverse considerazioni riguardanti il contenuto di carbonio in biomassa, la resa di consumo del substrato e la resa di mantenimento per le diverse concentrazioni di carbonio organico impiegate. Il contenuto di carbonio convertito in biomassa ($Y_{C/X}$) si attesta mediamente intorno al 40-42% nei diversi esperimenti, con una variazione significativa a $0,6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$, dove si registra una resa del $34 \pm 2\%$. Questo valore risulta inferiore rispetto a quanto riportato in letteratura, dove il contenuto di carbonio in biomassa tende a stabilizzarsi intorno al 50% (Graverholt et al., 2007). Tale discrepanza potrebbe indicare una limitazione intrinseca del sistema o errori sperimentali specifici per questa condizione. Aumentando la concentrazione del substrato a $3 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$, la resa

di conversione migliora, raggiungendo il $40 \pm 2\%$, e ulteriormente a $6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$, dove si osserva un valore del $42 \pm 4\%$. Questi risultati suggeriscono un miglioramento progressivo dell'efficienza del sistema con l'aumentare della disponibilità di carbonio organico (Graverholt et al., 2007; Pleissner et al., 2021; Schmidt et al. 2005). Questo risultato conferma l'aumento dell'efficienza nell'uso del carbonio per la produzione di biomassa con l'incremento della concentrazione di substrato e si allinea ai risultati ottenuti da Abiusi et al. (2024). La resa di consumo del carbonio ($Y_{cons,C}$) varia in modo inversamente proporzionale alla concentrazione iniziale di substrato. A $0,6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$, si raggiunge il valore più alto, pari al $75 \pm 1\%$, mentre diminuisce al $57 \pm 6\%$ con $3 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$ e si stabilizza al $65 \pm 5\%$ a $6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$. Questo andamento riflette una progressiva saturazione del sistema, in cui il carbonio organico residuo nel mezzo aumenta con la disponibilità iniziale del substrato. Inoltre, in condizioni di basse concentrazioni di carbonio organico ($0,6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$), il sistema opera in un regime di limitazione da carbonio, come confermato dalla totale conversione del substrato in prodotti finali: il 75% in biomassa e il restante 25% in CO_2 , risultati analoghi sono stati riscontrati da Buckeridge (2022). Analogamente, a $3 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$, il 57% del substrato è stato convertito in biomassa, mentre il 29% è stato destinato alla produzione di CO_2 . Questo andamento conferma che una porzione significativa del carbonio organico viene ossidata in CO_2 in condizioni di limitazione del substrato. A $6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$, invece, si osservano rese più basse di consumo del substrato, suggerendo che una parte significativa del carbonio organico rimane inutilizzata nel mezzo. Questo potrebbe essere attribuito a una sovrabbondanza di substrato che eccede la capacità metabolica della coltura, risultando in una diminuzione dell'efficienza di utilizzo (Pleissner et al. 2021). La resa di mantenimento ($Y_{mant,C}$) rimane relativamente stabile nei diversi esperimenti, oscillando tra il $26 \pm 5\%$ a $0,6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$ e il $29 \pm 7\%$ a $3 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$. Questo indica che, indipendentemente dalla concentrazione iniziale del substrato, una porzione consistente di carbonio organico viene impiegata per il mantenimento energetico della coltura. L'aumento della produzione di CO_2 osservato con l'incremento del substrato sembra correlarsi con il calo del consumo di carbonio per la biomassa, riflettendo un cambiamento nell'equilibrio metabolico della coltura. In sintesi, l'efficienza di conversione del carbonio in biomassa migliora con l'aumento del substrato, mostrando tuttavia limiti intrinseci sia a basse che ad alte concentrazioni

di carbonio. La resa di consumo del substrato diminuisce progressivamente con l'incremento della disponibilità di carbonio, evidenziando una saturazione metabolica e la presenza di carbonio organico non consumato nelle condizioni più ricche. La resa di mantenimento, al contrario, rimane costante, indicando che i fabbisogni energetici di base della coltura non variano al variare della concentrazione di substrato. Non sono stati rilevati dati affidabili per la concentrazione di $12 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$ a causa di anomalie nelle analisi TOC. I risultati complessivi confermano che la frazione di carbonio destinata al mantenimento rimane stabile, mentre la resa di consumo varia con la disponibilità di carbonio organico. Ciò sottolinea l'importanza di ottimizzare la concentrazione di substrato per migliorare l'efficienza di produzione in condizioni eterotrofiche. In particolare, il trend osservato, caratterizzato da un aumento delle prestazioni fino a una soglia ottimale attorno ai $6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$, seguito da un plateau, indica che oltre tale concentrazione non si osservano miglioramenti significativi nell'efficienza di conversione del carbonio in biomassa (C_X) né nella produttività (P_X). Questo andamento riflette una saturazione nei sistemi di assorbimento e utilizzo del carbonio da parte delle cellule, suggerendo che, superata tale soglia, altri fattori limitanti, come la disponibilità di nutrienti o le condizioni operative, possano influenzare la crescita. L'analisi delle rese conferma che la resa di conversione del carbonio in biomassa ($Y_{C/X}$) si mantiene costante nelle diverse condizioni sperimentali, mentre la resa di consumo del carbonio ($Y_{cons,C}$) diminuisce progressivamente con l'aumento della concentrazione di substrato. La resa di mantenimento ($Y_{mant,C}$), invece, risulta invariata, indicando che la frazione di carbonio destinata alla produzione di CO_2 per il mantenimento energetico delle cellule non subisce variazioni significative. Questo evidenzia una richiesta energetica costante, indipendentemente dalla disponibilità di substrato. Questi risultati sottolineano la necessità di bilanciare attentamente la concentrazione di carbonio organico nel mezzo di coltura. Una concentrazione subottimale può limitare la crescita, mentre un eccesso comporta inefficienze operative e sprechi di substrato, senza alcun beneficio per la produttività. L'ottimizzazione del substrato rappresenta pertanto un elemento cruciale per massimizzare la resa delle colture, garantendo al contempo un utilizzo sostenibile delle risorse e riducendo gli impatti ambientali derivanti dalla gestione dei nutrienti in eccesso.

3.4 Effetto della tipologia di substrato

Gli esperimenti descritti in questa sezione sono stati condotti in regime eterotrofico, utilizzando un tempo di permanenza fisso pari a 2 giorni. L'obiettivo principale era valutare l'effetto di diverse tipologie di substrati organici, tra cui glucosio, lattosio, galattosio e permeato del latte, sulla crescita e sulla produttività di *Galdieria sulphuraria*. La concentrazione di tali substrati, valutata in equivalenti di carbonio organico, è stata mantenuta costante in tutti i casi per garantire condizioni comparabili e consentire un'analisi accurata dell'influenza specifica del substrato utilizzato.

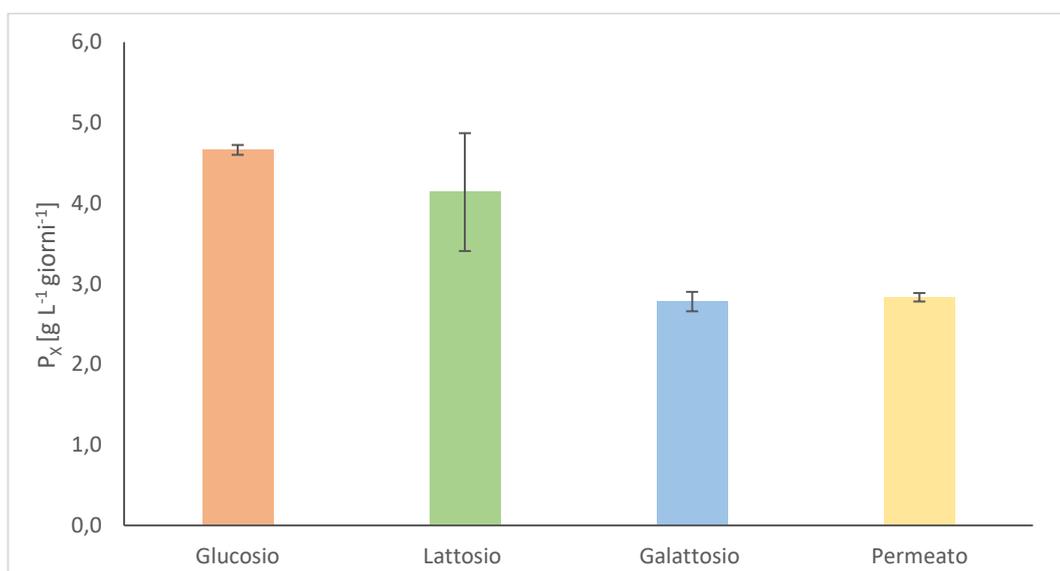


Figura 3.9 Andamento P_X in eterotrofia in funzione della tipologia di substrato organico nel mezzo a [6 g C L^{-1}].

La figura 3.9 illustra l'andamento della produttività di biomassa (P_X) in regime eterotrofico in funzione della tipologia di substrato organico impiegato nel mezzo. L'analisi evidenzia una chiara differenziazione nei valori di P_X , che varia in relazione alla semplicità e alla composizione del substrato. Il glucosio e il lattosio si confermano come i substrati più efficienti, mostrando una produttività simile e significativamente superiore rispetto a quella ottenuta con gli altri substrati. Questo risultato conferma l'alta capacità di *Galdieria sulphuraria* di assimilare e metabolizzare substrati semplici e prontamente disponibili, come il glucosio, che non richiedono complesse trasformazioni metaboliche (Occhipinti et al. 2023;

Oesterhelt et al. 1999b; Ternes 2015). È interessante notare che, per raggiungere lo stato stazionario, il sistema ha richiesto solo 6 giorni di operatività in continuo con il glucosio, evidenziando una rapidità di adattamento metabolico rispetto agli altri substrati, in linea con i risultati di Oesterhelt et al., (2007). Il lattosio, con una P_X di $4,139 \pm 0,732 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$, mostra valori di produttività comparabili a quelli del glucosio. Sebbene richieda un'ulteriore fase di idrolisi enzimatica per la sua scissione in glucosio e galattosio, il lattosio dimostra una buona efficienza metabolica, rendendolo una valida alternativa al glucosio (Tischendorf et al. 2007; Zimmermann et al. 2020). Tuttavia, il raggiungimento dello stato stazionario ha richiesto un periodo più lungo, pari a 15 giorni, suggerendo una necessità di adattamento iniziale più prolungata rispetto al glucosio. Al contrario, il galattosio registra una produttività inferiore, pari a $2,779 \pm 0,121 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$. L'analisi statistica evidenzia una differenza significativa rispetto ai valori ottenuti con il glucosio e il lattosio, sottolineando una minore efficienza metabolica nella sua assimilazione da parte di *Galdieria sulphuraria*. A confronto, e in linea con i risultati ottenuti, lo studio condotto in continuo da Buckeridge (2022) evidenzia una produttività inferiore in presenza di galattosio rispetto al glucosio, sebbene le differenze riportate risultino meno pronunciate rispetto a quanto osservato in questi esperimenti. Questo può essere attribuito alla necessità di vie metaboliche più complesse e meno efficienti per il suo catabolismo. Inoltre, il galattosio può accumularsi sotto forma di intermedi tossici (es. galattosio-1-fosfato), rallentando ulteriormente il metabolismo. (Stadnichuk et al., 2022; Ternes 2015). I dati raccolti in questo lavoro indicano che il metabolismo del galattosio è meno efficiente rispetto a quello del glucosio e addirittura del lattosio, in evidente contrasto con esperimenti presenti in letteratura condotti da (Oesterhelt et al. 1999b), in cui riscontra gli stessi tempi di raddoppiamento per i due monosaccaridi. Inoltre, il sistema ha richiesto ben 17 giorni per raggiungere lo stato stazionario con il galattosio, evidenziando ulteriori difficoltà nel pieno sfruttamento di questo substrato. Queste evidenze sperimentali sono in disaccordo con quanto riportato da Occhipinti et al., (2023), i cui esperimenti hanno evidenziato un comportamento opposto tra lattosio e galattosio, indicando una maggiore resa del galattosio rispetto al lattosio, confermata ulteriormente da tassi di crescita maggiori. Infine, il permeato del latte, una miscela contenente principalmente lattosio, raggiunge una

P_X di $2,83 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$, statisticamente simile al galattosio. Sebbene contenga componenti organici utili, la sua composizione complessa sembra limitare l'efficienza di utilizzo rispetto ai substrati più semplici (Occhipinti et al. 2023; Zimmermann et al. 2020). Questo effetto, probabilmente è dovuto in parte a gli stessi effetti inibitori riscontrati con il galattosio, dato che risulta in percentuale il secondo zucchero maggiormente abbondante dopo il lattosio (Menchik et al. 2019; Zall 1992). Anche in questo caso, il raggiungimento dello stato stazionario ha richiesto un periodo prolungato di 13 giorni, riflettendo la complessità nella metabolizzazione delle diverse componenti organiche presenti nel permeato. I risultati dimostrano che *Galdieria sulphuraria* raggiunge la massima produttività con substrati semplici come il glucosio, mentre substrati più complessi o misti, come il galattosio e il permeato del latte, mostrano una produttività significativamente inferiore. Il lattosio rappresenta un caso intermedio, con performance vicine a quelle del glucosio, ma influenzate probabilmente dalla necessità di una fase di scissione enzimatica. L'analisi dei tempi necessari per raggiungere lo stato stazionario rafforza ulteriormente queste osservazioni, evidenziando come substrati più semplici favoriscano non solo una maggiore produttività, ma anche una più rapida stabilizzazione del sistema. Questi dati sottolineano l'importanza della tipologia di substrato e delle sue caratteristiche metaboliche nella determinazione dell'efficienza produttiva in regime eterotrofico.

Tabella 3.12 Valori di C_X e P_X in eterotrofia in funzione della tipologia di substrato organico equivalente nel mezzo. Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| Tipologia substrato organico [gC L ⁻¹] | C_X [g L ⁻¹] | P_X [g L ⁻¹ giorni ⁻¹] | Fonte |
|--|----------------------------|---|------------------|
| Glucosio | $9,33 \pm 0,12^A$ | $4,66 \pm 0,06^A$ | Vivarelli (2023) |
| Lattosio | $8,26 \pm 1,46^A$ | $4,14 \pm 0,73^A$ | Questa tesi |
| Galattosio | $5,48 \pm 0,24^B$ | $2,78 \pm 0,12^B$ | Questa tesi |
| Permeato del latte | $5,71 \pm 0,11^B$ | $2,83 \pm 0,05^B$ | Questa tesi |

Complessivamente, i valori di C_X seguono lo stesso trend osservato per P_X , discusso in precedenza. Questa correlazione è spiegabile dal fatto che gli esperimenti sono

stati condotti tutti con un tempo di permanenza fissato a τ 2 giorni, garantendo così proporzionalità tra la concentrazione di biomassa e la produttività volumetrica.

Tabella 3.13 Valori di $Y_{C/X}$, $Y_{cons,C}$ e $Y_{mant,C}$ per i vari esperimenti. Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| Tipologia substrato organico [gc L ⁻¹] | $Y_{C/X}$ [%] | $Y_{cons,C}$ [%] | $Y_{mant,C}$ [%] |
|--|---------------------|-----------------------|----------------------|
| Glucosio | 42 ± 4 ^A | 65 ± 5 ^A | 20 ± 5 ^A |
| Lattosio | 42 ± 3 ^A | 61 ± 15 ^{AB} | 10 ± 3 ^A |
| Galattosio | 45 ± 8 ^A | 42 ± 9 ^B | 16 ± 10 ^A |
| Permeato del latte | 44 ± 2 ^A | 35 ± 2 ^B | 9 ± 7 ^A |

La resa di conversione del carbonio in biomassa ($Y_{C/X}$) mostra valori relativamente stabili per tutti i substrati, con medie comprese tra il 42% (glucosio e lattosio) e il 45% (galattosio). L'analisi statistica non evidenzia differenze significative tra le condizioni sperimentali. Questo trend suggerisce che l'efficienza con cui il carbonio organico viene convertito in biomassa è relativamente indipendente dal tipo di substrato utilizzato, indicando che il metabolismo di *Galdieria sulphuraria* è sufficientemente flessibile da garantire una resa simile per una varietà di fonti di carbonio (Oesterhelt et al. 1999; Zimmermann et al. 2020). La resa di consumo del carbonio ($Y_{cons,C}$) invece presenta una variabilità significativa tra i substrati. Secondo l'analisi statistica, i valori ottenuti per glucosio (65 ± 5%) e lattosio (61 ± 15%) non mostrano differenze significative tra loro, mentre galattosio (42 ± 9%) e permeato (35 ± 2%) risultano statisticamente equivalenti ma significativamente inferiori rispetto ai primi due substrati. Questi valori di $Y_{cons,C}$ indicano che glucosio e lattosio sono i substrati più efficienti, grazie alla loro facile metabolizzazione, mentre galattosio e permeato mostrano rese significativamente inferiori, probabilmente a causa di vie metaboliche più complesse o della presenza di composti meno facilmente utilizzabili. Questo evidenzia come la scelta del substrato influenzi significativamente l'efficienza metabolica di *Galdieria sulphuraria*. La resa di mantenimento ($Y_{mant,C}$) risulta simile tra i substrati, come confermato dall'analisi statistica, che non evidenzia differenze significative tra i

valori. In conclusione, il glucosio emerge come il substrato ottimale per massimizzare le rese di consumo e mantenimento, mentre il galattosio e il permeato risultano meno efficienti, evidenziando un impatto significativo del tipo di substrato sulle performance metaboliche di *Galdieria sulphuraria*. Tuttavia, la capacità di *Galdieria sulphuraria* di assimilare diverse fonti di carbonio organico, unite alle sue elevate rese di consumo, la rende particolarmente promettente per i processi di biorisanamento dei residui lattiero-caseari (Occhipinti et al. 2023). Questa tipologia di substrati, a causa degli elevati quantitativi prodotti dalla filiera casearia, il suo smaltimento rappresenta una significativa preoccupazione ambientale, in quanto contengono elevati livelli di materia organica disciolta (Menchik et al. 2019). In letteratura, tali sottoprodotti sono associati a una domanda biochimica di ossigeno (BOD) compresa tra 40.000 e 110.000 mg L⁻¹ (Menchik et al. 2019; Jelen 2011), indicando un potenziale impatto significativo sugli ecosistemi acquatici. I risultati della presente ricerca evidenziano come *Galdieria sulphuraria* sia in grado di metabolizzare efficacemente la materia organica contenuta in questi substrati, confermando le osservazioni riportate da (Henkanatte-Gedera et al. 2017b; Occhipinti et al. 2023; Zimmermann et al. 2020). Sottolineando il ruolo promettente di questa microalga nel ridurre il rischio ambientale correlato a tali residui e addirittura nella loro valorizzazione.

3.5 Mixotrofia: effetto del rapporto tra luce e carbonio organico

L'obiettivo di questa sperimentazione è stato quello di indagare l'effetto combinato dell'intensità luminosa (I_0) e della concentrazione di carbonio organico nel mezzo di coltura sul comportamento della microalga in regime mixotrofico. A tal fine, sono stati selezionati tre livelli di concentrazione di substrato organico (0,6, 1,3, 3,0 e 6,0 g_C L⁻¹) e due intensità luminose (75 e 150 μmol m⁻² s⁻¹), generando diverse combinazioni sperimentali. Inoltre, per poter condurre un confronto, è stata considerata per la discussione dei risultati anche le condizioni in autotrofia ed eterotrofia a 6 g_C L⁻¹ come controlli. Per ciascuna di queste combinazioni, è stata calcolata una nuova variabile che considerasse il rapporto luce incidente e carbonio organico in ingresso (mol g_C⁻¹), come mostrato nell'equazione che segue:

$$Luce/C_{C.organico} = \frac{I_0 \cdot A}{C_{TER} \cdot \dot{V}_{in}} \quad (3.4)$$

Dove I_0 è la intensità luminosa incidente ($\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$), A rappresenta la superficie irradiata del reattore, pari a $7,82 \times 10^{-3} \text{ m}^2$, mentre \dot{V}_{in} è la portata di terreno in ingresso (L s^{-1}). I risultati preliminari riportati rappresentano una prima analisi del comportamento del sistema mixotrofico. Tuttavia, si precisa che gli esperimenti sono tuttora in corso e che ulteriori dati saranno necessari per una valutazione complessiva e conclusiva delle interazioni tra intensità luminosa e disponibilità di carbonio organico.

Tabella 3.14 Sintesi delle condizioni sperimentali testate, incluse le diverse concentrazioni di carbonio organico e intensità luminosa, accompagnate dalle condizioni in eterotrofia e autotrofia e il corrispondente rapporto luce/carbonio organico.

| Metabolismo | Concentrazione substrato organico [g L ⁻¹] | Intensità luminosa I_0 [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] | Luce/ $C_{C.organico}$ [mol gc ⁻¹] | Fonte |
|-------------|--|---|---|------------------|
| Eterotrofia | 6,0 | / | 0 | Vivarelli (2023) |
| | 6,0 | 75 | 0,06 | Questa tesi |
| | 3,0 | 75 | 0,13 | Questa tesi |
| Mixotrofia | 1,3 | 75 | 0,30 | Questa tesi |
| | 0,6 | 75 | 0,65 | Questa tesi |
| | | 150 | 1,30 | Questa tesi |
| Autotrofia | 0 | 75 | Inf. | Questa tesi |

D'ora in avanti, i risultati saranno presentati in funzione del rapporto luce/carbonio organico.

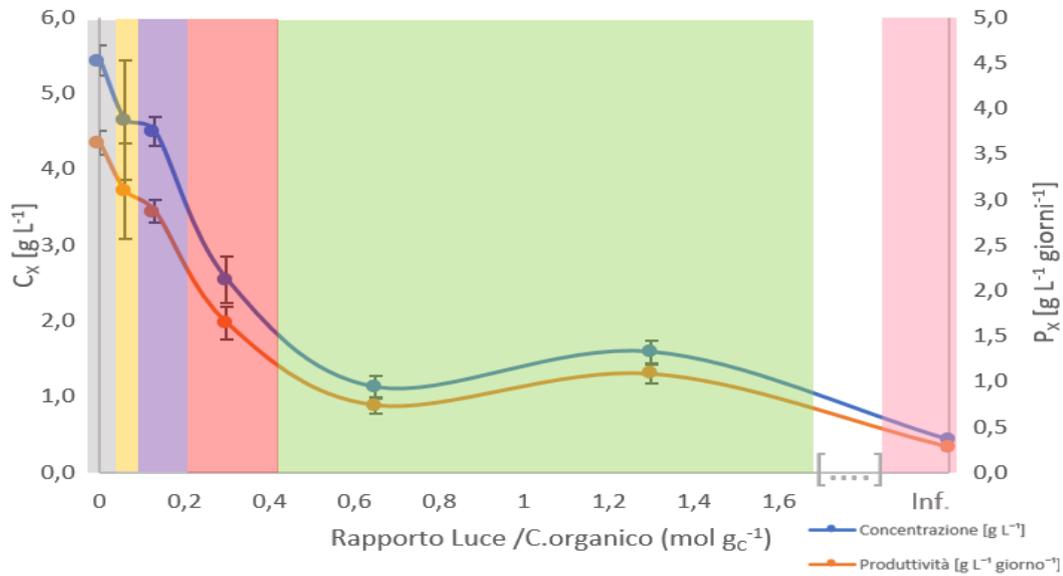


Figura 3.10 Andamento di C_X e P_X in funzione dei diversi rapporti luce/carbonio organico. Le aree evidenziate grafico rappresentano le diverse condizioni testate, parametriche al contenuto di carbonio organico nel terreno: grigio (eterotrofia $6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$) giallo (mixotrofia $6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$), viola (mixotrofia $3 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$), rosso (mixotrofia $1,3 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$), verde (mixotrofia $0,6 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$) e rosa (autotrofia).
Le linee sono state aggiunte per identificare meglio gli andamenti delle variabili.

Il grafico 3.10 illustra in modo evidente come la concentrazione di biomassa (C_X) e la produttività (P_X) varino al variare del rapporto tra carbonio organico e luce, mostrando un andamento analogo in tutti gli esperimenti. Questa similarità è attribuibile al fatto che il tempo di permanenza è stato fissato a $\tau 1,5$ giorni per tutte le condizioni sperimentali, garantendo uniformità tra le diverse condizioni testate. L'andamento generale è caratterizzato da una diminuzione significativa di entrambe le variabili nella parte sinistra del grafico. Tale riduzione evidenzia una progressiva diminuzione dell'efficienza metabolica delle cellule, probabilmente causata dalla ridotta disponibilità relativa di carbonio organico e delle scarse condizioni di illuminazione. Infine, nella parte destra si registra una lieve ripresa di produttività e concentrazione di biomassa ottenuta. Questo fenomeno potrebbe essere attribuito alla limitazione di substrato organico, che induce le cellule a sfruttare la luce per supportare la crescita (Patel et al. 2019) come osservato durante gli esperimenti in continuo di (Buckeridge 2022). Di fatti, Buckeridge dai suoi esperimenti condotti a $\tau 8$ giorni, con una concentrazione di carbonio nel mezzo pari a $0,77 \text{ g}_C \text{ L}^{-1}$ e una intensità luminosa di $94,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, è riuscita ad ottenere una mixotrofia pura in queste condizioni.

Tabella 3.15 Valori di concentrazione di biomassa e di produttività in funzione dei diversi rapporti luce/carbonio organico. Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| Metabolismo | Luce/ C _{C.Organico} [mol g _C ⁻¹] | C _X [g L ⁻¹] | P _X [g L ⁻¹ giorni ⁻¹] | Fonte |
|-------------|---|-------------------------------------|---|------------------|
| Eterotrofia | 0 | 5,44 ± 0,20 ^A | 3,63 ± 0,14 ^G | Vivarelli (2023) |
| | 0,06 | 4,64 ± 0,79 ^{AB} | 3,09 ± 0,53 ^{GH} | Questa tesi |
| | 0,13 | 4,50 ± 0,19 ^B | 2,87 ± 0,12 ^H | Questa tesi |
| Mixotrofia | 0,30 | 2,54 ± 0,31 ^C | 1,64 ± 0,18 ^I | Questa tesi |
| | 0,65 | 1,13 ± 0,15 ^D | 0,74 ± 0,10 ^L | Questa tesi |
| | 1,30 | 1,59 ± 0,15 ^E | 1,08 ± 0,10 ^M | Questa tesi |
| Autotrofia | Inf. | 0,43 ± 0,05 ^F | 0,28 ± 0,03 ^N | Questa tesi |

Come evidenziato nella tabella 3.15 a un basso rapporto luce/carbonio organico, pari a 0,13 mol g_C⁻¹, la concentrazione di biomassa (C_X) e la produttività (P_X) raggiungono i valori elevati, rispettivamente a 4,50 ± 0,19 g L⁻¹ e 2,87 ± 0,12 g L⁻¹ giorno⁻¹. L'analisi statistica conferma che questi valori sono significativamente diversi rispetto a quelli ottenuti a rapporti luce/carbonio più alti. Questo risultato suggerisce che una maggiore disponibilità di carbonio organico rispetto alla luce favorisce un metabolismo prevalentemente eterotrofo (Stadnichuk et al., 2022), permettendo un rapido accumulo di biomassa e una produttività elevata, come evidenziato in modo analogo da Villarejo et al., (1995) in *Chlorella vulgaris*. A titolo di confronto, in condizioni di eterotrofia pura, si osservano valori ancora più elevati di C_X e P_X, pari rispettivamente a 5,44 ± 0,20 g L⁻¹ e 3,63 ± 0,14 g L⁻¹ giorno⁻¹, evidenziando come l'utilizzo esclusivo di carbonio organico supporti una produttività massima, come confermato dall'analisi statistica. Con l'aumento del rapporto luce/carbonio organico, si osserva una riduzione significativa delle prestazioni di crescita: ad esempio, ad un rapporto di 0,30 mol g_C⁻¹, C_X scende a 2,54 ± 0,31 g L⁻¹ e P_X a 1,64 ± 0,18 g L⁻¹ giorno⁻¹. Tuttavia, come osservato da Buckeridge (2022), durante la crescita in mixotrofia, operando in un sistema in continuo a un rapporto pari a 0,65 mol g_C⁻¹ il glucosio diventa limitante per la crescita a tal punto da stimolare significativamente il metabolismo fotosintetico

della specie. È interessante notare come aumentando ulteriormente il rapporto luce/carbonio organica a $1,30 \text{ mol gC}^{-1}$, entrambi i parametri mostrano una lieve ripresa, con C_X pari a $1,59 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$ e P_X pari a $1,08 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$. Questo incremento suggerisce che, superata una certa soglia critica, la crescita e la produttività non siano più influenzate unicamente dalla disponibilità relativa di carbonio organico, ma possano essere determinate anche da fattori ambientali o metabolici, come una maggiore efficienza nell'utilizzo della luce. A confronto, in autotrofia la coltura registra valori nettamente inferiori, con una C_X pari a $0,433 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ e una P_X pari a $3,09 \pm 0,53 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$, evidenziando ulteriormente la limitazione intrinseca dovuta alla dipendenza esclusiva dalla luce come fonte energetica. Purtroppo, la maggior parte delle ricerche sull'effetto della luce sulla crescita e sulla resa di biomassa di *Galdieria sulphuraria* in regime mixotrofico è stata condotta in condizioni di coltivazione batch. Pertanto, non è noto quale sia l'impatto dei nutrienti limitanti durante la coltivazione continua su *Galdieria* in diverse condizioni di luce. Tuttavia, dagli esperimenti in condizioni autotrofe condotti da Baer et al. (2016) e Buckeridge (2022), emerge che è possibile aumentare le concentrazioni di biomassa modulando opportunamente lo spettro della radiazione luminosa. L'analisi statistica evidenzia differenze significative tra le condizioni sperimentali, come indicato dalle lettere distintive assegnate ai valori medi. Questo risultato sottolinea l'importanza di bilanciare attentamente luce e carbonio organico per ottimizzare la crescita e la produttività in *Galdieria sulphuraria*. Un'elevata disponibilità di carbonio organico favorisce maggiori produttività (P_X) e concentrazioni di biomassa (C_X) grazie al potenziamento del metabolismo eterotrofo, che consente alle cellule di sfruttare intensamente il substrato organico (Oesterhelt et al. 2007). Tuttavia, la limitazione del contenuto di carbonio porta a una riduzione dell'attività eterotrofa, con un conseguente calo di C_X e P_X , ma con un incremento dell'attività fotosintetica indotto dalla maggiore disponibilità di luce (Zhu et al. 2023). Inoltre, l'equilibrio tra luce e carbonio influenza anche la produzione di pigmenti. A elevate concentrazioni di carbonio organico, si osserva una scarsa presenza di pigmenti fotosintetici, poiché la coltura opera principalmente in modalità eterotrofa. Al contrario, aumentando il rapporto luce/carbonio organico, la coltura passa progressivamente verso una condizione realmente mixotrofa, caratterizzata da un ritorno al colore verde e da una maggiore

sintesi di pigmenti, grazie alla riattivazione del metabolismo fotosintetico. Questo equilibrio risulta quindi cruciale per ottimizzare sia la produttività sia la qualità della biomassa in termini di pigmenti.

3.5.1 Analisi comparativa del contenuto di pigmenti in funzione del rapporto luce/carbonio organico

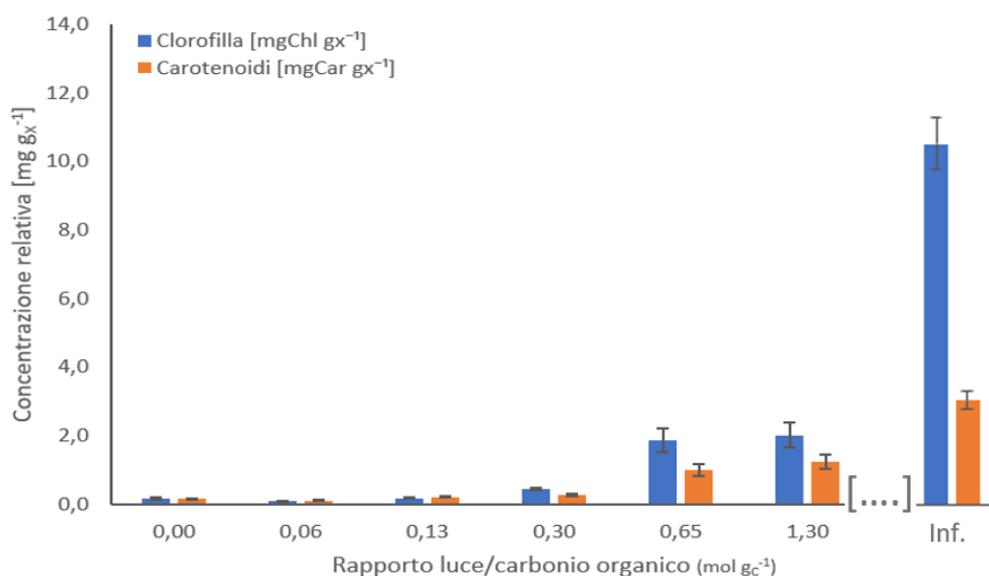


Figura 3.11 Contenuto relativo di clorofilla e carotenoidi normalizzato sul quantitativo di biomassa, espressi mg g_X⁻¹ in funzione dei vari rapporti luce/carbonio organico.

Il grafico mostra il contenuto relativo di clorofilla (mgChl g_X⁻¹) e carotenoidi (mgCar g_X⁻¹) in funzione del rapporto luce/carbonio organico, evidenziando una chiara relazione tra la disponibilità di carbonio organico, la luce e il metabolismo delle cellule di *Galdieria sulphuraria*.

Tabella 3.16 Valori di concentrazione relativa di clorofilla e carotenoidi in funzione dei diversi rapporti luce/carbonio organico. Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| Luce/ C_C.Organico [mol g_C⁻¹] | Clorofilla [mg g_x⁻¹] | Carotenoidi [mg g_x⁻¹] | Fonte |
|--|---|--|------------------|
| 0 | 0,17 ± 0,04 ^A | 0,14 ± 0,03 ^F | Vivarelli (2023) |
| 0,06 | 0,08 ± 0,03 ^B | 0,09 ± 0,02 ^G | Questa tesi |
| 0,13 | 0,16 ± 0,02 ^A | 0,20 ± 0,02 ^F | Questa tesi |
| 0,30 | 0,44 ± 0,05 ^C | 0,27 ± 0,03 ^H | Questa tesi |
| 0,65 | 1,85 ± 0,35 ^D | 0,99 ± 0,18 ^I | Questa tesi |
| 1,30 | 2,01 ± 0,35 ^D | 1,23 ± 0,22 ^I | Questa tesi |
| Inf. | 11,07 ± 0,79 ^E | 3,20 ± 0,25 ^L | Questa tesi |

A un basso rapporto luce/carbonio organico (0-0,06-0,13 mol g_C⁻¹), il contenuto di clorofilla e carotenoidi risulta minimo, indipendentemente dalla presenza o assenza di luce. Questo comportamento è coerente con le osservazioni fatte in precedenza nel paragrafo 3.1.4: in presenza di elevate quantità di carbonio organico e bassa intensità luminosa, le cellule prediligono un metabolismo eterotrofo, utilizzando il substrato organico disponibile per crescere senza attivare significativamente il metabolismo fotosintetico (Oesterhelt et al. 2007). Questo porta alla produzione di una biomassa di colore più giallo (Figura 3.12, reattore al centro), con un contenuto pigmentale ridotto, tipico di condizioni in cui la fotosintesi è poco attiva. Da notare che i valori registrati a 0,13 mol g_C⁻¹ sono statisticamente simili a quelli osservati in condizioni di eterotrofia pura (0 mol g_C⁻¹), dove il contenuto di clorofilla e carotenoidi si attesta rispettivamente su 0,17 ± 0,04 mg g_x⁻¹ e 0,14 ± 0,03 mg g_x⁻¹, confermando che in assenza di luce le cellule operano esclusivamente in modalità eterotrofa. Inoltre, la condizione a 0,06 mol g_C⁻¹ presenta un contenuto di pigmenti inferiore sia rispetto alla condizione a 0,13 mol g_C⁻¹, sia, sorprendentemente, rispetto alla coltivazione in eterotrofia a 0 mol g_C⁻¹. All'aumentare del rapporto luce/carbonio organico, come a 0,30 mol g_C⁻¹, si osserva un aumento del contenuto relativo di clorofilla e carotenoidi, riscontrabile anche macroscopicamente nel

fotobioreattore (Figura 3.12, reattore a destra). Questa variazione indica che, con una minor disponibilità di carbonio, il metabolismo fotosintetico inizia a essere più attivo. In questa fase, le cellule iniziano a bilanciare l'utilizzo del carbonio organico con l'attivazione della fotosintesi, portando a un incremento nei pigmenti fotosintetici. A rapporti luce/carbonio organico più elevati, come 0,65 e 1,30 mol g_C^{-1} , si osservano le massime concentrazioni relative di clorofilla e carotenoidi. In queste condizioni, la limitazione del carbonio organico risulta evidente, costringendo le cellule a sfruttare maggiormente la luce per sostenere il proprio metabolismo, come riscontrabile dal colore della biomassa (Figura 3.12, fotobioreattore a sinistra). Questa situazione favorisce l'attivazione della fotosintesi, con un incremento della produzione di pigmenti fotosintetici, tra cui clorofilla e carotenoidi. A titolo di confronto, in coltivazione continua autotrofa, il contenuto di pigmenti risulta nettamente più elevato rispetto a tutte le condizioni mixotrofiche, con valori di clorofilla pari a $11,07 \pm 0,79$ mg g_x^{-1} e di carotenoidi pari a $3,20 \pm 0,25$ mg g_x^{-1} . Questo risultato è coerente con un metabolismo interamente fotosintetico, in cui la luce rappresenta l'unica fonte energetica disponibile, stimolando al massimo la sintesi di pigmenti per supportare la crescita algale. Al contrario, le condizioni mixotrofiche, pur aumentando il contenuto pigmentale rispetto alla condizione eterotrofa, non raggiungono mai i livelli osservati in autotrofia pura, evidenziando una competizione tra i due metabolismi.



Figura 3.12 Fotobioreattori rappresentativi delle tre condizioni sperimentali con diversi rapporti luce/carbonio organico. Da sinistra a destra: rapporto luce/carbonio di 1,3 mol g_C^{-1} (coltura verde), 0,13 mol g_C^{-1} (coltura gialla) e 0,30 mol g_C^{-1} (coltura intermedia). L'immagine evidenzia le variazioni cromatiche delle colture, indicative dei diversi metabolismi predominanti.

È interessante osservare che, a un rapporto luce/carbonio organico di 0,65 o 1,3 mol g_C^{-1} , il contenuto di carotenoidi risulta significativamente più elevato rispetto alle condizioni precedenti. Questo potrebbe riflettere un meccanismo di protezione cellulare contro l'eccesso di luce o uno stress ossidativo indotto da condizioni subottimali. Tale fenomeno potrebbe essere spiegato dal fatto che l'aggiunta di una appropriata quantità di glucosio può eliminare la fotoinibizione della crescita ad alte intensità di luce, che invece potrebbe essere osservata in coltivazione autotrofica con la stessa intensità di luce, come dimostrato da Cheirsilp et al., (2012). Questi risultati confermano la capacità di *Galdieria sulphuraria* di adattare il proprio metabolismo fotosintetico e protettivo in risposta alle condizioni ambientali, massimizzando la propria efficienza nelle diverse situazioni sperimentali. Spostando l'attenzione verso i valori di concentrazione assoluta di clorofilla e carotenoidi (espressa in $mg L^{-1}$) per le varie condizioni testate, i risultati sono evidenziati in figura 3.13, con i valori corrispondenti riportati nella tabella 3.17.

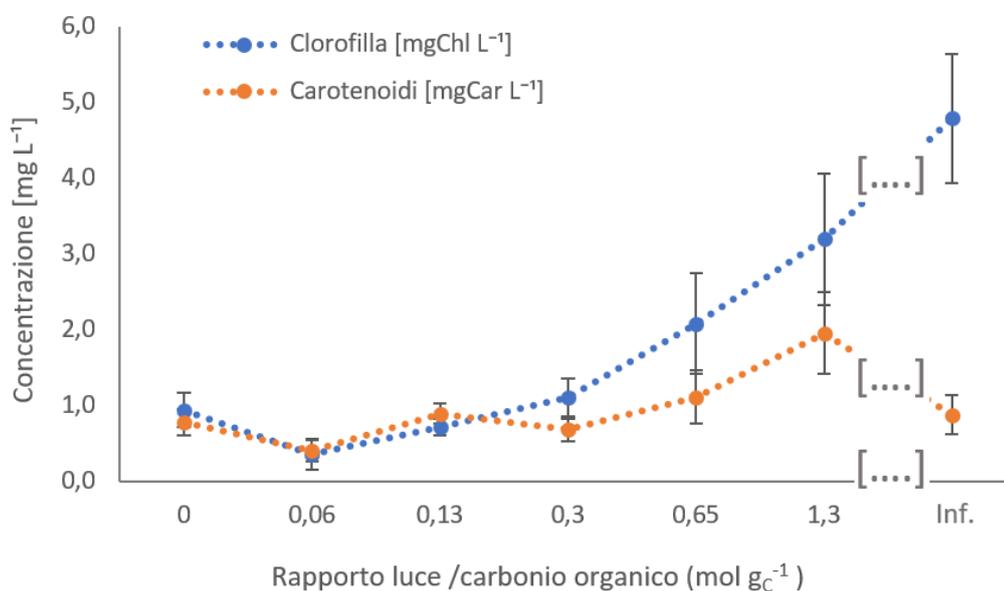


Figura 3.13 Contenuto clorofilla e carotenoidi espressi in $mg L^{-1}$ in funzione del rapporto luce/carbonio organico. Le linee tratteggiate sono state aggiunte per identificare meglio gli andamenti delle variabili.

Tabella 3.17 Valori concentrazione assoluta di clorofilla e carotenoidi in funzione dei diversi rapporti luce/carbonio organico. Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| Luce/C _{C.organico} [mol g _C ⁻¹] | Clorofilla [mg L ⁻¹] | Carotenoidi [mg L ⁻¹] | Fonte |
|---|----------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| 0 | 0,94 ± 0,23 ^A | 0,78 ± 0,17 ^F | Vivarelli (2023) |
| 0,06 | 0,35 ± 0,20 ^B | 0,41 ± 0,15 ^G | Questa tesi |
| 0,13 | 0,73 ± 0,09 ^A | 0,76 ± 0,14 ^F | Questa tesi |
| 0,30 | 1,06 ± 0,18 ^{AC} | 0,65 ± 0,07 ^F | Questa tesi |
| 0,65 | 2,06 ± 0,27 ^C | 1,05 ± 0,21 ^F | Questa tesi |
| 1,30 | 3,20 ± 0,72 ^D | 1,96 ± 0,42 ^H | Questa tesi |
| Inf. | 4,79 ± 0,85 ^E | 0,90 ± 0,15 ^F | Questa tesi |

A bassi rapporti luce/carbonio organico, il contenuto assoluto di pigmenti fotosintetici risulta limitato. Per i rapporti 0,06, 0,13 e 0,30 mol g_C⁻¹, la clorofilla e i carotenoidi mostrano valori normalizzati per unità di biomassa relativamente bassi, dovuti alla predominanza di un metabolismo eterotrofo, che riduce la sintesi di pigmenti. Di fatti l'analisi statistica conferma come queste due condizioni abbiano un contenuto assoluto di pigmenti simile a quello che si riscontra nella condizione in eterotrofia a 0 mol g_C⁻¹. In queste condizioni, il contenuto di pigmenti risulta basso, indicando che le cellule allocano risorse limitate alla sintesi di pigmenti fotosintetici. Tuttavia, l'analisi statistica non evidenzia differenze significative tra 0,13 e 0,30 mol g_C⁻¹, indicando che l'effetto della luce in queste condizioni è ancora limitato e non sufficiente per un aumento consistente dei pigmenti. Con rapporti luce/carbonio più elevati, pari a 0,65 e 1,30 mol g_C⁻¹, si osserva un netto incremento del contenuto assoluto di pigmenti. Per il rapporto 0,65 mol g_C⁻¹, la clorofilla raggiunge 2,06 ± 0,27 mg L⁻¹, mentre i carotenoidi sono pari a 1,05 ± 0,21 mg L⁻¹. Il contenuto di pigmenti a un rapporto di 1,30 mol g_C⁻¹ non mostra differenze statisticamente significative rispetto alla condizione a 0,65 mol g_C⁻¹. Complessivamente si può osservare come le condizioni poste a un elevato rapporto luce/carbonio organico presentano differenze statisticamente significative rispetto a quelle con un più basso rapporto. Questo fenomeno indica che, in condizioni di maggior intensità luminosa, la luce agisce come fattore determinante

per sostenere la crescita cellulare, contribuendo indirettamente all'aumento della quantità complessiva di pigmenti fotosintetici prodotti, grazie all'incremento sulla quantità di biomassa ottenuta. In conclusione, per rapporti luce/carbonio più elevati (0,65 e 1,3 mol g_C⁻¹), l'aumento della luce stimola la crescita della biomassa, contribuendo così a una maggiore concentrazione totale di pigmenti. Tuttavia, il contenuto assoluto di pigmenti risulta minore rispetto all'autotrofia, che invece registra un contenuto maggiore di clorofilla pari a 4,80 ± 0,85 mg L⁻¹, mentre i carotenoidi risultano calati 0,88 ± 0,25 mg L⁻¹, suggerendo un minor stress cellulare. Questi risultati confermano che regolare il rapporto luce/carbonio organico è una strategia efficace per aumentare la produzione totale di pigmenti fotosintetici.

3.6 Esperimenti in batch

Gli esperimenti in batch condotti in condizioni eterotrofe con glucosio mirano a valutare la crescita e il metabolismo di *Galdieria sulphuraria* in presenza di un substrato organico ben definito. Questi esperimenti sono stati eseguiti in triplicato per garantire la riproducibilità dei dati e ridurre l'errore sperimentale. Le colture sono state avviate con una concentrazione iniziale media di biomassa (C_X) pari a 0,78 g L⁻¹, utilizzando un terreno di coltura arricchito con 15 g L⁻¹ di glucosio. Tale concentrazione è stata scelta al fine di garantire una disponibilità finale di carbonio organico pari a 6 g_C L⁻¹ nel mezzo, ottimizzando le condizioni per un metabolismo eterotrofo sostenuto. L'approccio in batch consente di monitorare la dinamica di consumo del substrato e l'accumulo di biomassa in un sistema chiuso, fornendo dati chiave sull'efficienza metabolica e sulle potenzialità produttive di questa microalga in condizioni di eterotrofia pura. Questi esperimenti rappresentano un passo fondamentale per comprendere il comportamento di *Galdieria sulphuraria* in condizioni controllate e per valutare l'utilizzo del glucosio come fonte di carbonio organico e poterle confrontare con le rese ottenuti in continuo.

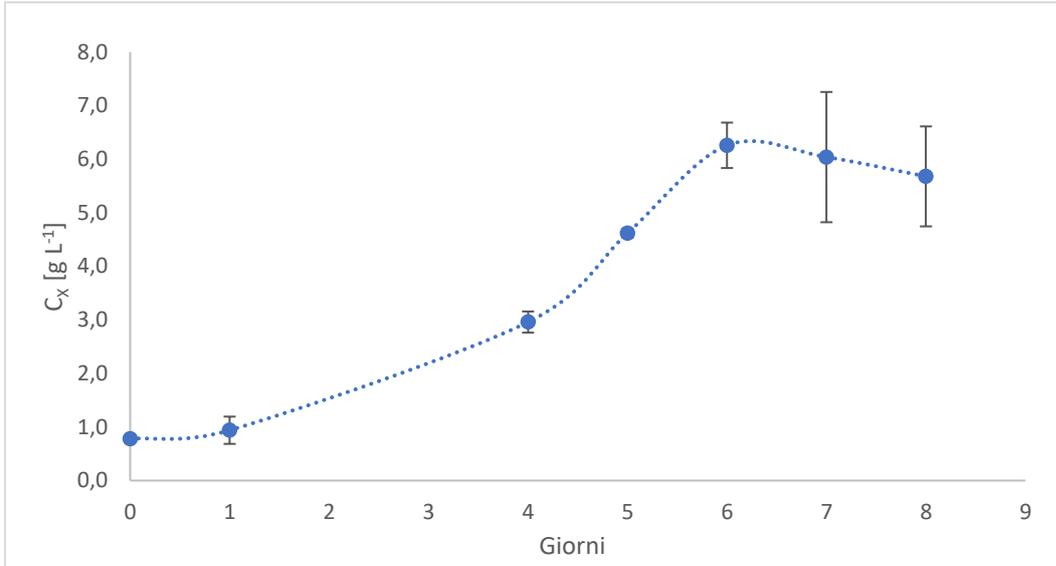


Figura 3.14 Andamento C_X in funzione del tempo in regime eterotrofo. La linea tratteggiata è stata aggiunta per identificare meglio l'andamento della concentrazione di biomassa.

Nella fase stazionaria si è registrato una C_X massima pari $6,34 \text{ g L}^{-1}$, questo risultato è inferiore rispetto a $11,05 \pm 1,71 \text{ g L}^{-1}$ ottenuti da (Vivarelli 2023) nelle medesime condizioni in batch. In un sistema batch, a velocità specifica di crescita μ (giorno^{-1}) nella fase esponenziale e la produttività della biomassa P_X ($\text{g L}^{-1} \text{giorno}^{-1}$) sono determinate, in accordo con Minyuk et al. (2020), come segue:

$$\mu = \frac{\ln C_{X,1} - \ln C_{X,2}}{t_{Finale} - t_{Iniziale}} \quad (3.4)$$

$$P_{X, Batch} = \frac{C_{X, Finale} - C_{X, Iniziale}}{t_{Finale} - t_{Iniziale}} \quad (3.5)$$

dove $C_{X, Finale}$ e $C_{X, Iniziale}$ sono le concentrazioni di biomassa (g L^{-1}) secondo il peso secco negli istanti finali ed iniziali dell'esperimento rispettivamente, mentre $(t_{Finale} - t_{Iniziale})$ è l'intervallo di tempo considerato (giorni). Quest'ultimo si riferisce all'intera durata dell'esperimento batch. Negli esperimenti presentati in questo lavoro si è ottenuto rispettivamente una velocità di crescita pari a $1,00 \text{ giorni}^{-1}$, un tasso di crescita specifico piuttosto basso per *G. sulphuraria*, rispetto ad altre alghe, come alghe verdi e cianobatteri, e una produttività $0,64 \text{ g L}^{-1} \text{giorno}^{-1}$.

Tabella 3.18 Confronto rese $Y_{C/X}$, $Y_{cons,C}$ e $Y_{mant,C}$ ottenute in batch e in sistema continuo. Le lettere rappresentano i risultati dell'analisi statistica, e i valori medi che non condividono lettere uguali sono significativamente diversi.

| | $Y_{C/X}$ [%] | $Y_{cons,C}$ [%] | $Y_{mant,C}$ [%] |
|----------|------------------|------------------|------------------|
| Batch | 40 ± 3^A | 48 ± 8^A | 52 ± 8^A |
| Continuo | 42 ± 4^A | 65 ± 5^B | 20 ± 5^B |

La Tabella 3.18 riporta un confronto tra le rese di conversione del carbonio in biomassa ($Y_{C/X}$), la resa di consumo del carbonio ($Y_{cons,C}$) e la resa di mantenimento ($Y_{mant,C}$) ottenute in esperimenti condotti in batch e in sistema continuo. I valori medi di $Y_{C/X}$ sono simili tra batch ($40 \pm 3\%$) e sistema continuo ($42 \pm 4\%$), senza differenze significative secondo l'analisi statistica. Questo suggerisce che, indipendentemente dal tipo di sistema, la frazione di carbonio convertita in biomassa rimane costante, evidenziando un'efficienza comparabile nel processo di biosintesi in entrambe le modalità operative. La resa di consumo del carbonio ($Y_{cons,C}$) è significativamente superiore nel sistema continuo ($65 \pm 5\%$) rispetto al batch ($48 \pm 8\%$). Questo risultato riflette una maggiore efficienza nel consumo di carbonio organico nel sistema continuo, probabilmente grazie a un controllo più uniforme delle condizioni operative (ad esempio, tasso di diluizione, concentrazione di nutrienti e condizioni di crescita), che riducono gli sprechi di substrato. La resa di mantenimento ($Y_{mant,C}$) è significativamente più alta nel batch ($52 \pm 8\%$) rispetto al sistema continuo ($20 \pm 5\%$). Questo indica che, in condizioni batch, una frazione maggiore del carbonio organico è destinata ai fabbisogni energetici di base delle cellule, probabilmente a causa di stress metabolici. Al contrario, nel sistema continuo, il carbonio utilizzato per il mantenimento è ridotto, suggerendo che le cellule operano in condizioni più favorevoli e stabili, ottimizzando la crescita. In conclusione il sistema continuo si distingue per una maggiore efficienza nel consumo di carbonio ($Y_{cons,C}$) e una ridotta frazione destinata al mantenimento ($Y_{mant,C}$), rendendolo un'opzione preferibile per ottimizzare la produttività e minimizzare gli sprechi di substrato. Al contrario, la resa di conversione del carbonio in biomassa ($Y_{C/X}$) risulta simile nei due sistemi,

suggerendo che la modalità operativa non influisca sulla capacità delle cellule di trasformare il carbonio organico in biomassa. Nel sistema batch, il valore elevato di $Y_{mant,c}$ potrebbe riflettere una minore uniformità delle condizioni operative, che richiede alle cellule di destinare una frazione maggiore del carbonio al mantenimento energetico. Questo aspetto evidenzia come i sistemi continui, grazie alla maggiore stabilità delle condizioni di coltivazione, offrano un vantaggio in termini di efficienza complessiva. In conclusione, questi risultati sottolineano l'importanza di selezionare il sistema operativo in base agli obiettivi produttivi. Il sistema continuo si conferma come il più produttivo, sia in termini di concentrazione di biomassa (C_X) e produttività (P_X), sia per l'efficienza nel consumo di carbonio. Tuttavia, è importante considerare che, specialmente su larga scala, il sistema continuo può risultare meno conveniente a causa delle problematiche ambientali e operative ad esso associate, che ne limitano la sostenibilità complessiva.

4. Conclusioni

Il presente lavoro di tesi si prefigge di investigare nel dettaglio la coltivazione in continuo della specie estremofila *Galdieria sulphuraria*, studiandone le prestazioni ai differenti meccanismi trofici. In primo luogo, la campagna sperimentale si è concentrata sul regime eterotrofico, selezionando i livelli operativi ottimali per ottimizzare la produttività del sistema, nonché le rese di utilizzo del substrato. Rispetto alla modulazione del pH del terreno in ingresso, gli esperimenti hanno evidenziato un generale abbassamento dello stesso nell'ambiente di reazione, conseguentemente alla produzione netta di CO₂ con la respirazione cellulare. Inoltre, i risultati hanno evidenziato l'intorno di 1,60 come l'ottimo di pH del sistema, ottenendo produttività pari a 4,66 g L⁻¹ d⁻¹, e al contempo massimizzando l'efficacia di consumo del substrato: della totalità del carbonio organico consumato, pari al 85%, il 65% è stato impiegato per l'accumulo di biomassa, con il restante 20% invece destinato al mantenimento. Successivamente, è stato poi investigato l'effetto della disponibilità del carbonio organico sulla coltura, fornito sottoforma di glucosio. In questo caso, i risultati si dispongono ai vari livelli in un trend asintotico, seguendo la nota cinetica di Monod. Tale andamento suggerisce 6 g_C L⁻¹ come il valore migliore per il proseguimento della campagna sperimentale, in quanto miglior compromesso tra performance e utilizzo del substrato, in quanto disponibilità maggiori di questo non portano a miglioramenti significativi della coltivazione. Essendo poi nota in letteratura la capacità di *G. sulphuraria* di crescere utilizzando substrati carboniosi differenti, ne è stata studiata la fattibilità in continuo, impiegando fonti quali lattosio, galattosio, e permeato del latte, residuo dell'industria casearia. Se da una parte glucosio e lattosio sembrerebbero portare a simili risultati, sia in termini di produttività che in termini di efficienza di consumo del carbonio (nell'intorno di 4 g L⁻¹ d⁻¹ e 65% rispettivamente), lo studio in dinamico ha permesso di confermare il glucosio come substrato di più facile assimilazione, permettendo l'ottenimento dello stazionario più velocemente rispetto al lattosio. Inoltre, la coltivazione della specie impiegando il permeato del latte, seppur con risultati inferiori rispetto a substrati più semplici, sostiene la sua elevata flessibilità metabolica, evidenziando il suo potenziale per applicazioni di biorisanamento e per la valorizzazione di sottoprodotti industriali.

Infine, lo studio relativo all'eterotrofia si è concluso comparando l'effetto del tempo di permanenza, mediante esperimenti raccolti da un precedente lavoro di tesi, con quello sui diversi regimi trofici. In primo luogo, tale analisi ha dimostrato che l'utilizzo del carbonio organico per sostenere la crescita cellulare offre notevoli miglioramenti delle prestazioni, con produttività che, per tutti i livelli testati, risultano essere da 2 fino a 4 volte maggiori rispetto al tradizionale regime autotrofico. Inoltre, l'elevata disponibilità di carbonio organico, fissato a 6 g C L^{-1} sia per gli esperimenti in eterotrofo e mixotrofo hanno evidenziato un analogo comportamento dei due regimi trofici: non solo per concentrazione e produttività di biomassa, ma anche per il contenuto di pigmenti. Infatti, confrontato con gli esperimenti in autotrofo, quelli in eterotrofo e mixotrofo riportano valori nettamente inferiori: questo risultato fa presupporre che, in condizioni non limitanti di substrato organico, la specie predilige il metabolismo respirativo a quello fotosintetico, a discapito di queste molecole. A tal proposito, questa teoria è stata ulteriormente approfondita analizzando l'effetto combinato di diversi livelli di glucosio e luce in colture mixotrofe in continuo. Gli esperimenti hanno dimostrato non solo che, in condizioni di limitazione di carbonio organico, è possibile stimolare la produzione di pigmenti, ma che anche la luce stessa può portare ad un incremento significativo della biomassa: a $0,6 \text{ g C L}^{-1}$ forniti dal terreno di coltura, il passaggio da 75 a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ha permesso di ottenere un incremento di circa $0,4 \text{ g L}^{-1}$ di biomassa, che si traduce in un incremento di circa 52% e 72% per il contenuto totale di clorofilla e carotenoidi rispettivamente. In conclusione, il lavoro fatto rappresenta uno studio in parallelo della specie nei regimi eterotrofico e mixotrofico. Se però dal lato eterotrofico lo studio in continuo delle performance di crescita può considerarsi molto approfondito, la mixotrofia, specialmente in CSTR è invece un ambito ancora poco esplorato. Per dare maggiore spessore a quanto già svolto, è sicuramente necessario andare ad approfondire ulteriormente l'effetto combinato luce e carbonio organico, per confermare in primis i risultati raccolti finora e per individuare il binomio ottimale di lavoro. Inoltre, il tutto potrebbe poi essere declinato alla sperimentazione di altre variabili, come il tempo di permanenza e/o la tipologia di substrato carbonioso, per individuare nuovi ottimi operativi e favorire l'economicità del processo stesso.

5. Bibliografia

- Abdur Razzak, Shaikh, Khairul Bahar, K. M. Oajedul Islam, Abdul Khaleel Haniffa, Mohammed Omar Faruque, S. M. Zakir Hossain, and Mohammad M. Hossain. 2024. “Microalgae Cultivation in Photobioreactors: Sustainable Solutions for a Greener Future.” *Green Chemical Engineering* 5(4):418–39. doi: 10.1016/J.GCE.2023.10.004.
- Abiusi, F., B. Tumulero, L. Neutsch, and A. Mathys. 2024. “Productivity, Amino Acid Profile, and Protein Bioaccessibility in Heterotrophic Batch Cultivation of *Galdieria Sulphuraria*.” *Bioresource Technology* 399:130628. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2024.130628.
- Abiusi, Fabian, Pedro Moñino Fernández, Stefano Canziani, Marcel Janssen, René H. Wijffels, and Maria Barbosa. 2022. “Mixotrophic Cultivation of *Galdieria Sulphuraria* for C-Phycocyanin and Protein Production.” *Algal Research* 61:102603. doi: 10.1016/J.ALGAL.2021.102603.
- Abiusi, Fabian, Egbert Trompetter, Hugo Hoenink, Rene H. Wijffels, and Marcel Janssen. 2021. “Autotrophic and Mixotrophic Biomass Production of the Acidophilic *Galdieria Sulphuraria* ACUF 64.” *Algal Research* 60:102513. doi: 10.1016/J.ALGAL.2021.102513.
- Abiusi, Fabian, Egbert Trompetter, Antonino Pollio, Rene H. Wijffels, and Marcel Janssen. 2022. “Acid Tolerant and Acidophilic Microalgae: An Underexplored World of Biotechnological Opportunities.” *Frontiers in Microbiology* 13:820907. doi: 10.3389/FMICB.2022.820907/BIBTEX.
- Abiusi, Fabian, Rene H. Wijffels, and Marcel Janssen. 2020. “Doubling of Microalgae Productivity by Oxygen Balanced Mixotrophy.” *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 8(15):6065–74. doi: 10.1021/ACSSUSCHEMENG.0C00990/ASSET/IMAGES/LARGE/SC0C00990_0004.JPEG.

- Abreu, Ana P., Rui C. Morais, José A. Teixeira, and João Nunes. 2022. “A Comparison between Microalgal Autotrophic Growth and Metabolite Accumulation with Heterotrophic, Mixotrophic and Photoheterotrophic Cultivation Modes.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 159:112247. doi: 10.1016/J.RSER.2022.112247.
- Acién Fernández, F. G., José María Fernández Sevilla, and Emilio Molina Grima. 2019. “Costs Analysis of Microalgae Production.” *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biofuels from Algae, Second Edition* 551–66. doi: 10.1016/B978-0-444-64192-2.00021-4.
- Ahmad, Imran, Norhayati Abdullah, Iwamoto Koji, Ali Yuzir, and Shaza Eva Muhammad. 2021. “Evolution of Photobioreactors: A Review Based on Microalgal Perspective.” *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 1142(1):012004. doi: 10.1088/1757-899X/1142/1/012004.
- Allen, Mary Mennes. 1968. “SIMPLE CONDITIONS FOR GROWTH OF UNICELLULAR BLUE-GREEN ALGAE ON PLATES1, 2.” *Journal of Phycology* 4(1):1–4. doi: 10.1111/J.1529-8817.1968.TB04667.X.
- Allen, Sandra A., William Clark, J. Michael McCaffery, Zhen Cai, Alison Lanctot, Patricia J. Slininger, Z. Lewis Liu, and Steven W. Gorsich. 2010. “Furfural Induces Reactive Oxygen Species Accumulation and Cellular Damage in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Biotechnology for Biofuels* 3(1):1–10. doi: 10.1186/1754-6834-3-2/FIGURES/6.
- Anon. 2021a. “In Brief to The State of Food Security and Nutrition in the World 2021.” *In Brief to The State of Food Security and Nutrition in the World 2021*. doi: 10.4060/CB5409EN.
- Anon. 2021b. “OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030.” doi: 10.1787/19428846-EN.
- Anon. 2022b. “World Population Prospects - Population Division - United Nations.”
- Anon. n.d.-a. “EN.”

- Anon. n.d.-b. "Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition : Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation." Retrieved October 30, 2024 (<https://iris.who.int/handle/10665/43411>).
- Arienti, G. 2016. *Le Basi Molecolari Della Nutrizione*. edited by Piccin.
- Arsad, S., Y. W. Mulasari, N. Y. Sari, E. D. Lusiana, Y. Risjani, M. Musa, M. Mahmudi, F. S. Prasetya, and L. A. Sari. 2022. "Microalgae Diversity in Several Different Sub-Habitats." *Global Journal of Environmental Science and Management* 8(4):561–74. doi: 10.22034/GJESM.2022.04.08.
- Baalan, Chase Van, Warren M. Pulich, and Martin Gibbs Brandeis. 1973. "Heterotrophic Growth of the Microalgae." *Critical Reviews in Microbiology* 2(2):229–54. doi: 10.3109/10408417309108386/ASSET//CMS/ASSET/16C45126-37AB-49FB-9824-09C503B7BE8C/10408417309108386.FP.PNG.
- Baer, Sascha, Martin Heining, Philipp Schwerna, Rainer Buchholz, and Holger Hübner. 2016. "Optimization of Spectral Light Quality for Growth and Product Formation in Different Microalgae Using a Continuous Photobioreactor." *Algal Research* 14:109–15. doi: 10.1016/J.ALGAL.2016.01.011.
- Bailey, R. W., and L. A. Staehelin. 1968. "The Chemical Composition of Isolated Cell Walls of *Cyanidium Caldarium*." *Journal of General Microbiology* 54(2):269–76. doi: 10.1099/00221287-54-2-269/CITE/REFWORKS.
- Banihashemi, Fateme, Amr F. M. Ibrahim, Shuguang Deng, and Jerry Y. S. Lin. 2023. "Pyrolysis and Gasification Characteristics of *Galdieria Sulphuraria* Microalgae." *Bioenergy Research* 16(1):611–21. doi: 10.1007/S12155-022-10449-7/TABLES/3.
- Barbosa, Maria J., Marcel Janssen, Christian Südfeld, Sarah D'Adamo, and Rene H. Wijffels. 2023. "Hypes, Hopes, and the Way Forward for Microalgal Biotechnology." *Trends in Biotechnology* 41(3):452–71. doi: 10.1016/J.TIBTECH.2022.12.017/ASSET/9B5B361C-6782-4332-9301-474A3DE16B8B/MAIN.ASSETS/GR4.JPG.

- Barkia, Ines, Nazamid Saari, and Schonna R. Manning. 2019. "Microalgae for High-Value Products towards Human Health and Nutrition." *Marine Drugs* 17(5).
- Batista, Ana Paula, Luísa Gouveia, Narcisa M. Bandarra, José M. Franco, and Anabela Raymundo. 2013. "Comparison of Microalgal Biomass Profiles as Novel Functional Ingredient for Food Products." *Algal Research* 2(2):164–73. doi: 10.1016/j.algal.2013.01.004.
- Béchet, Quentin, Andy Shilton, and Benoit Guieysse. 2013. "Modeling the Effects of Light and Temperature on Algae Growth: State of the Art and Critical Assessment for Productivity Prediction during Outdoor Cultivation." *Biotechnology Advances* 31(8):1648–63. doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2013.08.014.
- Becker, E. W. 2007. "Micro-Algae as a Source of Protein." *Biotechnology Advances* 25(2):207–10. doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2006.11.002.
- Becker, W. 2004. *Microalgae in Human and Animal Nutrition*. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. edited by A. Richmond.
- Benner, Philipp, Lisa Meier, Annika Pfeffer, Konstantin Krüger, José Enrique Oropeza Vargas, and Dirk Weuster-Botz. 2022. "Lab-Scale Photobioreactor Systems: Principles, Applications, and Scalability." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 45(5):791. doi: 10.1007/S00449-022-02711-1.
- Blanken, Ward, Maria Cuaresma, René H. Wijffels, and Marcel Janssen. 2013. "Cultivation of Microalgae on Artificial Light Comes at a Cost." *Algal Research* 2(4):333–40. doi: 10.1016/J.ALGAL.2013.09.004.
- Borella, Lisa, Daniele Diotto, Elena Barbera, Davide Fiorimonte, Eleonora Sforza, and Nicola Trivellin. 2022. "Application of Flashing Blue-Red LED to Boost Microalgae Biomass Productivity and Energy Efficiency in Continuous Photobioreactors." *Energy* 259:125087. doi: 10.1016/J.ENERGY.2022.125087.

- Borella, Lisa, Davide Ortolan, Elena Barbera, Nicola Trivellin, and Eleonora Sforza. 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. doi: 10.1016/J.ENCONMAN.2021.114330.
- Borella, Lisa, Eleonora Sforza, and Alberto Bertucco. 2021. "Effect of Residence Time in Continuous Photobioreactor on Mass and Energy Balance of Microalgal Protein Production." *New Biotechnology* 64:46–53. doi: 10.1016/J.NBT.2021.05.006.
- Borella, Lisa, Eleonora Sforza, and Alberto Bertucco. 2022. "An Internally LED Illuminated Photobioreactor to Increase Energy Conversion Efficiency: Design and Operation." *Energy Conversion and Management* 270:116224. doi: 10.1016/J.ENCONMAN.2022.116224.
- Brindhadevi, Kathirvel, Thangavel Mathimani, Eldon R. Rene, Sabarathinam Shanmugam, Nguyen Thuy Lan Chi, and Arivalagan Pugazhendhi. 2021. "Impact of Cultivation Conditions on the Biomass and Lipid in Microalgae with an Emphasis on Biodiesel." *Fuel* 284:119058. doi: 10.1016/J.FUEL.2020.119058.
- Buckeridge, Emma. 2022. *Investigating the Feasibility of Light (in)Dependent Continuous Cultivation of an Extremophilic Algae, Galdieria Sp. RTK37.1.*
- Bumbak, Fabian, Stella Cook, Vilém Zachleder, Silas Hauser, and Karin Kovar. 2011. "Best Practices in Heterotrophic High-Cell-Density Microalgal Processes: Achievements, Potential and Possible Limitations." *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011 91:1 91(1):31–46. doi: 10.1007/S00253-011-3311-6.
- Candido, Camila, and Ana Teresa Lombardi. 2020. "Mixotrophy in Green Microalgae Grown on an Organic and Nutrient Rich Waste." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36(2):1–11. doi: 10.1007/S11274-020-2802-Y/FIGURES/5.

- Canelli, Greta, Fabian Abiusi, Albert Vidal Garcia, Stefano Canziani, and Alexander Mathys. 2023. “Amino Acid Profile and Protein Bioaccessibility of Two *Galdieria Sulphuraria* Strains Cultivated Autotrophically and Mixotrophically in Pilot-Scale Photobioreactors.” *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 84:103287. doi: 10.1016/J.IFSET.2023.103287.
- Canelli, Greta, Carmen Tarnutzer, Roberta Carpine, Lukas Neutsch, Christoph J. Bolten, Fabiola Dionisi, and Alexander Mathys. 2020. “Biochemical and Nutritional Evaluation of *Chlorella* and *Auxenochlorella* Biomasses Relevant for Food Application.” *Frontiers in Nutrition* 7. doi: 10.3389/fnut.2020.565996.
- Di Caprio, Fabrizio, Pietro Altimari, Gaetano Iaquaniello, Luigi Toro, and Francesca Pagnanelli. 2019. “Heterotrophic Cultivation of *T. Obliquus* under Non-Axenic Conditions by Uncoupled Supply of Nitrogen and Glucose.” *Biochemical Engineering Journal* 145:127–36. doi: 10.1016/J.BEJ.2019.02.020.
- Chacón-Lee, T. L., and G. E. González-Mariño. 2010. “Microalgae for ‘Healthy’ Foods—Possibilities and Challenges.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(6):655–75. doi: 10.1111/J.1541-4337.2010.00132.X.
- Cheirsilp, Benjamas, and Salwa Torpee. 2012. “Enhanced Growth and Lipid Production of Microalgae under Mixotrophic Culture Condition: Effect of Light Intensity, Glucose Concentration and Fed-Batch Cultivation.” *Bioresource Technology* 110:510–16. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2012.01.125.
- Chen, Chun Yen, Kuei Ling Yeh, Rifka Aisyah, Duu Jong Lee, and Jo Shu Chang. 2011. “Cultivation, Photobioreactor Design and Harvesting of Microalgae for Biodiesel Production: A Critical Review.” *Bioresource Technology* 102(1):71–81. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2010.06.159.
- Cheng, Feng, Kwonit Mallick, Shanka M. Henkanatte Gedara, Jacqueline M. Jarvis, Tanner Schaub, Umakanta Jena, Nagamany Nirmalakhandan, and Catherine E. Brewer. 2019. “Hydrothermal Liquefaction of *Galdieria Sulphuraria* Grown

- on Municipal Wastewater.” *Bioresource Technology* 292:121884. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2019.121884.
- Chisti, Yusuf. 2013. “Constraints to Commercialization of Algal Fuels.” *Journal of Biotechnology* 167(3):201–14. doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2013.07.020.
- Chisti, Yusuf. 2016. “Large-Scale Production of Algal Biomass: Raceway Ponds.” *Green Energy and Technology* 21–40. doi: 10.1007/978-3-319-12334-9_2/FIGURES/1.
- Di Cicco, Maria Rosa, Manuela Iovinella, Maria Palmieri, Carmine Lubritto, and Claudia Ciniglia. 2021. “Extremophilic Microalgae *Galdieria* Gen. for Urban Wastewater Treatment: Current State, the Case of ‘POWER’ System, and Future Prospects.” *Plants* 2021, Vol. 10, Page 2343 10(11):2343. doi: 10.3390/PLANTS10112343.
- Ciniglia, Claudia, Hwan Su Yoon, Antonino Pollio, Gabriele Pinto, and Debashish Bhattacharya. 2004. “Hidden Biodiversity of the Extremophilic Cyanidiales Red Algae.” *Molecular Ecology* 13(7):1827–38. doi: 10.1111/J.1365-294X.2004.02180.X.
- D’Alessandro, Emmanuel B., and Nelson R. Antoniosi Filho. 2016. “Concepts and Studies on Lipid and Pigments of Microalgae: A Review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 58:832–41. doi: 10.1016/J.RSER.2015.12.162.
- Daneshvar, Ehsan, Yong Sik Ok, Samad Tavakoli, Binoy Sarkar, Sabry M. Shaheen, Hui Hong, Yongkang Luo, Jörg Rinklebe, Hocheol Song, and Amit Bhatnagar. 2021. “Insights into Upstream Processing of Microalgae: A Review.” *Bioresource Technology* 329:124870. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2021.124870.
- Daneshvar, Ehsan, Rebecca J. Wicker, Pau Loke Show, and Amit Bhatnagar. 2022. “Biologically-Mediated Carbon Capture and Utilization by Microalgae towards Sustainable CO₂ Biofixation and Biomass Valorization – A Review.” *Chemical Engineering Journal* 427:130884. doi: 10.1016/J.CEJ.2021.130884.
- Dange, Pujaa, Shreya Gawas, Soumya Pandit, Lukhanyo Mekuto, Piyush K. Gupta, Poojhaa Shanmugam, Kanupriya, Ravishankar Patil, and Srijoni Banerjee.

2022. “Trends in Photobioreactor Technology for Microalgal Biomass Production along with Wastewater Treatment: Bottlenecks and Breakthroughs.” *An Integration of Phycoremediation Processes in Wastewater Treatment* 135–54. doi: 10.1016/B978-0-12-823499-0.00001-8.
- Dyhrman, Sonya T. 2016. “Nutrients and Their Acquisition: Phosphorus Physiology in Microalgae.” *The Physiology of Microalgae* 6:155–83. doi: 10.1007/978-3-319-24945-2_8.
- Edge, R., D. J. McGarvey, and T. G. Truscott. 1997. “The Carotenoids as Anti-Oxidants — a Review.” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41(3):189–200. doi: 10.1016/S1011-1344(97)00092-4.
- Fernandes, Bruno D., Andre Mota, Jose A. Teixeira, and Antonio A. Vicente. 2015. “Continuous Cultivation of Photosynthetic Microorganisms: Approaches, Applications and Future Trends.” *Biotechnology Advances* 33(6):1228–45. doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2015.03.004.
- Ficara, E., A. Uslenghi, D. Basilico, and V. Mezzanotte. 2014. “Growth of Microalgal Biomass on Supernatant from Biosolid Dewatering.” *Water Science and Technology* 69(4):896–902. doi: 10.2166/WST.2013.805.
- G, Sibi. 2019. “Light Emitting Diode (LED) Illumination For Enhanced Growth And Cellular Composition In Three Microalgae.” *Advances in Microbiology Research* 3(1):1–6. doi: 10.24966/AMR-694X/100007.
- Gouveia, L. ., Batista, A. P. ., Sousa, I. ., Raymundo, A, Bandarra, N. M. 2008. *Food Chemistry Research Developments*. edited by K. N. . Papadopoulos. Nova Science Publishers.
- Graverholt, Olav Sune, and Niels Thomas Eriksen. 2007a. “Heterotrophic High-Cell-Density Fed-Batch and Continuous-Flow Cultures of *Galdieria Sulphuraria* and Production of Phycocyanin.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(1):69–75. doi: 10.1007/S00253-007-1150-2/FIGURES/4.
- Graziani, Giulia, Simona Schiavo, Maria Adalgisa Nicolai, Silvia Buono, Vincenzo Fogliano, Gabriele Pinto, and Antonino Pollio. 2012. “Microalgae as Human Food: Chemical and Nutritional Characteristics of the Thermo-Acidophilic

- Microalga *Galdieria Sulphuraria*.” *Food & Function* 4(1):144–52. doi: 10.1039/C2FO30198A.
- Gresham, David, and Maitreya J. Dunham. 2014. “The Enduring Utility of Continuous Culturing in Experimental Evolution.” *Genomics* 104(6):399–405. doi: 10.1016/J.YGENO.2014.09.015.
- Grobbelaar, J. U. 2004. *Algal Nutrition: Mineral Nutrition. Handbook of Microalgal Culture*. edited by Richmond Amos.
- Gross, Wolfgang, and Claus Schnarrenberger. 1995. “Heterotrophic Growth of Two Strains of the Acido-Thermophilic Red Alga *Galdieria Sulphuraria*.” *Plant and Cell Physiology* 36(4):633–38. doi: 10.1093/OXFORDJOURNALS.PCP.A078803.
- Gross, Wolfgang, Gilbert Tischendorf, Jan Küver, Nicolas Bouchaala, and Wilhelm Büsch. 1998. “Cryptoendolithic Growth of the Red Alga *Galdieria Sulphuraria* in Volcanic Areas.” *European Journal of Phycology* 33(1):25–31. doi: 10.1080/09670269810001736503.
- Grossmann, Lutz, Jörg Hinrichs, and Jochen Weiss. 2020. “Cultivation and Downstream Processing of Microalgae and Cyanobacteria to Generate Protein-Based Technofunctional Food Ingredients.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60(17):2961–89. doi: 10.1080/10408398.2019.1672137.
- Gruber, Peter J., Sue Ellen Frederick, and N. E. Tolbert. 1974. “Enzymes Related to Lactate Metabolism in Green Algae and Lower Land Plants.” *Plant Physiology* 53(2):167–70. doi: 10.1104/PP.53.2.167.
- Han, Feifei, Jianke Huang, Yuanguang Li, Weiliang Wang, Jun Wang, Jianhua Fan, and Guomin Shen. 2012. “Enhancement of Microalgal Biomass and Lipid Productivities by a Model of Photoautotrophic Culture with Heterotrophic Cells as Seed.” *Bioresource Technology* 118:431–37. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2012.05.066.

- Heijnen, Sef J. 1994. "Thermodynamics of Microbial Growth and Its Implications for Process Design." *Trends in Biotechnology* 12(12):483–92. doi: 10.1016/0167-7799(94)90056-6.
- Henkanatte-Gedera, S. M., T. Selvaratnam, M. Karbakhshravari, M. Myint, N. Nirmalakhandan, W. Van Voorhies, and Peter J. Lammers. 2017. "Removal of Dissolved Organic Carbon and Nutrients from Urban Wastewaters by *Galdieria Sulphuraria*: Laboratory to Field Scale Demonstration." *Algal Research* 24:450–56. doi: 10.1016/J.ALGAL.2016.08.001.
- Hsieh-Lo, Ming, Gustavo Castillo, Mario Alberto Ochoa-Becerra, and Luis Mojica. 2019. "Phycocyanin and Phycoerythrin: Strategies to Improve Production Yield and Chemical Stability." *Algal Research* 42:101600. doi: 10.1016/J.ALGAL.2019.101600.
- Hwan, Su Yoon, Claudia Ciniglia, Min Wu, Josep M. Comeron, Gabriele Pinto, Antonino Pollio, and Debashish Bhattacharya. 2006. "Establishment of Endolithic Populations of Extremophilic Cyanidiales (Rhodophyta)." *BMC Evolutionary Biology* 6(1):1–12. doi: 10.1186/1471-2148-6-78/TABLES/3.
- Janssen, Marcel, Rene H. Wijffels, and Maria J. Barbosa. 2022. "Microalgae Based Production of Single-Cell Protein." *Current Opinion in Biotechnology* 75:102705. doi: 10.1016/J.COPBIO.2022.102705.
- Jerney, Jacqueline, and Kristian Spilling. 2020. "Large Scale Cultivation of Microalgae: Open and Closed Systems." *Methods in Molecular Biology* 1980:1–8. doi: 10.1007/7651_2018_130/TABLES/3.
- Jiang, W., Y. Zhao, X. Wu, Y. Du, and W. Zhou. 2023. "Health Inequalities of Global Protein-Energy Malnutrition from 1990 to 2019 and Forecast Prevalence for 2044: Data from the Global Burden of Disease Study 2019." *Public Health* 225:102–9. doi: 10.1016/J.PUHE.2023.10.003.
- JIANG, Xiao ling, Ji chun TIAN, Zhi HAO, and Wei dong ZHANG. 2008. "Protein Content and Amino Acid Composition in Grains of Wheat-Related Species." *Agricultural Sciences in China* 7(3):272–79. doi: 10.1016/S1671-2927(08)60066-8.

- Jin, Cuili, Binqi Yu, Shouyuan Qian, Qing Liu, and Xiaojian Zhou. 2021. "Impact of Combined Monochromatic Light on the Biocomponent Productivity of *Dunaliella Salina*." *Journal of Renewable and Sustainable Energy* 13(2). doi: 10.1063/5.0041330/926628.
- Jin, Hu, Wenhua Chuai, Kunpeng Li, Guoli Hou, Mingcan Wu, Jianping Chen, Hongxia Wang, Jing Jia, Danxiang Han, and Qiang Hu. 2021. "Ultrahigh-Cell-Density Heterotrophic Cultivation of the Unicellular Green Alga *Chlorella Sorokiniana* for Biomass Production." *Biotechnology and Bioengineering* 118(10):4138–51. doi: 10.1002/BIT.27890.
- Juneja, Ankita, Ruben Michael Ceballos, and Ganti S. Murthy. 2013. "Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review." *Energies* 2013, Vol. 6, Pages 4607-4638 6(9):4607–38. doi: 10.3390/EN6094607.
- Jurić, Snježana, Lea Vojta, Hrvoje Fulgosi, Snježana Jurić, Lea Vojta, and Hrvoje Fulgosi. 2013. "Electron Transfer Routes in Oxygenic Photosynthesis: Regulatory Mechanisms and New Perspectives." *Photosynthesis*. doi: 10.5772/55339.
- Khan, Muhammad Imran, Jin Hyuk Shin, and Jong Deog Kim. 2018. "The Promising Future of Microalgae: Current Status, Challenges, and Optimization of a Sustainable and Renewable Industry for Biofuels, Feed, and Other Products." *Microbial Cell Factories* 2018 17:1 17(1):1–21. doi: 10.1186/S12934-018-0879-X.
- Khan, Shamshad, M. Naushad, Jibrán Iqbal, Chinna Bathula, and Gaurav Sharma. 2022. "Production and Harvesting of Microalgae and an Efficient Operational Approach to Biofuel Production for a Sustainable Environment." *Fuel* 311:122543. doi: 10.1016/J.FUEL.2021.122543.
- Kiran, Bala, Ritunesh Kumar, and Devendra Deshmukh. 2014. "Perspectives of Microalgal Biofuels as a Renewable Source of Energy." *Energy Conversion and Management* 88:1228–44. doi: 10.1016/J.ENCONMAN.2014.06.022.

- Kong, Weibao, Shuling Yang, Hui Wang, Huanran Huo, Baomin Guo, Na Liu, Aimei Zhang, and Shiquan Niu. 2020. "Regulation of Biomass, Pigments, and Lipid Production by *Chlorella Vulgaris* 31 through Controlling Trophic Modes and Carbon Sources." *Journal of Applied Phycology* 32(3):1569–79. doi: 10.1007/S10811-020-02089-1/FIGURES/3.
- Koyande, Apurav Krishna, Kit Wayne Chew, Krishnamoorthy Rambabu, Yang Tao, Dinh Toi Chu, and Pau Loke Show. 2019. "Microalgae: A Potential Alternative to Health Supplementation for Humans." *Food Science and Human Wellness* 8(1):16–24. doi: 10.1016/J.FSHW.2019.03.001.
- Kumar, Amit, Sarina Ergas, Xin Yuan, Ashish Sahu, Qiong Zhang, Jo Dewulf, F. Xavier Malcata, and Herman van Langenhove. 2010. "Enhanced CO₂ Fixation and Biofuel Production via Microalgae: Recent Developments and Future Directions." *Trends in Biotechnology* 28(7):371–80. doi: 10.1016/J.TIBTECH.2010.04.004/ASSET/097E9541-D7F0-40E2-BA3C-87DFB0DB2BA8/MAIN.ASSETS/GR2.SML.
- Lamers, Packo P., Carlien C. W. Van De Laak, Petrouchka S. Kaasenbrood, Jeroen Lorier, Marcel Janssen, Ric C. H. De Vos, Raoul J. Bino, and René H. Wijffels. 2010. "Carotenoid and Fatty Acid Metabolism in Light-Stressed *Dunaliella Salina*." *Biotechnology and Bioengineering* 106(4):638–48. doi: 10.1002/BIT.22725.
- Lari, Zahra, and Fatemeh Khosravitar. 2021. "A Comparative Review on Different Trophic Modes and Usable Carbon Sources for Microalgae Cultivation, Approaching to Optimize Lipid Production in Trade Scale." *Systematic Bioscience and Engineering* 16–26. doi: 10.37256/SBE.112021293.
- Layman, Donald K., and Nancy R. Rodriguez. 2009. "Egg Protein as a Source of Power, Strength, and Energy." *Nutrition Today* 44(1):43–48. doi: 10.1097/NT.0B013E3181959CB2.
- Lee, Y. K., and H. Shen. 2004. 'Chapter 3 - Basic Culturing Techniques', *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. edited by Richmond Amos.

- Lee, Yu Hsiang, and Po Han Li. 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* 118:112–20. doi: 10.1016/J.CHERD.2016.12.010.
- Lim, Jin Kyu, Kyoungseon Min, and Won Kun Park. 2023. "Use of an Extremophile Red Microalga (*Galdieria Sulphuraria*) to Produce Phycocyanin from Tangerine Peel Waste." *Bioresource Technology Reports* 22:101446. doi: 10.1016/J.BITEB.2023.101446.
- Malavasi, Veronica, Santina Soru, and Giacomo Cao. 2020. "Extremophile Microalgae: The Potential for Biotechnological Application." *Journal of Phycology* 56(3):559–73. doi: 10.1111/JPY.12965.
- Maltsev, Yevhen, Kateryna Maltseva, Maxim Kulikovskiy, and Svetlana Maltseva. 2021. "Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition." *Biology* 2021, Vol. 10, Page 1060 10(10):1060. doi: 10.3390/BIOLOGY10101060.
- Markou, Giorgos, Dries Vandamme, and Koenraad Muylaert. 2014. "Microalgal and Cyanobacterial Cultivation: The Supply of Nutrients." *Water Research* 65:186–202. doi: 10.1016/J.WATRES.2014.07.025.
- Martinez-Garcia, Marta, and Marc J. E. C. van der Maarel. 2016. "Floridoside Production by the Red Microalga *Galdieria Sulphuraria* under Different Conditions of Growth and Osmotic Stress." *AMB Express* 6(1):1–8. doi: 10.1186/S13568-016-0244-6/FIGURES/5.
- Masojídek, Jirí, Giuseppe Torzillo, and Michal Koblížek. 2013. "Photosynthesis in Microalgae." *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition* 21–36. doi: 10.1002/9781118567166.CH2.
- Massa, Marina, Silvia Buono, Antonio L. Langellotti, Anna Martello, Giovanni L. Russo, Dario A. Troise, Raffaele Sacchi, Paola Vitaglione, and Vincenzo Fogliano. 2019. "Biochemical Composition and in Vitro Digestibility of

- Galdieria Sulphuraria Grown on Spent Cherry-Brine Liquid.” *New Biotechnology* 53:9–15. doi: 10.1016/J.NBT.2019.06.003.
- McGinn, Patrick J., Kathryn E. Dickinson, Kyoung C. Park, Crystal G. Whitney, Scott P. MacQuarrie, Frank J. Black, Jean Claude Frigon, Serge R. Guiot, and Stephen J. B. O’Leary. 2012. “Assessment of the Bioenergy and Bioremediation Potentials of the Microalga *Scenedesmus* Sp. AMDD Cultivated in Municipal Wastewater Effluent in Batch and Continuous Mode.” *Algal Research* 1(2):155–65. doi: 10.1016/J.ALGAL.2012.05.001.
- Mekonnen, M. M., and A. Y. Hoekstra. 2010. “Value of Water Research Report Series No. 48 Volume 2: Appendices Value of Water.”
- Menchik, Pedro, Tristan Zuber, Anika Zuber, and Carmen I. Moraru. 2019. “Short Communication: Composition of Coproduct Streams from Dairy Processing: Acid Whey and Milk Permeate.” *Journal of Dairy Science* 102(5):3978–84. doi: 10.3168/jds.2018-15951.
- Merola, Aldo, Rosa Castaldo, Paolo De Luca, Raffaele Gambardella, Aldo Musacchio, and Roberto Taddei. 1981. “Revision of *Cyanidium Caldarium*. Three Species of Acidophilic Algae.” *Plant Biosystem* 115(4–5):189–95. doi: 10.1080/11263508109428026.
- Milledge, John J. 2011. “Commercial Application of Microalgae Other than as Biofuels: A Brief Review.” *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 10(1):31–41. doi: 10.1007/S11157-010-9214-7/TABLES/1.
- Minoda, Ayumi, Hitomi Sawada, Sonoe Suzuki, Shin ichi Miyashita, Kazumi Inagaki, Takaiku Yamamoto, and Mikio Tsuzuki. 2015. “Recovery of Rare Earth Elements from the Sulfothermophilic Red Alga *Galdieria Sulphuraria* Using Aqueous Acid.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(3):1513–19. doi: 10.1007/S00253-014-6070-3/FIGURES/5.
- Minyuk, Galina, Roman Sidorov, and Alexei Solovchenko. 2020. “Effect of Nitrogen Source on the Growth, Lipid, and Valuable Carotenoid Production in the Green Microalga *Chromochloris Zofingiensis*.” *Journal of Applied Phycology* 32(2):923–35. doi: 10.1007/S10811-020-02060-0/METRICS.

- Modeste, Virginie, Alizée Brient, Catherine Thirion-Delalande, Roy Forster, Corinne Aguenou, Hywel Griffiths, and Olivier Cagnac. 2019. "Safety Evaluation of Galdieria High-Protein Microalgal Biomass." *https://doi.org/10.1177/2397847319879277* 3:239784731987927. doi: 10.1177/2397847319879277.
- Mohsenpour, Seyedeh Fatemeh, Sebastian Hennige, Nicholas Willoughby, Adebayo Adeloye, and Tony Gutierrez. 2021. "Integrating Micro-Algae into Wastewater Treatment: A Review." *Science of The Total Environment* 752:142168. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2020.142168.
- Mondal, Madhumanti, Ashmita Ghosh, O. N. Tiwari, K. Gayen, Papita Das, M. K. Mandal, and Gopinath Halder. 2017. "Influence of Carbon Sources and Light Intensity on Biomass and Lipid Production of Chlorella Sorokiniana BTA 9031 Isolated from Coalfield under Various Nutritional Modes." *Energy Conversion and Management* 145:247–54. doi: 10.1016/J.ENCONMAN.2017.05.001.
- Monod Jacques. 1949. *The Growth of Bacterial Cultures*.
- Morales-Sánchez, Daniela, Oscar A. Martínez-Rodríguez, John Kyndt, and Alfredo Martínez. 2015. "Heterotrophic Growth of Microalgae: Metabolic Aspects." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 31(1):1–9. doi: 10.1007/S11274-014-1773-2/FIGURES/1.
- Occhipinti, Paride Salvatore, Flavia Del Signore, Stefano Canziani, Cinzia Caggia, Valeria Mezzanotte, and Narcís Ferrer-Ledo. 2023. "Mixotrophic and Heterotrophic Growth of Galdieria Sulphuraria Using Buttermilk as a Carbon Source." *Journal of Applied Phycology* 35(6):2631–43. doi: 10.1007/S10811-023-03012-0/FIGURES/4.
- Oesterhelt, C., · S Vogelbein, · R P Shrestha, · M Stanke, and · A P M Weber. 2008. "The Genome of the Thermoacidophilic Red Microalga Galdieria Sulphuraria Encodes a Small Family of Secreted Class III Peroxidases That Might Be Involved in Cell Wall Modification." *Planta* 227:353–62. doi: 10.1007/s00425-007-0622-z.

- Oesterhelt, Christine, Elmar Schmälzlin, Jürgen M. Schmitt, and Heiko Lokstein. 2007. "Regulation of Photosynthesis in the Unicellular Acidophilic Red Alga *Galdieria Sulphuraria*†." *The Plant Journal* 51(3):500–511. doi: 10.1111/J.1365-313X.2007.03159.X.
- Oesterhelt, Christine, Claus Schnarrenberger, and Wolfgang Gross. 1999. "Characterization of a Sugar/Polyol Uptake System in the Red Alga *Galdieria Sulphuraria*." *European Journal of Phycology* 34(3):271–77. doi: 10.1080/09670269910001736322.
- P. Jelen. 2011. *Utilization and Products. Whey Processing. Encyclopedia of Dairy Sciences (2nd Ed.)*. edited by J.F. Fuquay.
- Pagels, Fernando, Daniel Salvaterra, Helena Melo Amaro, and Ana Catarina Guedes. 2020. "Pigments from Microalgae." *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer, and Bioactive Compounds* 465–92. doi: 10.1016/B978-0-12-818536-0.00018-X.
- Paliwal, Chetan, Madhusree Mitra, Khushbu Bhayani, S. V. Vamsi Bharadwaj, Tonmoy Ghosh, Sonam Dubey, and Sandhya Mishra. 2017. "Abiotic Stresses as Tools for Metabolites in Microalgae." *Bioresource Technology* 244:1216–26. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2017.05.058.
- Pan, Yali, Zhiwen Ma, Jie Shen, Jia Liang, Yupeng Yuan, Xiao Lian, and Yingqiang Sun. 2024. "Biotreatment of Swine Wastewater by Mixotrophic *Galdieria Sulphuraria*." *Journal of Environmental Chemical Engineering* 12(1):111858. doi: 10.1016/J.JECE.2023.111858.
- Pang, Na, Xiangyu Gu, Shulin Chen, Helmut Kirchhoff, Hanwu Lei, and Sanja Roje. 2019. "Exploiting Mixotrophy for Improving Productivities of Biomass and Co-Products of Microalgae." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 112:450–60. doi: 10.1016/J.RSER.2019.06.001.
- Pastore, Martina, Sergio Santaefemia, Alberto Bertucco, and Eleonora Sforza. 2018. "Light Intensity Affects the Mixotrophic Carbon Exploitation in *Chlorella Protothecoides*: Consequences on Microalgae-Bacteria Based

- Wastewater Treatment.” *Water Science and Technology* 78(8):1762–71. doi: 10.2166/WST.2018.462.
- Patel, Anil Kumar, Jae Min Joun, Min Eui Hong, and Sang Jun Sim. 2019. “Effect of Light Conditions on Mixotrophic Cultivation of Green Microalgae.” *Bioresource Technology* 282:245–53. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2019.03.024.
- Perez Saura, Pablo, Malika Chabi, Amélie Corato, Pierre Cardol, and Claire Remacle. 2022. “Cell Adaptation of the Extremophilic Red Microalga *Galdieria Sulphuraria* to the Availability of Carbon Sources.” *Frontiers in Plant Science* 13:978246. doi: 10.3389/FPLS.2022.978246/BIBTEX.
- Perez-Garcia, Octavio, Froylan M. E. Escalante, Luz E. de-Bashan, and Yoav Bashan. 2011. “Heterotrophic Cultures of Microalgae: Metabolism and Potential Products.” *Water Research* 45(1):11–36. doi: 10.1016/J.WATRES.2010.08.037.
- Peter, Angela Paul, Apurav Krishna Koyande, Kit Wayne Chew, Shih Hsin Ho, Wei Hsin Chen, Jo Shu Chang, Rambabu Krishnamoorthy, Fawzi Banat, and Pau Loke Show. 2022. “Continuous Cultivation of Microalgae in Photobioreactors as a Source of Renewable Energy: Current Status and Future Challenges.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 154:111852. doi: 10.1016/J.RSER.2021.111852.
- Pina-Pérez, M. C., A. Rivas, A. Martínez, and D. Rodrigo. 2017. “Antimicrobial Potential of Macro and Microalgae against Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Food.” *Food Chemistry* 235:34–44. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2017.05.033.
- Pleissner, Daniel, Astrid Victoria Lindner, and Nicole Händel. 2021. “Heterotrophic Cultivation of *Galdieria Sulphuraria* under Non-Sterile Conditions in Digestate and Hydrolyzed Straw.” *Bioresource Technology* 337:125477. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2021.125477.
- Porto, Bruna, Tânia F.C.V. Silva, Ana L. Gonçalves, Ana F. Esteves, Selene M. A. Guelli U. de Souza, Antônio A. U. de Souza, José C. M. Pires, and Vítor J. P.

- Vilar. 2022. “Tubular Photobioreactors Illuminated with LEDs to Boost Microalgal Biomass Production.” *Chemical Engineering Journal* 435:134747. doi: 10.1016/J.CEJ.2022.134747.
- Proietti Tocca, Giacomo, Valeria Agostino, Barbara Menin, Tonia Tommasi, Debora Fino, and Fabrizio Di Caprio. 2024. “Mixotrophic and Heterotrophic Growth of Microalgae Using Acetate from Different Production Processes.” *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2024 23:1 23(1):93–132. doi: 10.1007/S11157-024-09682-7.
- Ramos Tercero, E. A., E. Sforza, M. Morandini, and A. Bertucco. 2014. “Cultivation of *Chlorella Protothecoides* with Urban Wastewater in Continuous Photobioreactor: Biomass Productivity and Nutrient Removal.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172(3):1470–85. doi: 10.1007/S12010-013-0629-9/FIGURES/10.
- Ras, Monique, Jean Philippe Steyer, and Olivier Bernard. 2013. “Temperature Effect on Microalgae: A Crucial Factor for Outdoor Production.” *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 12(2):153–64. doi: 10.1007/S11157-013-9310-6/FIGURES/5.
- Ravindran, Balasubramani, Sanjay Kumar Gupta, Won Mo Cho, Jung Kon Kim, Sang Ryong Lee, Kwang Hwa Jeong, Dong Jun Lee, and Hee Chul Choi. 2016. “Microalgae Potential and Multiple Roles—Current Progress and Future Prospects—An Overview.” *Sustainability* 2016, Vol. 8, Page 1215 8(12):1215. doi: 10.3390/SU8121215.
- Rawat, I., R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, and F. Bux. 2011. “Dual Role of Microalgae: Phycoremediation of Domestic Wastewater and Biomass Production for Sustainable Biofuels Production.” *Applied Energy* 88(10):3411–24. doi: 10.1016/J.APENERGY.2010.11.025.
- Reeb, V. & Bhattacharya, D. 2010. *Red Algae in the Genomic Age. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Springer, Dordrecht, Netherlands.

- Reza-Solis, Héctor Alejandro, Ofelia Adriana Hernández-Rodríguez, Andrés Francisco Martínez-Rosales, and Dámaris Leopoldina Ojeda-Barrios. 2023. “Applications of Microalgae in Five Areas of Biotechnology.” *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 92(10):2737–59. doi: 10.32604/PHYTON.2023.029851.
- Richmond, Amos. 2004. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*.
- Rock, Cheryl L. 1997. “Carotenoids: Biology and Treatment.” *Pharmacology & Therapeutics* 75(3):185–97. doi: 10.1016/S0163-7258(97)00054-5.
- Ruiz, Jesús, Rene H. Wijffels, Manuel Dominguez, and Maria J. Barbosa. 2022. “Heterotrophic vs Autotrophic Production of Microalgae: Bringing Some Light into the Everlasting Cost Controversy.” *Algal Research* 64:102698. doi: 10.1016/J.ALGAL.2022.102698.
- Salbitani, Giovanna, and Simona Carfagna. 2020. “Different Behaviour between Autotrophic and Heterotrophic *Galdieria Sulphuraria* (Rhodophyta) Cells to Nitrogen Starvation and Restoration. Impact on Pigment and Free Amino Acid Contents.” *International Journal of Plant Biology* 11(1):1–14. doi: 10.4081/pb.2020.8567.
- Salvucci, Michael E., and Steven J. Crafts-Brandner. 2004. “Relationship between the Heat Tolerance of Photosynthesis and the Thermal Stability of Rubisco Activase in Plants from Contrasting Thermal Environments.” *Plant Physiology* 134(4):1460–70. doi: 10.1104/PP.103.038323.
- Samicho, Zainal, Siti Roha, Ab Mutalib, and Noriham Abdullah. 2013. “Amino Acid Composition of Droughtmaster Beef at Various Beef Cuts.” 4(5B):61–64. doi: 10.4236/as.2013.45B012.
- Scherhag, Philipp, and Jörg Uwe Ackermann. 2021. “Removal of Sugars in Wastewater from Food Production through Heterotrophic Growth of *Galdieria Sulphuraria*.” *Engineering in Life Sciences* 21(3–4):233–41. doi: 10.1002/ELSC.202000075.

- Schmidt, Rikke Ankerstjerne, Marilyn G. Wiebe, and Niels Thomas Eriksen. 2005. "Heterotrophic High Cell-Density Fed-Batch Cultures of the Phycocyanin-Producing Red Alga *Galdieria Sulphuraria*." *Biotechnology and Bioengineering* 90(1):77–84. doi: 10.1002/BIT.20417.
- Schulze, Peter S. C., Luísa A. Barreira, Hugo G. C. Pereira, José A. Perales, and João C. S. Varela. 2014. "Light Emitting Diodes (LEDs) Applied to Microalgal Production." *Trends in Biotechnology* 32(8):422–30. doi: 10.1016/J.TIBTECH.2014.06.001.
- Sekhar, B. P. S., and G. M. Reddy. 1982. "Amino Acid Profiles in Some Scented Rice Varieties." *Theoretical and Applied Genetics* 62(1):35–37. doi: 10.1007/BF00276278/METRICS.
- Selvaratnam, T., A. K. Pegallapati, F. Montelya, G. Rodriguez, N. Nirmalakhandan, W. Van Voorhies, and P. J. Lammers. 2014. "Evaluation of a Thermo-Tolerant Acidophilic Alga, *Galdieria Sulphuraria*, for Nutrient Removal from Urban Wastewaters." *Bioresource Technology* 156:395–99. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2014.01.075.
- Sforza, Eleonora, Silvia Urbani, and Alberto Bertucco. 2015. "Evaluation of Maintenance Energy Requirements in the Cultivation of *Scenedesmus Obliquus*: Effect of Light Intensity and Regime." *Journal of Applied Phycology* 27(4):1453–62. doi: 10.1007/S10811-014-0460-X/FIGURES/6.
- Sirohi, Ranjna, Ashutosh Kumar Pandey, Panneerselvam Ranganathan, Shikhangi Singh, Aswathy Udayan, Mukesh Kumar Awasthi, Anh Tuan Hoang, Chaitanya Reddy Chilakamarry, Sang Hyoun Kim, and Sang Jun Sim. 2022. "Design and Applications of Photobioreactors- a Review." *Bioresource Technology* 349:126858. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2022.126858.
- Sloth, Jenni K., Marilyn G. Wiebe, and Niels T. Eriksen. 2006. "Accumulation of Phycocyanin in Heterotrophic and Mixotrophic Cultures of the Acidophilic Red Alga *Galdieria Sulphuraria*." *Enzyme and Microbial Technology* 38(1–2):168–75. doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2005.05.010.

- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. 1985. "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid." *Analytical Biochemistry* 150(1):76–85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Stadnichuk, I. N., M. G. Rakhimberdieva, Y. V. Bolychevtseva, N. P. Yurina, N. V. Karapetyan, and I. O. Selyakh. 1998. "Inhibition by Glucose of Chlorophyll a and Phycocyanobilin Biosynthesis in the Unicellular Red Alga *Galdieria Partita* at the Stage of Coproporphyrinogen III Formation." *Plant Science* 136(1):11–23. doi: 10.1016/S0168-9452(98)00088-0.
- Stadnichuk, Igor N., and Ivan V. Tropin. 2022. "Cyanidiales as Polyextreme Eukaryotes." *Biochemistry (Moscow)* 87(5):472–87. doi: 10.1134/S000629792205008X/FIGURES/6.
- Sun, Xiao Man, Lu Jing Ren, Quan Yu Zhao, Xiao Jun Ji, and He Huang. 2018. "Microalgae for the Production of Lipid and Carotenoids: A Review with Focus on Stress Regulation and Adaptation." *Biotechnology for Biofuels* 2018 11:1 11(1):1–16. doi: 10.1186/S13068-018-1275-9.
- Tang, Haiying, Meng Chen, K. Y. Simon Ng, and Steven O. Salley. 2012. "Continuous Microalgae Cultivation in a Photobioreactor." *Biotechnology and Bioengineering* 109(10):2468–74. doi: 10.1002/BIT.24516.
- Ternes, Chad M. 2015. *METABOLIC EVOLUTION IN GALDIERIA SULPHURARIA*.
- Terry, Kenneth L., and Lawrence P. Raymond. 1985. "System Design for the Autotrophic Production of Microalgae." *Enzyme and Microbial Technology* 7(10):474–87. doi: 10.1016/0141-0229(85)90148-6.
- Tischendorf, Gilbert, Christine Oesterhelt, Sabine Hoffmann, Jan Girnus, Claus Schnarrenberger, and Wolfgang Gross. 2007. "Ultrastructure and Enzyme Complement of Proplastids from Heterotrophically Grown Cells of the Red Alga *Galdieria Sulphuraria*." *European Journal of Phycology* 42(3):243–51. doi: 10.1080/09670260701437642.

- Tredici, Mario R., Liliana Rodolfi, Natascia Biondi, Niccolò Bassi, and Giacomo Sampietro. 2016. “Techno-Economic Analysis of Microalgal Biomass Production in a 1-Ha Green Wall Panel (GWP®) Plant.” *Algal Research* 19:253–63. doi: 10.1016/J.ALGAL.2016.09.005.
- Trentin, Giulia, Veronica Lucato, Eleonora Sforza, and Alberto Bertucco. 2021. “Stabilizing Autotrophic Cyanophycin Production in Continuous Photobioreactors.” *Algal Research* 60:102518. doi: 10.1016/J.ALGAL.2021.102518.
- UNICEF, WHO, and WORLD BANK. 2023. “Level and Trend in Child Malnutrition.” *World Health Organization* 4.
- Union, Publications Office of the European. 2022. “An Overview of the Algae Industry in Europe : Producers, Production Systems, Species, Biomass Uses, Other Steps in the Value Chain and Socio-Economic Data.” doi: 10.2760/813113.
- Uppal, A., W. H. Ray, and A. B. Poore. 1976. “The Classification of the Dynamic Behavior of Continuous Stirred Tank Reactors—Influence of Reactor Residence Time.” *Chemical Engineering Science* 31(3):205–14. doi: 10.1016/0009-2509(76)85058-0.
- Vale, Miguel A., António Ferreira, José C. M. Pires, and Goncalves Ana L. Gonçalves. 2020. “CO₂ Capture Using Microalgae.” *Advances in Carbon Capture: Methods, Technologies and Applications* 381–405. doi: 10.1016/B978-0-12-819657-1.00017-7.
- Varshney, Prachi, Paulina Mikulic, Avigad Vonshak, John Beardall, and Pramod P. Wangikar. 2015. “Extremophilic Micro-Algae and Their Potential Contribution in Biotechnology.” *Bioresource Technology* 184:363–72. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2014.11.040.
- Vázquez-Romero, Bárbara, José Antonio Perales, Hugo Pereira, Maria Barbosa, and Jesús Ruiz. 2022. “Techno-Economic Assessment of Microalgae Production, Harvesting and Drying for Food, Feed, Cosmetics, and

- Agriculture.” *Science of The Total Environment* 837:155742. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2022.155742.
- Villarejo, Arsenio, María Isabel Orús, and Flor Martínez. 1995. “Coordination of Photosynthetic and Respiratory Metabolism in *Chlorella Vulgaris* UAM 101 in the Light.” *Physiologia Plantarum* 94(4):680–86. doi: 10.1111/J.1399-3054.1995.TB00984.X.
- Vivarelli, Lara. 2023. “Valorizzazione Degli Scarti Lattiero-Casari per La Produzione Di Microalghe Estremofile: Coltivazione Etero- e Mixotrofica in Continuo Di *Galdieria Sulphuraria* .”
- Wang, Bei, Christopher Q. Lan, and Mark Horsman. 2012. “Closed Photobioreactors for Production of Microalgal Biomasses.” *Biotechnology Advances* 30(4):904–12. doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2012.01.019.
- Wanner, Ursula, and Thomas Egli. 1990. “Dynamics of Microbial Growth and Cell Composition in Batch Culture.” *FEMS Microbiology Reviews* 6(1):19–43. doi: 10.1111/J.1574-6968.1990.TB04084.X.
- Wellburn, Alan 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):307–13. doi: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2.
- Xu, Xiaoming, Prateek Sharma, Shijie Shu, Tzu Shun Lin, Philippe Ciais, Francesco N. Tubiello, Pete Smith, Nelson Campbell, and Atul K. Jain. 2021. “Global Greenhouse Gas Emissions from Animal-Based Foods Are Twice Those of Plant-Based Foods.” *Nature Food* 2021 2:9 2(9):724–32. doi: 10.1038/s43016-021-00358-x.
- Yustinadiar, Novita, Robert Manurung, and Gede Suantika. 2020. “Enhanced Biomass Productivity of Microalgae *Nannochloropsis* Sp. in an Airlift Photobioreactor Using Low-Frequency Flashing Light with Blue LED.” *Bioresources and Bioprocessing* 7(1). doi: 10.1186/S40643-020-00331-9.
- Zall, R. R. 1992. “Sources and Composition of Whey and Permeate.” *Whey and Lactose Processing* 1–72. doi: 10.1007/978-94-011-2894-0_1.

- Zanolla, Valentina, Natascia Biondi, Alberto Niccolai, Fabian Abiusi, Alessandra Adessi, Liliana Rodolfi, and Mario R. Tredici. 2022. "Protein, Phycocyanin, and Polysaccharide Production by *Arthrospira Platensis* Grown with LED Light in Annular Photobioreactors." *Journal of Applied Phycology* 34(3):1189–99. doi: 10.1007/S10811-022-02707-0/FIGURES/4.
- Zhang, Tian Yuan, Hong Ying Hu, Yin Hu Wu, Lin Lan Zhuang, Xue Qiao Xu, Xiao Xiong Wang, and Guo Hua Dao. 2016. "Promising Solutions to Solve the Bottlenecks in the Large-Scale Cultivation of Microalgae for Biomass/Bioenergy Production." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 60:1602–14.
- Zhu, Baojun, Yali Zheng, Hao Shen, Dong Wei, Li Ni, and Guoyou Wei. 2023. "High-Efficient Removal of Ammonium and Co-Production of Protein-Rich Biomass from Ultrahigh-NH₄⁺ Industrial Wastewater by Mixotrophic *Galdieria Sulphuraria*." *Algal Research* 71:103060. doi: 10.1016/J.ALGAL.2023.103060.
- Zimmermann, Jéssika D. arc Fernandes, Eduardo Bittencourt Sydney, Maria Luísa Cerri, Isabella Kuroki de Carvalho, Kathlyn Schafranski, Alessandra Cristine Novak Sydney, Luciano Vitali, Samantha Gonçalves, Gustavo Amadeu Micke, Carlos Ricardo Soccol, and Ivo Motin Demiate. 2020. "Growth Kinetics, Phenolic Compounds Profile and Pigments Analysis of *Galdieria Sulphuraria* Cultivated in Whey Permeate in Shake-Flasks and Stirred-Tank Bioreactor." *Journal of Water Process Engineering* 38:101598. doi: 10.1016/J.JWPE.2020.101598.
- Zuccaro, Gaetano, Abu Yousuf, Antonino Pollio, and Jean Philippe Steyer. 2020. "Microalgae Cultivation Systems." *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* 11–29. doi: 10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3.