

**POLITECNICO DI TORINO**

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

**Estrazione di glucosio da scarti tessili e  
valorizzazione per crescita mixotrofica di  
microalghe**



**Relatori**

Prof.ssa Tonia Tommasi

Dott. Giacomo Proietti Tocca

**Candidato**

Fabrizio Tasca (s309088)

Marzo 2025



## ABSTRACT

La produzione su scala mondiale di composti chimici di affermata utilità in maniera quanto più ecologicamente sostenibile e virtuosa è tra le sfide del ventunesimo secolo, soprattutto se si tratta di biomolecole coinvolte, tra le altre destinazioni, nella dieta umana. A tale scopo, risulta indispensabile indagare su vie di produzione inesplorate, capaci ad esempio di valorizzare scarti di processi già diffusi globalmente, per mezzo di specie biologiche attualmente di più raro utilizzo. In tal senso, le microalghe potrebbero rappresentare una soluzione, nel caso in cui fosse possibile avere dati attendibili riguardo le loro prestazioni. La Tesi descrive l'attività sperimentale effettuata su scala di laboratorio al fine di verificare le potenzialità di colture microalgali di *Galdieria sulphuraria* operate in modalità mixotrofica sfruttando prodotti di scarto dell'industria tessile. In particolare, sono state utilizzate come fonti di substrato organico soluzioni contenenti glucosio ottenute dal trattamento, tramite idrolisi acida, di campioni di cotone proveniente da scarti dell'industria tessile. Processi di questo tipo si inseriscono in un'ottica di economia circolare, in cui l'enorme quantità di rifiuti prodotta dall'industria del fast fashion viene trasformata in risorsa. A seguito della produzione di glucosio, sono state valutate le prestazioni di *G. sulphuraria* nell'efficienza di utilizzo dello stesso per la propria crescita. I risultati sono anche stati confrontati con quelli relativi alle prestazioni dello stesso ceppo algale in condizioni identiche a meno della fonte di glucosio utilizzata, di origine sintetica e ad elevato grado di purezza, disciolto in soluzione secondo la stessa concentrazione iniziale degli esperimenti con glucosio di origine tessile. I test con glucosio sintetico hanno confermato la già nota capacità da parte del ceppo microalgale di sopravvivere in modalità di crescita mixotrofica, con buone rese. Al contrario, nelle condizioni scelte, i test con glucosio ottenuto da scarti tessili tramite idrolisi non hanno fornito risultati soddisfacenti di crescita: per verificare le reali potenzialità di questo processo sarà necessario migliorare alcuni aspetti delle procedure seguite, impedendo in particolare la formazione di composti antimicrobici nocivi.

## ABSTRACT

One of the challenges of the twentyfirst century is the global scale production of many important chemical compounds in ways that need to be as ecologically sustainable and virtuous as possible, especially when dealing with biomolecules involved, between other possible destinations, in human consumption as food. For this purpose, it is fundamental to keep looking for new ways of production, for example ones that are capable of adding value to wastes of other very well spread processes, through the cooperation with biologic species that are less exploited at the moment. Microalgae could represent a solution in this sense, if it was possible to gain reliable data about their performances. This Thesis describes the experimental activity done at lab scale to verify the potential of cultures of *Galdieria sulphuraria* operated under mixotrophic conditions exploiting wastes of the textile industry. In particular, the sources that have been used as organic substrate were solutions containing glucose that were obtained from acid hydrolysis treatments performed on cotton samples coming from textile waste. Processes of this kind are well suited into models of circular economy, in which the enormous amount of wastes that are produced daily by the fast fashion industry are transformed into a resource. Following glucose production, evaluations were made about the ability of *G. sulphuraria* of using it for its own growth through efficiency parameters. Results were also compared to the ones elaborated from performances of the same microalgae in identical conditions except for the glucose source, in this case coming from commercial synthetic pathways and at high levels of purity, then dissolved into liquid solutions following the same initial concentration as the one of the experiments with textile originated glucose. Tests operated using synthetic glucose confirmed that *G. sulphuraria* can follow mixotrophic metabolic pathways with good yields, as it was already known. On the contrary, tests with glucose obtained from textile wastes through hydrolysis didn't get to satisfying results, in the conditions that were used: to further verify the potential of this process, other tests will be needed in the future to improve the critical aspects. In particular, the formation of antimicrobial products must be properly assessed and avoided.

# INDICE DEI CONTENUTI

1.	Introduzione .....	1
1.1	Struttura della Tesi.....	1
1.2	Motivazione generale e scopo del lavoro di Tesi .....	1
1.3	Colture microalgali .....	3
1.3.1	Caratteristiche comuni.....	3
1.3.2	Ceppi di maggiore interesse ed utilizzo .....	3
1.3.3	Possibili soluzioni reattoristiche.....	4
1.4	Galdieria sulphuraria .....	5
1.5	Glucosio da scarti tessili come substrato .....	6
1.5.1	Valorizzazione dello scarto tessile .....	6
1.5.2	Possibili processi estrattivi .....	7
1.5.2.1	Pretrattamenti fisici e chimici .....	8
1.5.2.2	Idrolisi acida ed enzimatica .....	8
2.	Materiali e metodi .....	11
2.1	Descrizione del processo di produzione di glucosio utilizzato.....	11
2.1.1	Pretrattamento meccanico .....	11
2.1.2	Pretrattamento chimico .....	12
2.1.3	Trattamento idrolitico.....	15
2.1.4	Processi di downstream: adattamento alla coltura microalgale .....	17
2.1.5	Soluzione di glucosio utilizzata per colture microalgali (GLUC1).....	21
2.2	Condizioni di mantenimento delle colture microalgali .....	22
2.2.1	Ceppo utilizzato.....	22
2.2.2	Terreno di coltura .....	23
2.2.3	Altri reagenti .....	24
2.2.4	Descrizione delle condizioni di coltura di mantenimento .....	25
2.3	Soluzioni reattoristiche adottate.....	26
2.3.1	Test in mixotrofia con glucosio di origine sintetica (GS) .....	26
2.3.2	Test in mixotrofia con soluzione di glucosio da idrolisi (GT) .....	29
2.4	Procedure di raccolta dei dati .....	30
2.4.1	Osservazione al microscopio.....	30
2.4.2	Valutazione della concentrazione di biomassa microalgale tramite misura del peso secco.....	30
2.4.3	Valutazione della concentrazione di biomassa microalgale tramite spettrofotometria .....	31
2.4.4	Valutazione della concentrazione di glucosio tramite analisi cromatografica ...	32

2.5	Metodi di elaborazione dei dati raccolti .....	34
2.5.1	Utilizzo delle misure di peso secco .....	34
2.5.2	Utilizzo delle misure spettrofotometriche e correlazione con peso secco .....	34
2.5.3	Utilizzo delle misure cromatografiche .....	35
2.5.4	Calcolo dei parametri di processo .....	35
3.	Risultati .....	37
3.1	Risultati dei test su glucosio sintetico GS .....	37
3.2	Risultati dei test su glucosio di origine tessile GT .....	40
3.3	Discussione critica dei risultati.....	41
4.	Conclusioni e prospettive future .....	43
5.	Lista di simboli ed abbreviazioni .....	45
6.	Riferimenti bibliografici.....	47
7.	Appendice A – Cenni teorici di riferimento sul metabolismo cellulare.....	I
7.1	Possibili vie metaboliche .....	I
7.2	Dinamiche di crescita microalgale .....	II
7.3	Parametri di crescita .....	IV
7.4	Confronto tra meccanismi trofici.....	V
7.5	Contestualizzazione: G. sulphuraria, pH acido e trasporto di CO <sub>2</sub> .....	V
8.	Appendice B – Composizione del terreno di crescita utilizzato .....	VII
9.	Appendice C – Rette di taratura per la valutazione della concentrazione di glucosio tramite HPLC.....	IX
10.	Ringraziamenti .....	XIII

## ELENCO DELLE FIGURE

<b>Figura 1.1</b> Open ponds per coltivazione di <i>Spirulina</i> dell'azienda Earthrise ® ( <a href="https://www.earthrise.com/">https://www.earthrise.com/</a> ).....	4
<b>Figura 1.2</b> (A) PBR tubolari e (B) colonne a bolle dell'azienda MINADEK © ( <a href="https://www.minadek.com/it">https://www.minadek.com/it</a> ); (C) PBR flat panel dell'azienda PHOTON SYSTEMS INSTRUMENTS © ( <a href="https://psi.cz/">https://psi.cz/</a> ).....	5
<b>Figura 1.3</b> Immagini al microscopio di <i>G. sulphuraria</i> .....	5
<b>Figura 2.1</b> Cotone umido conservato in busta di plastica.....	12
<b>Figura 2.2</b> Bottiglia contenente la soluzione basica per il pretrattamento ed il campione di cotone, prima di essere posta in freezer per 6 ore.....	13
<b>Figura 2.3</b> Procedura di filtrazione del pretrattato.....	13
<b>Figura 2.4</b> Procedura di lavaggio.....	14
<b>Figura 2.5</b> Campione pretrattato e lavato posizionato in stufa.....	14
<b>Figura 2.6</b> (A) Essiccatore contenente sfere di silice; (B) essiccatore contenente i campioni, sottovuoto.....	15
<b>Figura 2.7</b> Setup di due esperimenti di idrolisi.....	16
<b>Figura 2.8</b> (A) Contenuto del pallone prima della reazione di idrolisi; (B) prodotto di idrolisi.....	16
<b>Figura 2.9</b> Filtri utilizzati e configurazione testata.....	18
<b>Figura 2.10</b> (A) Campione centrifugato; (B) fase solida di fondo; (C) fase liquida surnatante.....	19
<b>Figura 2.11</b> Esempio di cromatogramma per le soluzioni analizzate. Si nota un intenso picco a tempi inferiori a quello di eluzione del glucosio, probabilmente dovuto alla presenza di sali.....	20
<b>Figura 2.12</b> (A) Campione G3; (B) campione G4; (C) campione G5. I campioni ottenuti con centrifugazione risultano liquidi nell'immediato, ma dopo essere stati congelati e scongelati contengono cristalli in sospensione, probabilmente sali formati dopo l'aggiunta di idrossido di sodio.....	21
<b>Figura 2.13</b> Soluzione GLUC1.....	22
<b>Figura 2.14</b> Bottiglia contenente il terreno AMM in fase di conservazione e provette Falcon contenenti stocks di reagenti per prepararlo.....	24
<b>Figura 2.15</b> (A) Beuta da 500 ml senza deflettori; (B) beuta da 500 ml con deflettori; (C) tappo filtrante.....	25
<b>Figura 2.16</b> (A) Posizionamento su tappetini adesivi delle beute nell'incubatore; (B) incubatore illuminato in funzione.....	26
<b>Figura 2.17</b> Triplicato biologico delle colture inoculate per esperimenti con GS.....	27
<b>Figura 2.18</b> Oblò dell'incubatore: le beute sono posizionate il più vicino possibile alla lampada poggiata sull'incubatore.....	28
<b>Figura 2.19</b> (A) Campione raccolto; (B) separazione delle fasi; (C) fase liquida e pellet solido lavato.....	28
<b>Figura 2.20</b> Triplicato biologico di partenza per esperimenti con GT. Il colore è visibilmente diverso, nonostante le concentrazioni iniziali siano le stesse, a causa della torbidità della soluzione GLUC1.....	29
<b>Figura 2.21</b> Procedura di filtrazione dei campioni.....	30
<b>Figura 2.22</b> (A) Filtri essiccati da tara; (B) filtro umido con biomassa appena depositata; (C) filtri posti ad essiccare in stufa; (D) misurazione del peso secco.....	31
<b>Figura 2.23</b> Cuvette da 1 ml. A sinistra, il bianco contenente solo acqua distillata. A destra, tre campioni diluiti.....	32

<b>Figura 2.24</b> Separazione delle fasi. ....	33
<b>Figura 2.25</b> Vials preparate per analisi HPLC. ....	33
<b>Figura 2.26</b> Variazione di colore dei filtri col passare del tempo, dovuta all'aumento della concentrazione di biomassa. ....	34
<b>Figura 3.1</b> Variazione temporale della concentrazione di biomassa (punti blu) e di glucosio (riquadri rossi) di colture di <i>G. sulphuraria</i> in batch con GS. Entrambi i grafici costruiti a partire dai valori medi tra i triplicati biologici, con variazione standard rappresentata su ciascun punto rispettivamente. ....	37
<b>Figura 3.2</b> Valori del rapporto tra concentrazione di biomassa (g/L) rilevata tramite misura di peso secco e OD <sub>750</sub> . Oscillano intorno a 0,6 ma non con accuratezza tale da ritenere solo la densità ottica una misura affidabile della concentrazione. ....	39
<b>Figura 3.3</b> Colonie microalgali dopo meno di 8 ore dall'inoculo con la soluzione GLUC1. L'assenza di verde è sintomatica della morte. ....	40
<b>Figura 7.1</b> Schema delle modalità trofiche principali. ....	II
<b>Figura 7.2</b> Curva di crescita microbica. ....	III
<b>Figura 7.3</b> Andamento di crescita di <i>G. sulphuraria</i> paragonabile a quello teorico in fase esponenziale e stazionaria. ....	IV
<b>Figura 7.4</b> Rappresentazione grafica del modello di Monod, lineare a basse concentrazioni e con andamento di saturazione per alti valori. Il valore di K <sub>s</sub> è riportato sul grafico come quello per cui la velocità specifica di crescita è la metà di quella massima. ....	V
<b>Figura 7.5</b> CO <sub>2</sub> e carbonati in fase liquida al variare del pH ....	VI
<b>Figura 9.1</b> Retta di taratura per l'utilizzo della strumentazione HPLC. ....	X

## ELENCO DELLE TABELLE

<b>Tabella 1.1</b> Confronto tra idrolisi acida ed enzimatica. ....	9
<b>Tabella 2.1</b> Volumi di soluzione di acido solforico utilizzati per l'idrolisi di ciascun campione. ....	15
<b>Tabella 2.2</b> Caratteristiche delle soluzioni di glucosio ottenute. ....	20
<b>Tabella 2.3</b> Rese in glucosio da cotone. ....	21
<b>Tabella 2.4</b> Condizioni utilizzate per l'avvio di colture microalgali con GS. ....	27
<b>Tabella 3.1</b> Parametri medi di crescita sull'intero esperimento (compresa la fase stazionaria finale). ....	38
<b>Tabella 3.2</b> Parametri medi di crescita massima (solo la fase esponenziale). ....	38
<b>Tabella 3.3</b> Parametri di crescita del replicato biologico più performante. ....	39
<b>Tabella 7.1</b> Differenze tra le diverse modalità trofiche. ....	I
<b>Tabella 8.1</b> Composizione terreno AMM. ....	VII
<b>Tabella 8.2</b> Micronutrienti. ....	VII
<b>Tabella 8.3</b> Concentrazioni degli stocks. ....	VII
<b>Tabella 9.1</b> Dati usati per la costruzione della retta di taratura della strumentazione HPLC. ....	IX

## ELENCO DI FORMULE ED EQUAZIONI

1.1 Reazione di idrolisi	8
2.1 Resa in glucosio da cellulosa	11
2.2 Fattore di diluizione con acqua Milli-Q	17
2.3 Fattore di diluizione con NaOH	17
2.4 Fattore di diluizione vials per HPLC	19
2.5 Velocità massima di crescita	35
2.6 Tempo di duplicazione	35
2.7 Resa in biomassa da glucosio	35
2.8 Produttività di biomassa	35
2.9 Efficienza di utilizzo del carbonio	36
7.1 Legge di Monod	IV
9.1 Equazione della retta di taratura per HPLC	X
9.2 Formula inversa dell'equazione della retta di taratura per HPLC	X
9.3 Correzione della 10.2 con il fattore di diluizione globale	X
9.4 Calcolo del fattore di diluizione globale	XI

# 1. Introduzione

## 1.1 *Struttura della Tesi*

Il capitolo 1 introduce il contesto entro il quale si inserisce questo lavoro di Tesi, facendo ricorso a fonti di letteratura scientifica per descrivere lo stato dell'arte nel campo d'interesse. I capitoli successivi descrivono invece nel dettaglio le operazioni svolte in laboratorio al fine dello studio delle prestazioni del ceppo microalgale analizzato.

Il capitolo 2 introduce innanzitutto i materiali utilizzati, e prosegue con la descrizione dei sistemi adottati e delle procedure che sono state seguite, per raccogliere i dati e per successivamente analizzarli e trovarne una corretta interpretazione.

All'interno del capitolo 3 sono riportati i risultati delle analisi effettuate in termini quantitativi, ottenuti seguendo le procedure descritte al capitolo precedente e discussi criticamente.

Il capitolo 4 contiene le conclusioni che sono state tratte dall'esperienza di Tesi, alla luce dei risultati ottenuti, con brevi valutazioni qualitative sulle prospettive future dei processi presi in considerazione.

I capitoli 5 e 6, rispettivamente la lista di simboli ed abbreviazioni e la sezione dedicata ai riferimenti bibliografici, racchiudono informazioni che possono essere utili per meglio comprendere il contenuto della Tesi o per approfondire alcuni aspetti grazie a contributi di rilievo nello stesso ambito. Entrambi seguono l'ordine alfabetico, e non quello di comparsa all'interno del testo dei relativi rimandi.

I capitoli 7, 8 e 9, infine, constano di appendici inserite per trattare separatamente argomenti che rischierebbero di appesantire la lettura della Tesi, distogliendo l'attenzione dalle informazioni principali e dall'intenzione dietro il lavoro svolto.

- L'appendice A fornisce alcune nozioni teoriche di base riguardo aspetti del metabolismo cellulare delle specie coinvolte, utili a far chiarezza sul significato di alcune terminologie utilizzate all'interno del testo e date per scontate al fine della comprensione dei fenomeni descritti.
- L'appendice B racchiude i dettagli di composizione del terreno di coltura adoperato per il mantenimento delle colture.
- L'appendice C ha al proprio interno i dati relativi alle rette di taratura costruite per poter estrapolare dei risultati sensati dalle analisi cromatografiche effettuate tramite la strumentazione descritta al capitolo 2.

## 1.2 *Motivazione generale e scopo del lavoro di Tesi*

La società odierna richiede giornalmente che siano prodotti in grandi, se non grandissime, quantità, alcuni beni di assoluta importanza. Tra questi, spiccano quelli dell'industria alimentare o del campo farmaceutico, che senza dubbio rappresentano necessità primarie dell'umanità. Risultano però indispensabili anche specie chimiche coinvolte in altre filiere, come i carburanti, utilizzati per la locomozione ed il trasporto di materiali e persone.

L'esempio dei settori appena citati, fondati sull'utilizzo di composti per la maggior parte organici, fa comprendere l'importanza di disporre di biomolecole di base per un grandissimo numero di usi. A tale scopo, modalità di ottenimento di queste specie chimiche che siano il più sostenibili possibili sono da ricercare con costanza: l'utilizzo di processi produttivi tradizionali

negli scorsi decenni ha evidenziato infatti la necessità di cercare nuove vie meno impattanti. In particolare, bisogna ridurre le emissioni di gas serra come la CO<sub>2</sub>, altamente influenti sul cambiamento climatico.

Il settore agro-alimentare, ad esempio, rappresenta circa il 26% delle emissioni globali di gas serra (Wood and Tavan, 2022), e buona parte di queste provengono dall'allevamento di bestiame, che necessita di grandi spazi per l'ottenimento di proteine animali finalizzate al consumo umano, contribuendo significativamente ad una diffusa perdita di biodiversità ed eutrofizzazione, a causa dell'utilizzo di fertilizzanti per le monoculture destinate all'alimentazione animale. Una transizione a proteine di tipo vegetale potrebbe certamente influire positivamente.

Risulta necessario ricorrere a nuovi processi che mantengano la neutralità carbonica o addirittura inglobino al proprio interno l'interazione positiva con altre operazioni produttive delle quali riducano l'impatto ambientale come valore aggiunto.

Tra le possibili opzioni, sempre più interessanti risultano essere vie di tipo biotecnologico, in cui microrganismi selezionati con adeguate caratteristiche possono essere d'aiuto nella lotta al cambiamento climatico ed all'inquinamento. Ad esempio, diverse specie di microalghe, le quali non necessitano di terreni coltivabili ma possono crescere utilizzando acqua marina e nutrienti residui, sono in grado di accumulare al proprio interno sensibili quantitativi di biomolecole di interesse, con impatti ambientali ridotti. Si tratta ad esempio di carboidrati (fino al 60% del peso secco), proteine (fino al 65%), olii o lipidi (fino al 70%) contenenti anche importanti acidi grassi insaturi essenziali (Draaisma et al., 2013).

Lo sfruttamento di colture microalgali per la produzione di biochemicals potrebbe dunque rappresentare una via di sviluppo sostenibile, qualora queste fossero studiate adeguatamente e fornissero risultati positivi in maniera attendibile e riproducibile su larga scala in modo economicamente conveniente. Soprattutto, sarebbe un grosso passo in avanti quello di avviare e mantenere le colture con materiali di scarto di altri processi come nutrimento.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato dunque quello di testare la possibilità di coltivare microalghe della specie *Galdieria sulphuraria* utilizzando, come substrato carbonioso per la modalità mixotrofica di crescita, glucosio estratto tramite idrolisi acida da scarti tessili in cotone, osservando quali possano essere le migliori condizioni di crescita, alla luce dei dati e della loro elaborazione.

Questi risultati sono stati confrontati con quelli provenienti da test effettuati su altre fonti di carbonio, in particolare glucosio di origine sintetica ad elevata purezza.

Una parte del lavoro di Tesi abbastanza importante è consistita, preliminarmente rispetto alle colture microalgali, proprio nell'effettuazione di test di estrazione di glucosio a partire da cotone. Il fine principale era l'ottenimento di glucosio per utilizzarlo come nutrimento per *Galdieria*, e non la valutazione nel dettaglio di prestazioni e rese di questo processo o la sua ottimizzazione. Maggiori dettagli a riguardo si trovano in sezioni e capitoli successivi, in cui vengono citati i testi usati come riferimento per la comprensione del tema e la riproduzione degli esperimenti, e sono descritte nel dettaglio tutte le procedure utilizzate durante questo lavoro di Tesi.

## 1.3 Colture microalgali

### 1.3.1 Caratteristiche comuni

Il termine “microalghe” fa riferimento ad un insieme abbastanza ampio (più di 200.000 specie diverse) di microrganismi uni o multicellulari contenenti clorofilla e caratterizzati da un tallo indifferenziato, senza radici, steli e foglie, il cui metabolismo principale è quello fotosintetico (Andersen, 2013).

Può trattarsi di organismi procarioti o eucarioti, che vivono individualmente o aggregati in colonie. La loro estrema adattabilità ne permette l'esistenza in diversissimi ambienti del globo, principalmente acquatici ma anche terrestri, nelle più svariate condizioni di nutrimento, luce, pH, temperatura e composizione chimica, spesso in associazione con altri organismi.

Solo per citarne alcuni esempi, il phylum Chlorophyta comprende i microrganismi eucariotici più comunemente noti col nome di alghe verdi, caratterizzate dalla presenza di clorofilla a e b all'interno dei plastidi. Si tratta di specie unicellulari in colonie, come ad esempio *Chlorella vulgaris*. La divisione Rodophyta racchiude invece specie unicellulari estremofile di alghe rosse come *Galdieria sulphuraria*.

Tutte le microalghe utilizzano un metabolismo di crescita basato sulla fotosintesi, in autotrofia. Tuttavia, alcune specie sono in grado di sfruttare anche metabolismi di tipo eterotrofico o mixotrofico, con effetti sulla propria composizione strutturale specifica. In base alle diverse condizioni di crescita, risulta variabile il contenuto di proteine ed amminoacidi essenziali, vitamine, carboidrati, lipidi, acidi grassi ed olii espressi ed accumulati all'interno delle cellule.

Informazioni più dettagliate riguardo la teoria metabolica di crescita sono riportate all'interno dell'Appendice A.

### 1.3.2 Ceppi di maggiore interesse ed utilizzo

I generi di microalghe più utilizzati commercialmente comprendono *Chlorella*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Nannochloropsis*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas* (Spolaore et al., 2006), a cui si aggiunge il genere estremofilo *Galdieria*, che grazie alle sue capacità di accumulo di proteine ha raccolto sempre più interesse recentemente (Abiusi et al., 2022b).

L'applicazione più importante, allo stato attuale, riguarda il campo alimentare e nutraceutico, in cui viene sfruttato ad esempio l'accumulo di elevati contenuti proteici, fino al 65-80% della biomassa totale (Becker, 2007; Draaisma et al., 2013; Janssen et al., 2022), da utilizzare come fonti nutrizionali o supplementi nella dieta umana o animale (Becker, 2007; Janssen et al., 2022; Kusmayadi et al., 2021), previa verifica di digeribilità e bioaccessibilità, che spesso costituiscono fattori limitanti (Becker, 2007; Muys et al., 2019; Wild et al., 2019).

Anche le componenti lipidiche sono ritenute piuttosto importanti, in particolare gli acidi grassi polinsaturi (PUFAs) come l'acido linoleico o arachidonico e tutti gli  $\omega 3$  e  $\omega 6$  (Becker, 2013; Kusmayadi et al., 2021), utilizzabili come additivi alimentari e per la prevenzione di disturbi cardiovascolari (Sharma et al., 2020; Swanson et al., 2012).

Inoltre, la presenza di vitamine essenziali, tra cui le vitamine A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina e acido folico (Becker, 2013), contribuisce all'aumento del valore nutrizionale delle microalghe, che possono essere destinate all'alimentazione umana o animale, ad esempio in acquacolture (Ahmad et al., 2022).

Ulteriori applicazioni delle microalghe possono essere nella produzione di biocombustibili di terza generazione (Brennan and Owende, 2010; Wijffels and Barbosa, 2010): i lipidi da esse prodotti possono essere trattati con processi di transesterificazione per l'ottenimento di biodiesel (Chisti, 2007), mentre i carboidrati possono essere usati direttamente come precursori di etanolo (de Farias Silva and Bertucco, 2016) (o trasformati in esso tramite processi fermentativi) o per la produzione di bioidrogeno tramite digestione anaerobica (Brennan and Owende, 2010; Wijffels and Barbosa, 2010).

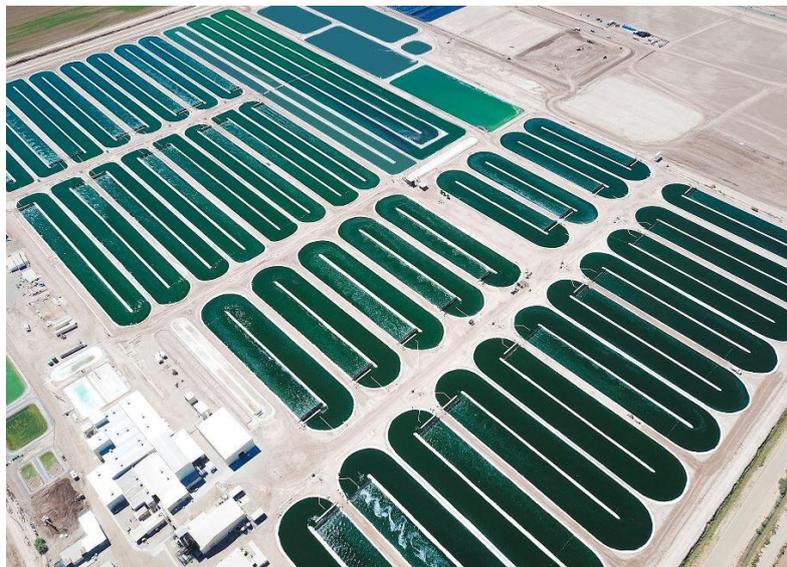
In più, le microalghe possono essere utilizzate in processi di biorisanamento e trattamento di acque reflue, da cui possono efficacemente rimuovere metalli, azoto, fosforo e altre sostanze e ridurre i valori di COD (Abdel-Raouf et al., 2012; Di Caprio et al., 2022; Wang et al., 2010).

Infine, la maggior parte delle biomolecole di accumulo già citate, una volta estratte dalle cellule microalgali, possono certamente trovare utilizzo anche in campo cosmetico e biofarmaceutico.

### 1.3.3 Possibili soluzioni reattoristiche

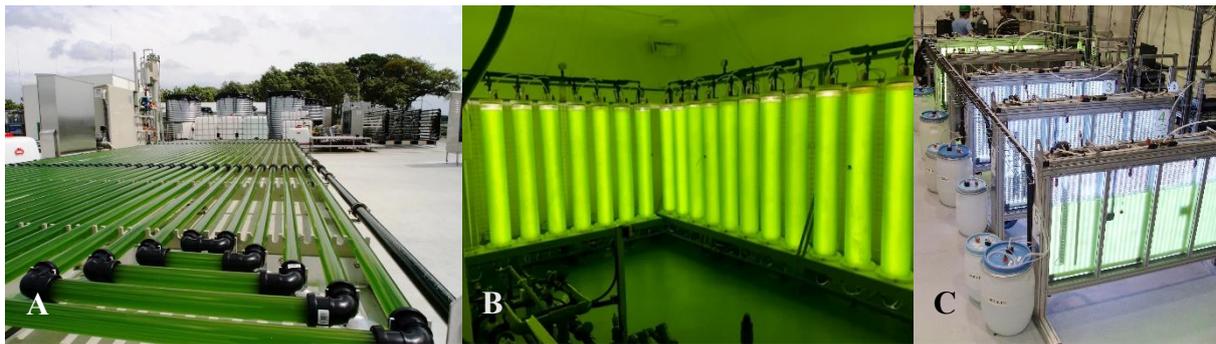
Le tipologie di reattori utilizzabili su scala industriale sono principalmente tre: bacini aperti (*open ponds*), fotobioreattori (PBR) e fermentatori.

Gli open ponds sono il sistema meno complesso strutturalmente, di fatto delle ampie vasche esposte all'atmosfera (Figura 1.1). Presentano però diversi svantaggi: perdite per evaporazione, cattivo utilizzo della luce, diffusione della CO<sub>2</sub> in atmosfera, necessità di ampi spazi, facile contaminazione (soprattutto in condizioni eterotrofiche), agitazione inefficiente, eccessiva dipendenza dalla luce solare. Possono essere utilizzati solo per colture autotrofiche, in cui è meno rilevante il problema della contaminazione.



**Figura 1.1** Open ponds per coltivazione di *Spirulina* dell'azienda Earthrise ® (<https://www.earthrise.com/>).

I PBR possono essere di diverso tipo: tubolari, a pannello piatto, colonne a bolle (Figura 1.2). In ogni caso, il concetto di base è di un ambiente di reazione chiuso ma esposto ad illuminazione, naturale o più comunemente artificiale, grazie alle pareti in vetro. In questi reattori, il controllo di molti parametri quali ad esempio temperatura, agitazione e pH risulta più semplice rispetto ad un sistema aperto. Inevitabilmente, i costi di pompaggio, introduzione di specie gassose, miscelazione, illuminazione (la quale può rappresentare un fattore limitante per la crescita), manutenzione risultano maggiori rispetto a quelli dei sistemi aperti. Rispetto ai sistemi aperti, è possibile limitare più facilmente le contaminazioni, motivo per il quale questireattori sono utilizzabili sia per colture fotoautotrofiche che anche per colture mixotrofiche.



**Figura 1.2** (A) PBR tubolari e (B) colonne a bolle dell'azienda MINADEK © (<https://www.minadek.com/it>); (C) PBR flat panel dell'azienda PHOTON SYSTEMS INSTRUMENTS © (<https://psi.cz/>).

Per le colture eterotrofiche, in cui non è richiesta l'illuminazione, vengono preferiti fermentatori classici, che possono essere sterilizzati e lavorare in modalità batch o fed-batch, e che garantiscono un controllo accurato sulla maggior parte dei parametri di processo.

#### 1.4 *Galdieria sulphuraria*

Le microalghe della specie *Galdieria sulphuraria* (Figura 1.3; Barcytè et al., 2018), catalogate all'interno della divisione Rodophyta delle alghe rosse, sono microrganismi unicellulari termotacidofili, in grado di sopravvivere in alcuni degli ambienti con le condizioni più estreme conosciute. Si trovano ad esempio in sorgenti geotermali sulfuree o in luoghi caratterizzati da estrema acidità, alte temperature, oscurità, alte concentrazioni di sali e metalli.



**Figura 1.3** Immagini al microscopio di *G. sulphuraria*.

Diversi studi ne hanno dimostrato le capacità di adattamento e resilienza, in range di pH da 0.05 a 4, temperature fino a 56°C ed elevate concentrazioni saline, grazie soprattutto alla spiccata versatilità metabolica: sono infatti in grado di condurre vie di sviluppo di tipo fotoautotrofico, chemioeterotrofico o anche mixotrofico (Abiusi et al., 2022a; Pleissner et al., 2023).

Per tale motivo, gli organismi della classe *Galdieria*, tra cui *G. sulphuraria*, sono soggetti a studi che possano aiutare a sfruttarne il potenziale per un crescente numero di applicazioni biotecnologiche, quali il trattamento di acque reflue, la rimozione di metalli pesanti o altri contaminanti, il recupero di elementi rari da scarti o reflui, e soprattutto la sintesi di composti bioattivi destinati ai settori farmaceutico, nutraceutico o di altro tipo (Retta et al., 2024).

È da sottolineare, in particolare, l'accumulo di proteine all'interno delle cellule di queste specie (fino al 65% del peso secco), con un bilanciato profilo amminoacidico, adatto al consumo umano (Abiusi et al., 2024; Canelli et al., 2023; Janssen et al., 2022). Proprio quest'ultimo aspetto le rende particolarmente promettenti come risorsa alimentare del futuro (Abiusi et al., 2022b).

A livello economico ed ingegneristico, inoltre, non è per nulla da sottovalutare la peculiarità di un organismo del genere, che richiede habitat di coltura talmente estremi da inibire autonomamente la crescita della gran parte di altre potenziali colonie contaminanti e competitive. Ciò risulta in uno dei principali vantaggi di questa specie rispetto ad altre, e ne motiva lo studio: colture di essa richiederebbero spese di sterilizzazione nettamente inferiori a quelle di altri possibili candidati biologici per le stesse filiere produttive (Abiusi et al., 2022b; Di Caprio et al., 2022; Pleissner et al., 2023).

Di contro, un aspetto negativo delle condizioni acide di coltura è legato al difficile utilizzo dell'anidride carbonica in soluzione acquosa, che porta a basse rese in modalità autotrofica da parte di *Galdieria* rispetto ad altre specie coltivabili in habitat alcalini. Questo rende quasi obbligatori studi come questo che indaghino su modalità di utilizzo di fonti organiche in eterotrofia o in mixotrofia, per il miglioramento di parametri di resa e produttività (Abiusi et al., 2020; Perez-Garcia et al., 2011; Proietti Tocca et al., 2024; Ruiz et al., 2022). Maggiori informazioni a riguardo sono riportate all'interno dell'Appendice A.

Ovviamente, però, elevate produttività e rese di processo accettabili rispetto a quelle fotoautotrofiche, con *Galdieria*, sono ottenibili solo se le fonti organiche utilizzate risultano nel complesso in un processo più sostenibile economicamente, socialmente ed ecologicamente. La riduzione dei costi legati all'ottimizzazione dell'uso di CO<sub>2</sub> nelle colture non deve essere controbilanciata da eccessive spese di produzione delle fonti organiche. Non è giustificabile, ad esempio, l'utilizzo di zuccheri o di glucosio altrimenti destinati ad usi alimentari diretti, con tutti gli investimenti energetici, economici e territoriali annessi, che sono nettamente superiori al risparmio derivato dal non utilizzo di anidride carbonica (Barbosa et al., 2023).

## 1.5 *Glucosio da scarti tessili come substrato*

### 1.5.1 Valorizzazione dello scarto tessile

Alla luce di quanto discusso all'interno della sezione 1.4, nonostante gli zuccheri, ed in particolare il glucosio, siano intuitivamente tra le prime fonti organiche di carbonio che possano venire in mente per portare avanti processi biologici eterotrofici o mixotrofici, non è pensabile produrli appositamente per lo scopo, coltivando terreni con piantagioni dedicate: piuttosto, sono

da ricercare altre modalità di ottenimento di queste biomolecole, ad esempio a partire da scarti dell'industria tessile.

Dalla comune esperienza, buona parte dei capi sono infatti composti da fibre di origine vegetale o sintetica, basata su monomeri organici, teoricamente riottenibili chimicamente. In particolare, il cotone risulta quasi interamente costituito da fibre cellulosiche (Wakade et al., 2023), composte da monomeri zuccherini e che è possibile scindere in essi, ad esempio tramite idrolisi.

L'utilizzo di scarti dell'industria tessile per l'ottenimento di biomolecole da destinare a colture microalgali rappresenterebbe, qualora applicabile su larga scala, una misura di opposizione al fenomeno del *fast fashion*, ormai di dominio pubblico poiché globalmente diffuso. Si tratta di una modalità di produzione, vendita e consumo basata su abiti prodotti in tempi brevissimi ed acquistabili a bassissimo prezzo dal consumatore finale.

Tuttavia, la qualità dei capi risente inevitabilmente di una filiera così accelerata, e non può che essere bassa: la vita dei vestiti prodotti, di conseguenza, tende ad essere molto breve, solo pochi utilizzi prima di essere gettati via. Ciò si traduce in una produzione di rifiuti ad un ritmo paragonabile, se non superiore, a quello di creazione di nuovi beni.

La valorizzazione dello scarto, dunque, risulta imperativa. Ciascun capo, nel suo ciclo vita, richiede dei passaggi inevitabili:

- sviluppo del design;
- produzione delle materie prime, con impatto ambientale significativo, dato da deforestazione e coltivazione di terreni ad esse destinati con elevato consumo idrico (Jayakumari et al., 2024; Mammadova et al., 2022), o produzione di monomeri sintetici dell'industria petrolchimica;
- preparazione dei materiali: filatura, tessitura, tintura, con impatto energetico ed idrico non trascurabile, oltre alle spese di produzione dei pigmenti;
- manifattura (cucitura);
- trasporto, dipendentemente dalla scala può essere anche molto rilevante;
- vendita;
- uso dei consumatori, non sono infatti da trascurare le spese energetiche ed idriche legate al lavaggio;
- post consumo, cioè il necessario trattamento degli scarti, anche solo per il trasporto in discarica.

Non è accettabile pensare ad una filiera produttiva in cui tutti i passaggi coinvolti conducano così rapidamente ad un rifiuto non ulteriormente utilizzabile e dunque a tutti gli effetti inquinante.

### 1.5.2 Possibili processi estrattivi

Allo stato attuale, diversi studi hanno già trattato la possibilità di ottenere glucosio da scarti tessili. Molto pochi sono invece i riferimenti riguardo il potenziale utilizzo di questi prodotti come substrato di crescita per microrganismi, ed in particolare per *G. sulphuraria*. Obiettivo di questo lavoro di Tesi, dunque, è quello di procurare nuovi dati ed informazioni in tale ambito, per comprendere vantaggi del processo o, al contrario, possibili limiti nella sua realizzazione.

Tra gli studi reperibili in letteratura scientifica, un certo numero tratta come opzione il processo di idrolisi, in varie condizioni. La reazione di base, in tutti i casi, è comunque la stessa:

la depolimerizzazione di lunghe fibre cellulosiche in oligosaccaridi e monosaccaridi di glucosio, tramite la rottura dei legami 1-4  $\beta$ -glicosidici ad opera di molecole d'acqua (Dee and Bell, 2011).

Nella forma più generale possibile:



Le rese dei processi idrolitici sono piuttosto variabili in base al particolare trattamento utilizzato, in ambiente acido, basico o enzimatico. Poiché le condizioni di interesse per la coltura di *G. sulphuraria* sono quelle di un ambiente acido, non sono stati presi in considerazione processi idrolitici alcalini ma solo acidi o enzimatici, al fine della selezione del metodo da adoperare. Il glucosio ottenuto sarà in questo modo più facilmente adattabile alla coltura.

Nella maggior parte dei casi, le rese sono migliorate dall'applicazione di pretrattamenti sulla massa reagente, di tipo fisico o chimico (Gholamzad et al., 2014).

#### 1.5.2.1 Pretrattamenti fisici e chimici

L'introduzione di un pretrattamento meccanico migliora la bagnabilità del cotone e la sua capacità di idratarsi, aumentando la superficie accessibile e favorendo il contatto tra l'agente idrolitico e le fibre polimeriche negli step successivi. L'azione meccanica di taglio o polverizzazione rompe infatti i legami intercatena tra le fibre e provoca un allargamento del campione di cotone, massimizzando lo spazio disponibile al suo interno per l'accesso del liquido nei processi che seguono (Boondaeng et al., 2023; Egan et al., 2023). Trattamenti in autoclave a 120°C possono contribuire alla diminuzione del quantitativo di emicellulosa in favore della sola cellulosa (Boondaeng et al., 2023; Egan et al., 2023).

Il pretrattamento chimico ha il fine di ridurre la quantità di cellulosa cristallina e massimizzare la quantità di quella amorfa, separando inoltre cellulosa ed emicellulosa, rendendo così più accessibile la prima. Possono essere utilizzati pretrattamenti acidi o alcalini.

Pretrattamenti chimici alcalini possono essere condotti a temperature da -20°C a 120°C, per pochi minuti o per qualche ora, tipicamente con soluzioni di idrossido di sodio o basi organiche come l'urea, in concentrazioni inferiori al 20% (Boondaeng et al., 2023; Cho et al., 2023). Pretrattamenti acidi coinvolgono principalmente acido solforico in basse concentrazioni, ma sono meno interessanti.

#### 1.5.2.2 Idrolisi acida ed enzimatica

Metodi basati su idrolisi acida coinvolgono specie come acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), acido cloridrico ( $\text{HCl}$ ), acido nitrico ( $\text{HNO}_3$ ) o acido fosforico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), in concentrazioni dallo 0,5% al 60% (w/v). I carichi di cotone utilizzati sono tipicamente inferiori al 10%, e le temperature possono variare tra quella ambiente e 200°C. Sono processi abbastanza veloci (da pochi minuti a poche ore) ma con resa relativamente bassa (Binczarski et al., 2024; Håkansson and Ahlgren, 2005; Sanchis-Sebastiá et al., 2021).

Metodi basati su idrolisi enzimatica, invece, sfruttano cellulasi. Il risultato è una resa tipicamente maggiore ma in tempi nettamente più lunghi, fino a 7 giorni, e con necessità di controllo continuo dei parametri di reazione per evitare l'inattivazione degli enzimi, ad esempio

la temperatura intorno ai 50°C. Valori di pH maggiori di 6 riducono nettamente le prestazioni (Li et al., 2019).

In Tabella 1.1 sono riassunti i principali parametri di interesse delle due tipologie di processo, in base alle fonti analizzate.

**Tabella 1.1** Confronto tra idrolisi acida ed enzimatica.

	<b>Idrolisi acida</b>	<b>Idrolisi enzimatica</b>
<b>Temperatura ottimale</b>	Da 20 a 120°C	50°C
<b>Durata</b>	Da 15 minuti a poche ore	Da 3 ore a 7 giorni
<b>Resa massima senza pretrattamenti</b>	30% (w/w)	50% (w/w)
<b>Resa massima con pretrattamenti</b>	60% (w/w)	95% (w/w)



## 2. Materiali e metodi

All'interno di questo capitolo, è innanzitutto descritto in dettaglio il processo di produzione di glucosio adottato (sezione 2.1), a seguire le condizioni di mantenimento microalgali (sezione 2.2), infine gli esperimenti di coltura e le misure utilizzate per i risultati (sezioni 2.3, 2.4, 2.5).

### 2.1 Descrizione del processo di produzione di glucosio utilizzato

L'analisi descritta all'interno della sezione 1.5 è stata utile per definire il procedimento da utilizzare allo scopo di ottenere glucosio da cotone. Le condizioni specifiche adoperate sono state scelte anche dopo il confronto diretto con esperimenti effettuati precedentemente negli stessi laboratori del Politecnico di Torino, nello stesso ambito, in altri progetti di Tesi, i quali avevano mostrato risultati sufficientemente promettenti.

Il processo selezionato, di fatto, costituisce un tentativo di scale up di questi test, con masse di cotone alimentate 10 volte superiori ed altri parametri conseguentemente diversi ma in linea con le stesse procedure di fondo.

In tutti i casi, lo scopo degli esperimenti è stato solo quello di produrre glucosio da destinare alle colture di *G. sulphuraria* in quantità apprezzabili ed in concentrazioni utilizzabili e non l'ottimizzazione del processo di estrazione. Per tale motivo, è stato prediletto un processo di idrolisi acida, più veloce di uno enzimatico sebbene con minor resa.

Nonostante l'ottimizzazione del processo non fosse il fine principale, per verificarne l'efficacia sono comunque state effettuate valutazioni riguardo la resa in glucosio, calcolata secondo la formula 2.1.

$$Resa \% = \frac{\text{grammi di glucosio ottenuti}}{\text{grammi di cellulosa iniziali} \times 1,111} \times 100 \quad [2.1]$$

Il fattore 1,111 è chiamato *fattore di disidratazione* e tiene in considerazione l'aggiunta di acqua alle catene di cellulosa (Boondaeng et al., 2023). La massa di cellulosa è calcolabile supponendo che la cellulosa costituisca il 90% in peso del cotone (Cho et al., 2023).

La materia prima utilizzata durante gli esperimenti è sempre stata dello stesso tipo: tessuto da camicie in 100% cotone. Non sono invece stati testati per il consumo algale campioni di tessuto contenenti altri materiali come ad esempio il PET.

Tra le possibili vie di trattamento citate nel capitolo precedente, è stata selezionata la procedura descritta di seguito, che consta di 3 fasi principali:

1. Pretrattamento meccanico
2. Pretrattamento chimico
3. Trattamento idrolitico

#### 2.1.1 Pretrattamento meccanico

Il cotone è stato sottoposto ad un pretrattamento consistente in sfilacciamento e macerazione per mezzo di lame. Il prodotto finale del pretrattamento sono dei pezzi di cotone con grana da

6 mm, conservati in buste di plastica, all'interno dei quali mantengono circa il 4,39% di umidità, come osservabile in Figura 2.1.



**Figura 2.1** Cotone umido conservato in busta di plastica.

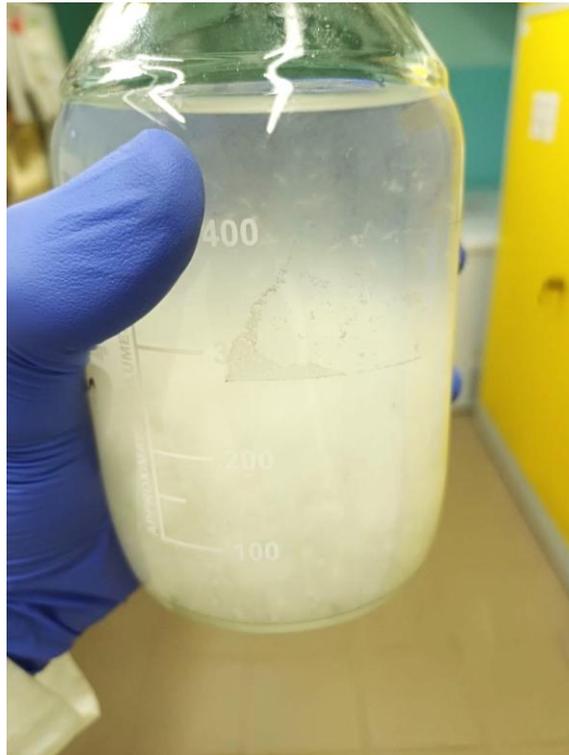
Quest'ultimo dato è stato ottenuto da test su alcuni campioni di cotone pretrattato prelevati dal sacchetto, che dopo essere stati essiccati in stufa a 105°C per almeno 2 ore, e successivamente all'interno di un essiccatore sottovuoto contenente sfere di silice secca (anch'essa essiccata in stufa per disidratarla) per 45 minuti, hanno mostrato una perdita di peso pari, in media, al 4,39% di quello iniziale.

### 2.1.2 Pretrattamento chimico

È stato effettuato un pretrattamento chimico in ambiente basico a bassa temperatura, su campioni da 5 g di cotone secco (5,23 g di cotone umido al 4,39% provenienti dal trattamento precedente, pesati con microbilancia di precisione).

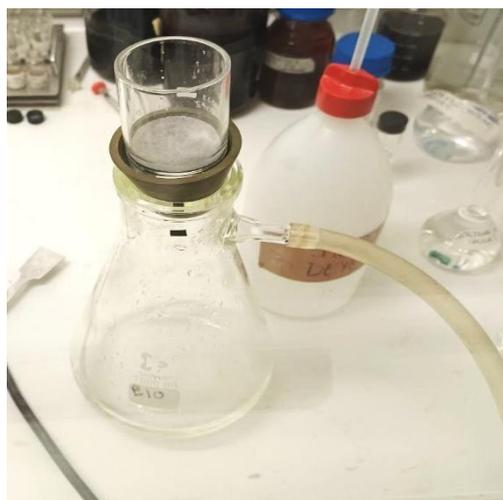
In particolare, è stata usata una soluzione acquosa contenente il 2% NaOH (w/v) ed il 14% di urea (w/v), preparata ogni volta ex novo nella misura di 500 ml, aggiungendo in acqua distillata le corrette quantità di NaOH (NaOH 98-100,5% w/w, Honeywell Fluka™) ed urea (urea 99-100,5% w/w, Sigma-Aldrich) sotto cappa chimica.

Ciascun campione da 5,23 g del cotone pretrattato meccanicamente è stato prelevato dal sacchetto in cui era contenuto e lasciato in immersione nella suddetta soluzione basica da 500 ml (upload di solido dell'1% w/v), all'interno di una bottiglia in vetro borosilicato 3.3, agitata manualmente solo all'inizio per favorire il bagnamento del solido, e successivamente posta in freezer senza alcuna agitazione alla temperatura di -20°C per 6 ore (Figura 2.2).



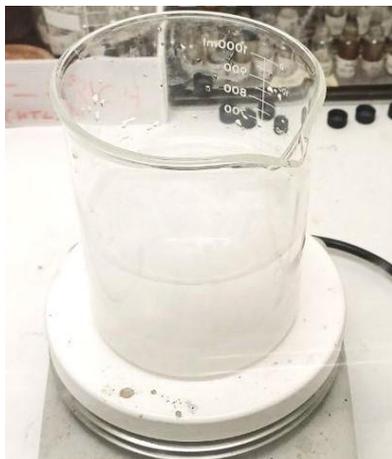
**Figura 2.2** Bottiglia contenente la soluzione basica per il pretrattamento ed il campione di cotone, prima di essere posta in freezer per 6 ore.

Al termine delle 6 ore, la bottiglia è stata prelevata dal freezer e lasciata scongelare, ed il contenuto è stato filtrato sotto cappa chimica, utilizzando una pompa da vuoto da laboratorio collegata ad una beuta codata con filtro (Boro 3.3, por. 2) all'interno dell'imboccatura, per separare la massa secca di cotone pretrattato dalla soluzione basica liquida (Figura 2.3).



**Figura 2.3** Procedura di filtrazione del pretrattato.

Il cotone rimasto sul filtro è stato poi sottoposto, sempre sotto cappa, a diversi lavaggi, al fine di neutralizzarlo prima della fase successiva di idrolisi: è stato immerso in becher con acqua distillata posto su una piastra di agitazione, agitando per pochi minuti tramite un'ancoretta magnetica all'interno del becher stesso. Il contenuto del becher è stato poi filtrato con le stesse modalità descritte al paragrafo precedente, ed il pH della fase liquida filtrata al fondo della beuta misurato tramite pH-metro (Figura 2.4).



**Figura 2.4** Procedura di lavaggio.

La procedura di lavaggio e filtrazione è stata ripetuta identicamente fino al raggiungimento di un valore di pH quanto più prossimo a 7, risultato ottenuto in media con tre lavaggi da 500 ml di acqua ciascuno.

Al termine, è stato conservato solamente il residuo solido sul filtro, ovvero il campione di cotone pretrattato e neutralizzato, da idrolizzare. Prima del trattamento di idrolisi, il cotone è stato essiccato in stufa a 105°C per una notte (Figura 2.5) e successivamente in essiccatore contenente sfere di silice secca (anch'essa essiccata la notte precedente in stufa per disidratarla) sottovuoto per 45 minuti (Figura 2.6).



**Figura 2.5** Campione pretrattato e lavato posizionato in stufa.



**Figura 2.6** (A) Essiccatore contenente sfere di silice; (B) essiccatore contenente i campioni, sottovuoto.

Prelevato il campione secco dall'essiccatore, è stata quantificata esattamente la sua massa per valutare eventuali perdite di materia rispetto alle condizioni iniziali e calcolare le corrette quantità necessarie dei reagenti per l'idrolisi.

### 2.1.3 Trattamento idrolitico

Sui campioni pretrattati, una volta neutralizzati e secchi, è stato effettuato un trattamento di idrolisi acida all'interno di soluzione acquosa di  $H_2SO_4$  al 50% (w/v), preparata ogni volta ex novo nei volumi necessari a partire da soluzione di  $H_2SO_4$  al 100% o al 95% (w/v) ed acqua Milli-Q.

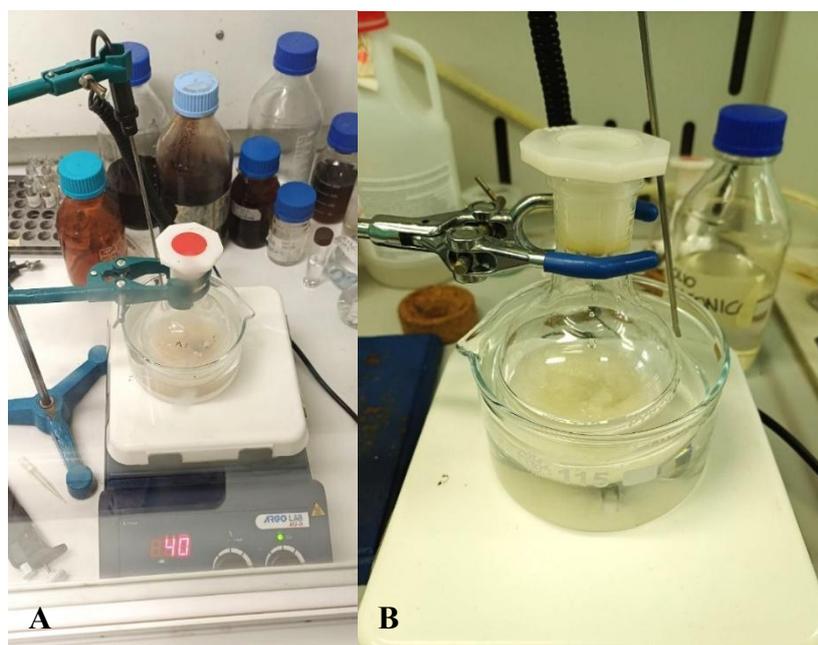
In particolare, le condizioni operative hanno previsto di lavorare sempre con un upload di solido al 7% (w/v). In totale, sono stati effettuati 7 esperimenti. In Tabella 2.1 sono riportate le quantità di soluzione acida al 50% utilizzate per i diversi campioni sottoposti ad idrolisi, in base alle quantità di solido recuperate dai passaggi precedenti. Solo il campione G1 è stato trattato con una soluzione di acido al 40%, anziché al 50. Le scarse prestazioni, commentate in seguito, hanno guidato la decisione verso l'utilizzo di percentuali maggiori di acido nei successivi esperimenti.

**Tabella 2.1** Volumi di soluzione di acido solforico utilizzati per l'idrolisi di ciascun campione.

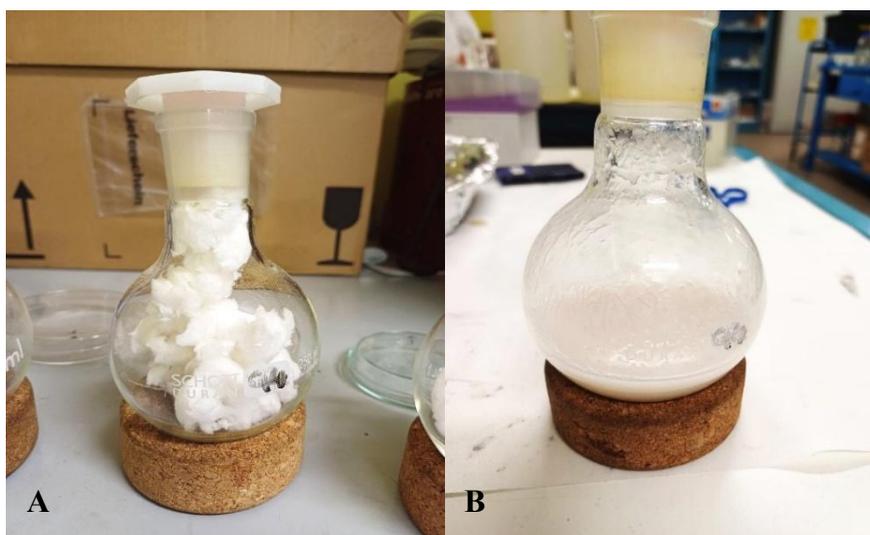
<b>G1</b>	71,4 ml
<b>G2</b>	71,4 ml
<b>G3</b>	67,43 ml
<b>G4</b>	69,86 ml
<b>G5</b>	71,86 ml
<b>G6</b>	70,14 ml
<b>G7</b>	69,5 ml

La reazione è stata fatta avvenire sotto cappa per 1,5 ore all'interno di un pallone dalla capienza massima di 250 ml ma riempito solamente con la corretta quantità di soluzione acida, chiuso con tappo ed immerso in un bagno di olio siliconico o acqua alla temperatura di 40°C, mantenuta tramite piastra di agitazione magnetica, dotata di termocoppia, con funzione riscaldante (Figura 2.7). La piastra magnetica ha costituito anche la fonte di agitazione del sistema, tramite l'interazione con un'ancoretta magnetica dalle dimensioni adeguate posta all'interno del pallone e fatta ruotare con velocità fino a 1500 rpm.

Inizialmente, l'agitazione è ostacolata dalla consistenza solida del cotone. Dopo pochi minuti, tuttavia, avviene un'omogeneizzazione progressiva del contenuto del pallone, fino al termine della reazione in cui si osserva una fase liquida molto viscosa dalla consistenza ad occhio piuttosto omogenea e dal colorito tra il bianco ed il giallo (Figura 2.8).



**Figura 2.7** Setup di due esperimenti di idrolisi.



**Figura 2.8 (A)** Contenuto del pallone prima della reazione di idrolisi; **(B)** prodotto di idrolisi.

#### 2.1.4 Processi di downstream: adattamento alla coltura microalgale

Al termine del processo di idrolisi, il cotone di partenza risulta trasformato in una soluzione acida piuttosto viscosa contenente certamente glucosio proveniente dalla conversione dei polimeri cellulosici idrolizzati, di cui è necessario valutare la concentrazione.

Inevitabilmente, per rimuovere l'intera soluzione viscosa dal pallone, vanno utilizzati alcuni ml di acqua Milli-Q, che costituiscono il primo fattore di diluizione  $FD_{MQ}$  del campione (formula 2.2).

$$FD_{MQ} = \frac{\text{Volume idrolizzato} + \text{volume MilliQ aggiunta}}{\text{Volume idrolizzato}} \quad [2.2]$$

Sia per essere utilizzata come substrato per *G. sulphuraria*, sia per essere analizzata tramite HPLC, questa soluzione ha richiesto di essere portata a pH 2, dal pH iniziale negativo. Questo passaggio è stato effettuato tramite l'aggiunta, poco alla volta per evitare bruschi innalzamenti di temperatura che potrebbero degradare il glucosio presente, di una soluzione basica di NaOH 14 M precedentemente preparata.

Anche questo passaggio si traduce in una diluizione ulteriore del campione, quantificata dal fattore  $FD_{NaOH}$  (formula 2.3).

$$FD_{NaOH} = \frac{\text{Volume iniziale} + \text{Volume di soluzione di NaOH 14M aggiunto}}{\text{Volume iniziale}} \quad [2.3]$$

È da notare che non sempre la procedura ha seguito quest'ordine cronologico. Infatti, tutti i campioni sono stati pretrattati e idrolizzati nelle stesse identiche condizioni, e diluiti con una certa quantità di acqua Milli-Q come primo passaggio dopo la reazione. Tuttavia, non tutti i campioni sono stati successivamente trattati allo stesso modo.

Da letteratura, era infatti consigliato un processo di downstream di qualche tipo che consentisse di separare la soluzione liquida contenente glucosio da eventuali residui solidi nel prodotto di idrolisi, prima della modifica del pH per l'analisi HPLC. Per tale motivo, si distinguono 3 possibili procedure che sono state adottate.

##### 1. FILTRAZIONE (F).

Alcuni campioni sono stati filtrati sotto cappa, con pompa da vuoto collegata a beuta codata con filtro (Boro 3.3, por. 2), conservando la soluzione liquida ottenuta al fondo della beuta. Questa è stata centrifugata per rimuovere ulteriori parti solide, ed il surnatante ottenuto portato a pH 2 con NaOH 14 M, prima di inserirlo in vials per analisi HPLC. La soluzione, ormai a concentrazione nota, è stata conservata in freezer fino al momento di utilizzarla per le colture microalgali, quando è stata scongelata. Più tipi di filtro, sempre in fibra di vetro, sono stati testati nei casi in cui la procedura ha mostrato dei problemi (Figura 2.9).

##### 2. CENTRIFUGAZIONE (CF).

Alcuni campioni sono stati centrifugati a 5000 rpm per 5 minuti per diverse volte (10/15 volte, fino a prelevare quanta più soluzione liquida di glucosio possibile),

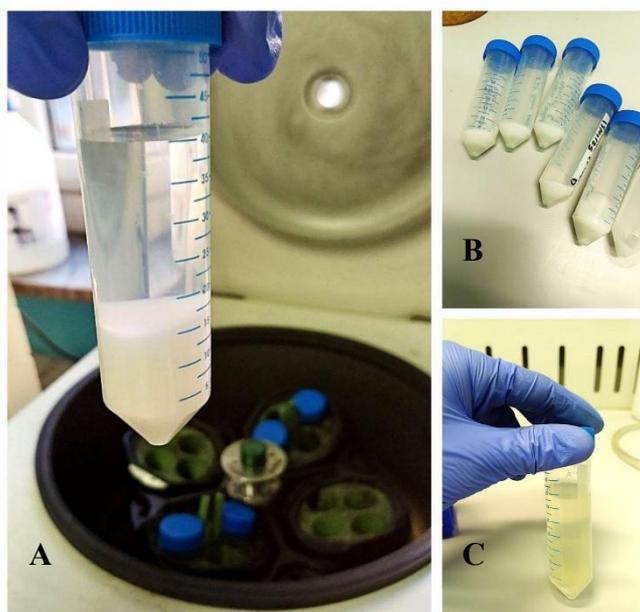
conservando la soluzione liquida ottenuta come surnatante. Questa è stata portata a pH 2 con NaOH 14 M e poi inserita in vials per analisi HPLC. La soluzione, ormai a concentrazione nota, è stata conservata in freezer fino al momento di utilizzarla per le colture microalgali, quando è stata scongelata (Figura 2.10).

### 3. NESSUN PROCESSO DI DOWNSTREAM (NP).

Alcuni campioni non sono stati sottoposti ad alcun processo di downstream. L'intera soluzione, contenente tutte le possibili impurità solide, è stata analizzata in HPLC introducendo NaOH 14 M solamente nelle vials, e conservata in freezer con la minor diluizione possibile. Inevitabilmente, infatti, le operazioni di filtrazione o centrifugazione richiedono un'ulteriore diluizione con acqua per funzionare correttamente, che abbassa la concentrazione finale di ciò che va utilizzato come fonte di glucosio per *G. sulphuraria*, prospettiva non gradita. Inoltre, a causa di un'efficienza non unitaria, trattengono nella fase solida separata anche parte della soluzione liquida di glucosio perduta, di cui si vorrebbe invece ottenere la maggior quantità possibile per le colture. Per tale motivo, è stata sperimentata anche questa via, in cui il campione idrolizzato è stato conservato tal quale in freezer, e solo una volta scongelato è stato addizionato con NaOH 14 M per l'utilizzo dell'intera sostanza (viscosa e contenente oligomeri non perfettamente idrolizzati) all'interno delle colture algali a pH 2 come fonte di nutrimento.



**Figura 2.9** Filtri utilizzati e configurazione testata.



**Figura 2.10** (A) Campione centrifugato; (B) fase solida di fondo; (C) fase liquida surnatante.

In tutti i casi, prima di inserire le soluzioni da analizzare nelle vials per HPLC, queste sono state filtrate (filtri per siringhe SPHEROS PES 0.45  $\mu\text{m}$ , diametro 25 mm, sterili) attraverso siringa.

Alla luce della descrizione effettuata della procedura, è possibile comunque notare che, a prescindere dall'ordine cronologico delle operazioni, in ogni caso qualunque campione di prodotto idrolizzato è stato diluito, in misura diversa, secondo i fattori  $FD_{\text{MQ}}$  e  $FD_{\text{NaOH}}$  citati in precedenza prima di essere utilizzato per la coltura microalgale. È impossibile, dunque, utilizzare una soluzione con la concentrazione elevata di glucosio ottenuta al termine del processo di idrolisi, ma solo una diluita rispetto ad essa.

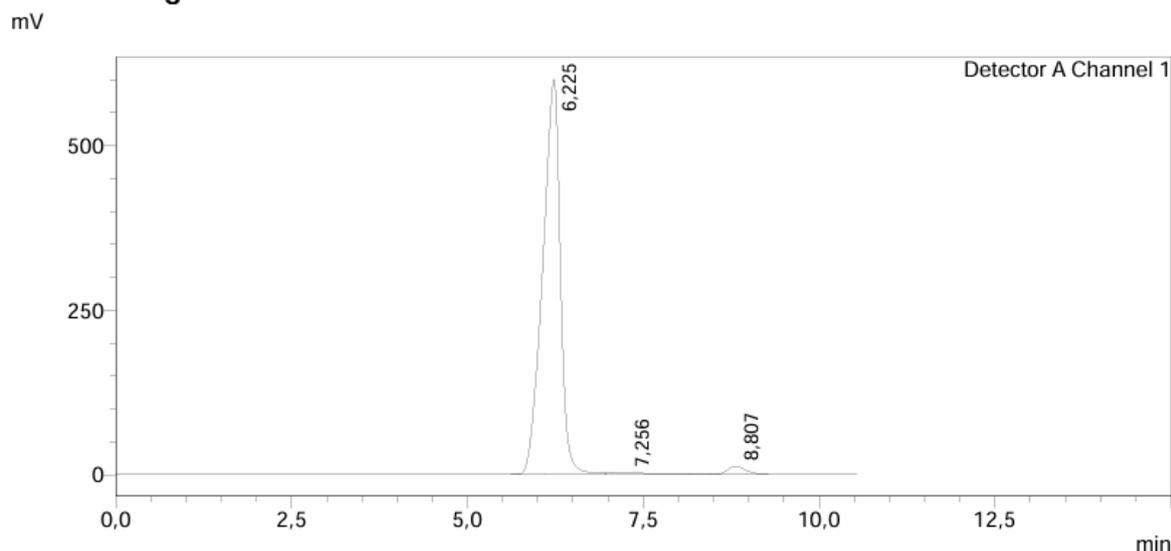
L'unico altro fattore di diluizione da considerare è stato quello  $FD_v$  relativo alla diluizione effettuata all'interno delle singole vials analizzate in HPLC. In tutti i casi, infatti, per verifica della correttezza dei risultati, sono stati inviati contemporaneamente duplicati o triplicati di vials dello stesso campione ma preparate con diversa diluizione (formula 2.4).

$$FD_v = \frac{\text{Volume campione in vial} + \text{volume MilliQ in vial}}{\text{Volume campione in vial}} \quad [2.4]$$

Le concentrazioni ottenute sono state calcolate usando la retta di taratura descritta in Appendice C, utilizzando nella produttoria di FD solamente il fattore  $FD_v$ . Gli altri fattori di diluizione, se inclusi nella produttoria, permettono invece di calcolare, con un procedimento a ritroso, la concentrazione approssimativa che era stata ottenuta con l'idrolisi acida, prima di tutte le diluizioni, e che sarebbe teoricamente utilizzabile in un altro processo in cui non sia necessario diluire con NaOH ed acqua Milli-Q come purtroppo avviene in questo caso.

Solo a titolo di esempio, si riporta in Figura 2.11 un cromatogramma ottenuto da HPLC, in cui si nota la presenza di anche ulteriori picchi di rilevanza oltre a quello del glucosio a 8,8 minuti, probabilmente legati alla presenza di sali in soluzione.

### <Chromatogram>



**Figura 2.11** Esempio di cromatogramma per le soluzioni analizzate. Si nota un intenso picco a tempi inferiori a quello di eluizione del glucosio, probabilmente dovuto alla presenza di sali.

La Tabella 2.2 riassume tutte le condizioni utilizzate ed i risultati ottenuti per ciascun campione di cotone che è stato trattato nelle maniere descritte finora.

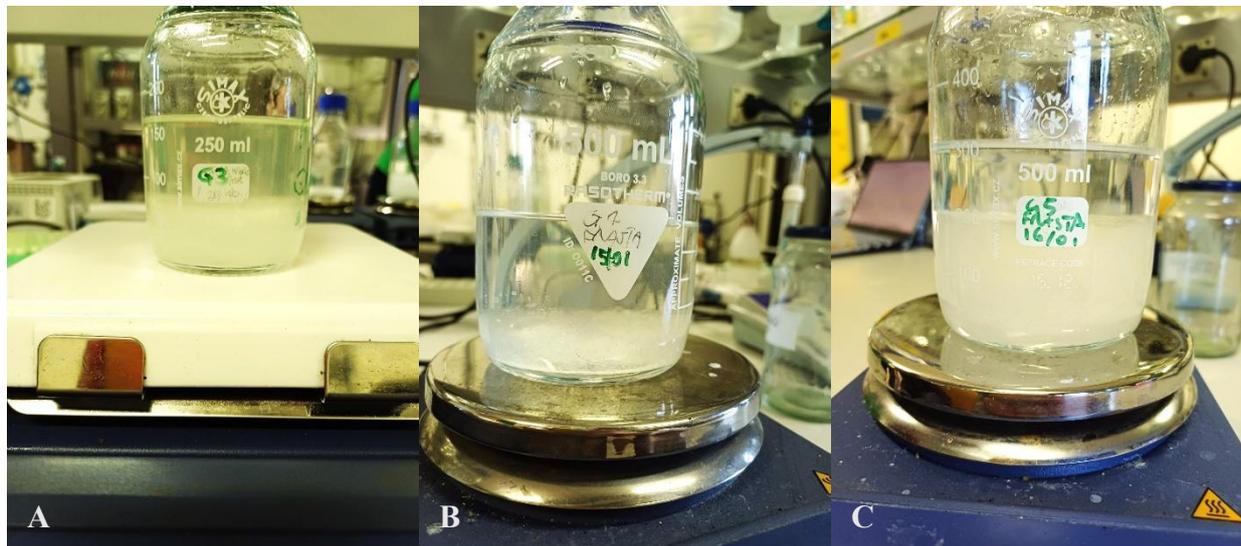
**Tabella 2.2** Caratteristiche delle soluzioni di glucosio ottenute.

	<b>Downstream</b>	<b>FD<sub>MQ</sub></b>	<b>FD<sub>NaOH</sub></b>	<b>Conc. glucosio ottenuta</b>	<b>Volume totale ottenuto</b>
<b>G1</b>	F	1,1	1,83	0,55 g/L	80 ml
<b>G2</b>	F/CF	/	/	0,31 g/L	/
<b>G3</b>	CF	2,33	1,5	3,9 g/L	165 ml
<b>G4</b>	CF	3	1,37	0,82 g/L	250 ml
<b>G5</b>	CF	4	1,25	0,91 g/L	310 ml
<b>G6</b>	NP	1,285	/	8,3 g/L	55 ml
<b>G7</b>	NP	1,209	/	2,45 g/L	83 ml

In particolare, per ogni campione sono riportati:

- il processo di downstream utilizzato (F, CF, NP) a valle della reazione di idrolisi;

- il fattore di diluizione  $FD_{MQ}$ , relativo all'aggiunta di acqua Milli-Q che ha diluito il contenuto di glucosio;
- il fattore di diluizione  $FD_{NaOH}$ , relativo all'aggiunta di NaOH per portare a pH 2;
- la concentrazione di glucosio della soluzione finale ottenuta, dopo tutte le manipolazioni;
- il volume finale di soluzione ottenuta con la suddetta concentrazione (Figura 2.12).



**Figura 2.12** (A) Campione G3; (B) campione G4; (C) campione G5. I campioni ottenuti con centrifugazione risultano liquidi nell'immediato, ma dopo essere stati congelati e scongelati contengono cristalli in sospensione, probabilmente sali formati dopo l'aggiunta di idrossido di sodio.

In Tabella 2.3, invece, è riportata la resa di ciascun processo, calcolata secondo la formula 2.1.

**Tabella 2.3** Rese in glucosio da cotone.

G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
0,89%	/	12,8%	4%	5,6%	9,11%	4,1%

Le rese, come osservabile, sono state in tutti i casi piuttosto basse, soprattutto per il primo campione trattato con acido solforico al 40%.

### 2.1.5 Soluzione di glucosio utilizzata per colture microalgali (GLUC1)

Gli esperimenti di coltura di microalghie effettuati, descritti all'interno della sezione 2.3.2, hanno richiesto concentrazioni di glucosio di 3 g/L.

Per tale motivo, tra le soluzioni di glucosio ottenute tramite idrolisi, le uniche utilizzabili senza ricorrere a procedure di concentrazione decisamente dispendiose, erano quelle con concentrazioni di glucosio superiori a 3 g/L, facilmente diluibili all'occorrenza.

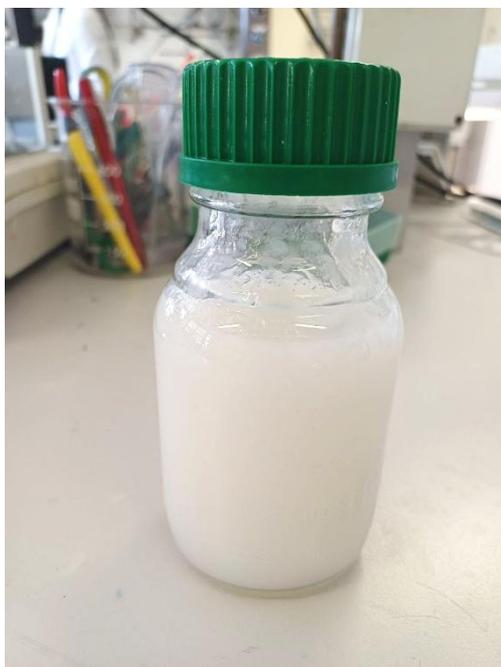
Alla luce di ciò, sono state utilizzate solamente le soluzioni G3 e G6.

Come evidenziato da Tabella 2.2:

- G3: 165 ml totali di soluzione contenente glucosio a 3,9 g/L, centrifugata, già addizionata con NaOH e portata a pH 2.
- G6: 55 ml totali di soluzione contenente glucosio a 8,3 g/L, non centrifugata né addizionata con NaOH. Viscosa (contenente residui solidi non separati) e troppo acida.

Le due soluzioni sono state miscelate, ottenendo 220 ml di soluzione a 5 g/L, e poi addizionate con 35 ml di NaOH per portare il pH su valori prossimi a 2. In questo modo, la soluzione finale ottenuta, denominata GLUC 1 (Figura 2.13), presentava le seguenti caratteristiche:

- Volume totale disponibile: 255 ml
- Concentrazione di glucosio: 4,31 g/L
- Consistenza liquida leggermente viscosa, con presenza di residui solidi provenienti da G6



**Figura 2.13** Soluzione GLUC1.

La soluzione GLUC1 è stata utilizzata per gli esperimenti di coltura microalgale descritti alla sezione 2.3.2.

## 2.2 *Condizioni di mantenimento delle colture microalgali*

### 2.2.1 Ceppo utilizzato

Il ceppo microalgale utilizzato è stato in tutti i casi *Galdieria sulphuraria* SAG 108.79, prelevato dalla collezione di colture algali dall'università di Gottingen (SAG). Si tratta di un

ceppo wild type, non modificato geneticamente, proveniente da sorgenti calde all'interno del Parco Nazionale di Yellowstone, in Wyoming.

### 2.2.2 Terreno di coltura

In tutti gli esperimenti effettuati, oltre che durante la fase di mantenimento, il ceppo algale è stato immerso in terreno liquido. In particolare, è stato usato un medium di Allen modificato (AMM) (Appendice B).

Si tratta di un terreno usato per colture microalgali, adattato alla crescita di *G. sulphuraria*: ha una composizione media tale da fornire tutti i nutrienti essenziali necessari (Appendice B) per crescere in modalità fotoautotrofica. Richiede ovviamente l'aggiunta di una fonte organica di carbonio come macronutriente, in questo caso il glucosio, nel caso in cui destinato a test per coltivazioni mixotrofiche. Il carbonio rappresenta infatti uno degli elementi principali in *Galdieria*, in percentuali di circa il 48% del peso secco (Abiusi et al., 2024): è fondamentale la presenza di glucosio.

Importante è anche la presenza di altri elementi come azoto e fosforo, e di sodio, zolfo, magnesio, calcio e potassio, come per qualunque essere vivente. Per tale motivo, all'interno del terreno si trovano diversi sali, tra cui più di una specie di solfati. In particolare, sono presenti  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{KCl}$ .

I micronutrienti, presenti in bassissime concentrazioni, sono presenti come tracce di  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

AMM è sempre stato preparato e conservato all'interno di bottiglie di vetro borosilicato 3.3 con tappo, in quantità di 2 L alla volta o meno, in base alle necessità (Figura 2.14).

La sua preparazione prevede l'aggiunta dei vari componenti nelle quantità previste, solubilizzati in acqua distillata. Per facilitare la solubilizzazione, tutti i componenti sono conservati non in forma solida ma in stocks già diluiti in acqua distillata, ciascuno con una diversa concentrazione (nettamente più elevata di quella necessaria nel terreno), all'interno di provette Falcon da laboratorio da 50 ml o bottiglie in vetro da 500 ml (Figura 2.14). L'aggiunta dei giusti volumi di ciascuno stock permette la costituzione di nuovo terreno nel volume finale desiderato.

L'unica accortezza ulteriore nella preparazione del terreno, oltre alla corretta misurazione delle quantità, è data dalla misurazione del pH alla fine della preparazione, e dal suo eventuale aggiustamento con aggiunta di poche gocce di soluzione di acido solforico al 10%. Questo passaggio è necessario per garantire che AMM, quando utilizzato, presenti un pH quanto più possibile prossimo a 2, valore ottimale per la crescita di *G. sulphuraria*.



**Figura 2.14** Bottiglia contenente il terreno AMM in fase di conservazione e provette Falcon contenenti stocks di reagenti per prepararlo.

### 2.2.3 Altri reagenti

Oltre alle specie chimiche presenti all'interno del terreno di coltura ed alla biomassa microalgale in sé, nel processo di coltivazione di *G. sulphuraria* sono state coinvolte le seguenti sostanze di interesse:

- Aria (atmosfera gassosa non trattata). Non è stato adoperato alcun reagente gassoso particolare. Come descritto all'interno della sezione 2.3.1, le alghe hanno avuto libero accesso (a meno di un tappo munito di filtro contro impurità solide) ad un'atmosfera gassosa non controllata in alcun modo, in cui sicuramente le componenti principali erano ossigeno ed azoto. È da notare, dunque, che poiché la via metabolica da testare era quella mixotrofica, in nessun caso è stato previsto un apporto controllato di anidride carbonica ma solo di fonti organiche. La CO<sub>2</sub> eventualmente utilizzata da *G. sulphuraria* negli esperimenti come fonte carboniosa oltre al glucosio è stata solo quella presente nell'aria.
- Acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). In basse concentrazioni (soluzione al 10% w/v) è stato utilizzato come misura di sicurezza, al posto dell'acqua distillata per sopperire all'evaporazione di sostanza liquida, in quei casi in cui si è sospettato che potesse esserci presenza di contaminazioni batteriche, al fine di debellarle abbassando il pH della coltura.
- Idrossido di sodio. In alcuni casi, al termine della preparazione delle beute per gli esperimenti con glucosio tessile (sezione 2.3.2), è stato notato un pH al loro interno sensibilmente inferiore a 2. Per ovviare a tale inconveniente, prima di far partire gli esperimenti, sono stati aggiunti pochi ml di soluzione di NaOH 6 M all'interno della soluzione di terreno, glucosio e microalghe.
- Glucosio di origine tessile (GT). Sono state utilizzate soluzioni di glucosio a diverse concentrazioni, ottenute da cotone pretrattato con soluzione di NaOH ed urea, idrolizzato con acido solforico e portato a pH 2 con soluzione di NaOH. In alcuni casi la soluzione di glucosio è stata ulteriormente sottoposta a processi di downstream che ne hanno rimosso la parte solida, in altri si è utilizzata direttamente come nutrimento per le alghe la miscela densa prodotta

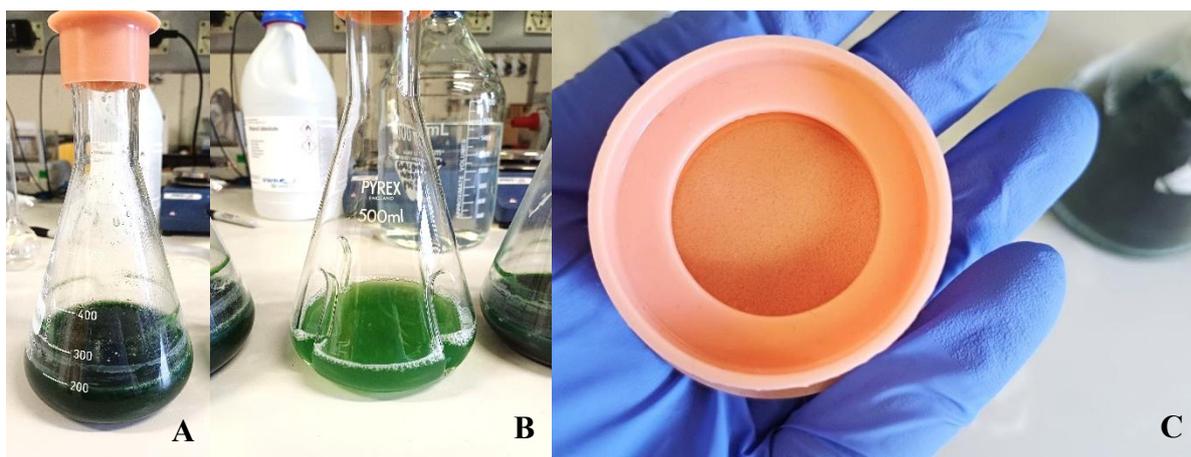
dall'idrolisi, ancora contenente residui solidi. Maggiori dettagli a riguardo sono contenuti nella sezione 2.1, in cui viene descritto con precisione il processo che è stato adottato per ottenere queste fonti di nutrimento per *G. sulphuraria*.

- Glucosio di origine sintetica (GS). Glucosio (glucosio-D-(+)  $\geq 99,5\%$  w/w, Sigma) conservato in forma solida e disciolto nel terreno per ottenere le concentrazioni volute.

#### 2.2.4 Descrizione delle condizioni di coltura di mantenimento

Il ceppo selezionato, durante le fasi di mantenimento al di fuori degli esperimenti, è stato conservato, vitale, all'interno del terreno AMM (Appendice B).

In particolare, è stato posto in beute in vetro borosilicato 3.3 dalla capienza di 250 o 500 ml, alcune con pareti lisce ed altre con presenza di deflettori sulle pareti al fine di mantenere un miglior regime di agitazione (Figura 2.15). Queste, munite di tappo permeabile ad azione filtrante verso corpi solidi, e riempite per non più di un terzo della loro capienza (non più di circa 100-150 ml di terreno in ciascuna beuta), sono state poste all'interno di un incubatore (Esco OrbiCult™ Incubator Benchtop Shaker) riscaldato a 42°C ed alla velocità di agitazione di 150 rpm, ancorate al fondo del macchinario tramite tappetini adesivi (Figura 2.16 A).



**Figura 2.15** (A) Beuta da 500 ml senza deflettori; (B) beuta da 500 ml con deflettori; (C) tappo filtrante.

L'incubatore, esposto alla luce diretta di una lampada puntata su di esso per 24 ore al giorno, 7 giorni su 7, continuamente, costituisce l'ambiente all'interno del quale le colture sono rimaste in modalità di crescita fotoautotrofica, senza apporto controllato di CO<sub>2</sub> ma solo utilizzando le quantità presenti nell'aria riscaldata a cui hanno avuto accesso (Figura 2.16 B).



**Figura 2.16** (A) Posizionamento su tappetini adesivi delle beute nell'incubatore; (B) incubatore illuminato in funzione.

### 2.3 Soluzione reattoristiche adottate

I test effettuati in maniera controllata e riproducibile, a partire dalle colture mantenute in incubatore, sono stati solamente in modalità di crescita mixotrofica. Non sono stati svolti esperimenti in fotoautotrofia o in eterotrofia, che non sono state considerate vie metaboliche d'interesse per l'indagine svolta in questa Tesi, e per le quali tra l'altro sono disponibili maggiori fonti bibliografiche di riferimento già esistenti (Abiusi et al., 2024, 2021, 2020; Oesterhelt et al., 2007; Pleissner et al., 2023; Proietti Tocca et al., 2024; Retta et al., 2024; Ruiz et al., 2022).

Tutti i test sono stati in modalità batch, in ambiente acido a pH quanto più prossimo a 2, con campionamenti nel tempo per valutare l'evoluzione temporale del ceppo microalgale.

Come primo passaggio, sono state testate le prestazioni di crescita del ceppo microalgale in risposta alla presenza di glucosio di origine sintetica GS (glucosio-D-(+)  $\geq 99,5\%$  w/w, Sigma) introdotto nel mezzo di coltura e facilmente accessibile per i microrganismi.

I risultati di questo esperimento di crescita sono poi stati utilizzati come riferimento per effettuare confronti con la seconda tipologia di esperienza portata avanti: quella in cui le microalghe sono state coltivate con glucosio di origine tessile GT come substrato organico (ottenuto per idrolisi come descritto in sezione 2.1). Questa coltura è quella di interesse ai fini della Tesi, rispetto alla prima che invece ha solo valore di confronto.

#### 2.3.1 Test in mixotrofia con glucosio di origine sintetica (GS)

Tra le beute contenenti colture di mantenimento all'interno di incubatore (come descritto alla sezione 2.2.4), una è stata selezionata arbitrariamente come inoculo per l'esperienza. Questa è stata addizionata, tre giorni prima della campagna di raccolta dati, con circa 20 ml di soluzione di glucosio (glucosio-D-(+)  $\geq 99,5\%$  w/w, Sigma) in concentrazione di 5 g/L, in modo da favorire l'adattamento del ceppo alla presenza di glucosio nel terreno e praticamente eliminare la fase di latenza per la campagna di raccolta dati successiva.

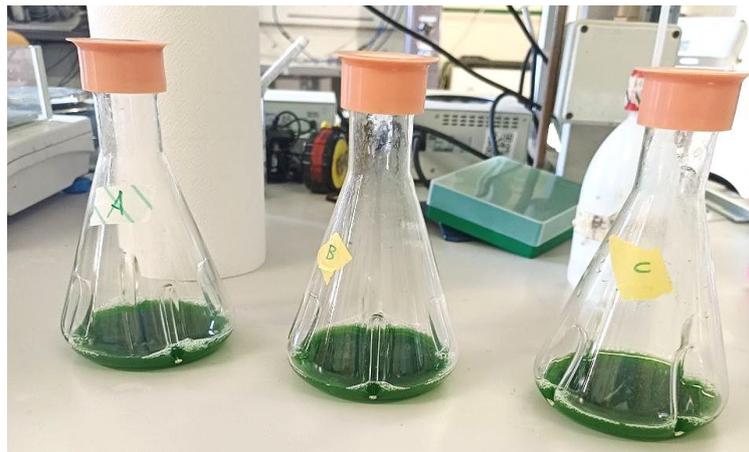
La raccolta dei dati è avvenuta, a partire da tre giorni dopo l'inserimento del glucosio di adattamento, su tre diversi replicati biologici. Tutti i replicati provenivano dallo stesso inoculo di partenza, diluito tramite terreno AMM (Appendice B) ed addizionato con GS in polvere.

Le quantità di inoculo microalgale, terreno liquido e glucosio in polvere adoperate sono state valutate, in base alla densità ottica valutata a 750 nm dell'inoculo di partenza, in modo da ottenere tre replicati biologici con le caratteristiche di partenza riportate in Tabella 2.4.

**Tabella 2.4** Condizioni utilizzate per l'avvio di colture microalgali con GS.

VOLUME	CONCENTRAZIONE GLUCOSIO	OD <sub>750</sub>
100 ml	3 g/L	1

Ciascun replicato biologico da 100 ml è stato posto all'interno di una beuta in vetro borosilicato 3.3 con deflettori sulle pareti dalla capienza massima di 500 ml, munita di tappo permeabile ad azione filtrante verso corpi solidi (Figura 2.17), precedentemente sterilizzata tramite autoclave (Savatec modello 760).



**Figura 2.17** Triplicato biologico delle colture inoculate per esperimenti con GS.

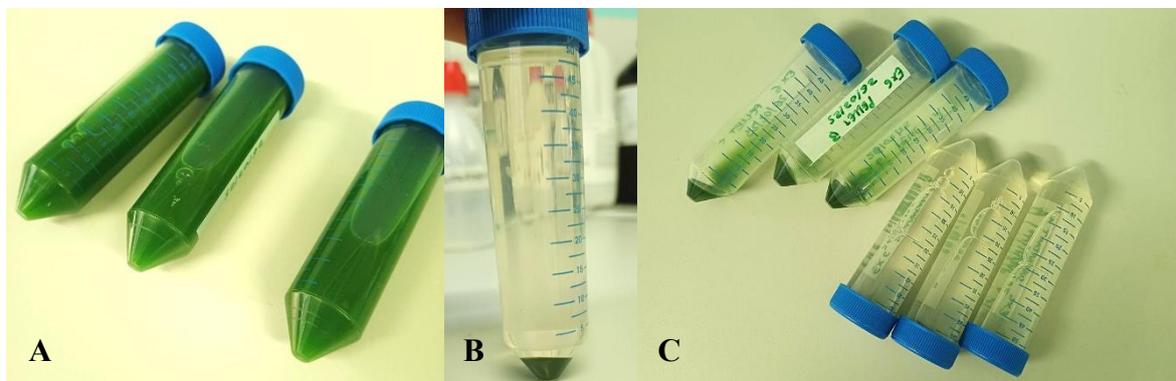
Le beute sono state inserite all'interno di incubatore (Environmental Shaker-Incubator ES-20/60, BioSan), poste su tappetini adesivi, e mantenute in agitazione alla velocità di 150 rpm alla temperatura di 42°C. L'illuminazione, durante l'esperimento, è stata garantita da un sistema di 4 lampade fluorescenti (EnviroGro by LUMii T5 TLED), acceso per 24 ore al giorno e posto esternamente a contatto con l'oblò dell'incubatore, il più vicino possibile (Figura 2.18).



**Figura 2.18** Oblò dell'incubatore: le beute sono posizionate il più vicino possibile alla lampada poggiata sull'incubatore.

Durante gli esperimenti, le beute sono state prelevate dall'incubatore solo per i pochi minuti necessari ai prelievi dei campioni da analizzare, effettuati con rigorosità ma non al di sotto di alcun tipo di cappa.

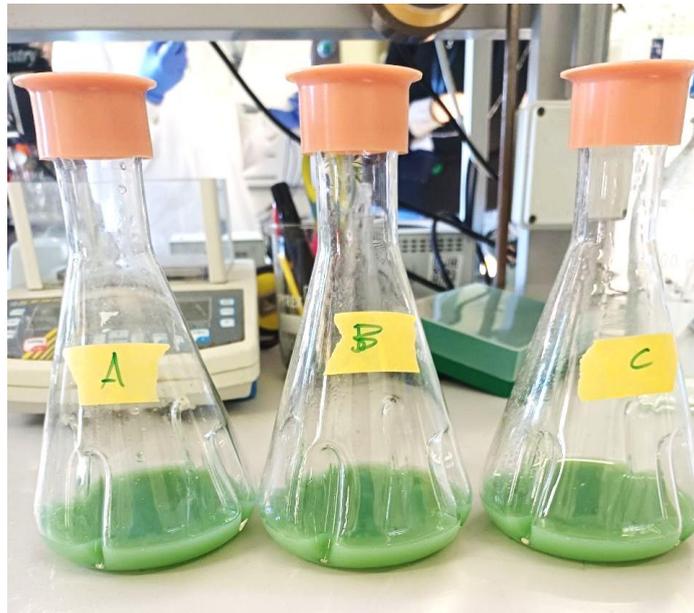
Al termine dell'esperimento, il loro contenuto è stato raccolto e centrifugato per 10 minuti a 5000 rpm. Il liquido surnatante è stato analizzato tramite HPLC per conferma della concentrazione di glucosio, mentre la biomassa solida al fondo è stata lavata 2 volte con acqua Milli-Q e ricentrifugata, per conservare infine un pellet di biomassa solida lavata su cui poter effettuare analisi elementari di tipo CHNS(O) e dei profili amminoacidici e proteici (Figura 2.19). Queste analisi non sono tuttavia state effettuate per i motivi descritti all'interno del capitolo 3 dei risultati.



**Figura 2.19** (A) Campione raccolto; (B) separazione delle fasi; (C) fase liquida e pellet solido lavato.

### 2.3.2 Test in mixotrofia con soluzione di glucosio da idrolisi (GT)

Analogamente ai test con glucosio sintetico, anche quelli con glucosio ottenuto tramite idrolisi di scarti tessili sono stati in triplicato biologico, in beute sterilizzate poste in incubatore a 42°C ed agitate a 150 rpm, con la stessa illuminazione, preparate a partire da un inoculo adattato alla presenza di glucosio tramite aggiunta preliminare di questo in piccole quantità (circa 25 ml di soluzione a 5 g/L addizionati nella beuta di inoculo quattro giorni prima della raccolta dati) (Figura 2.20).



**Figura 2.20** Triplicato biologico di partenza per esperimenti con GT. Il colore è visibilmente diverso, nonostante le concentrazioni iniziali siano le stesse, a causa della torbidità della soluzione GLUC1.

Anche in questo caso, le condizioni di partenza sono state di 100 ml totali in ciascuna beuta, con concentrazione di 3 g/L di glucosio e OD<sub>750</sub> pari a 1.

L'unica differenza rispetto all'esperimento con glucosio sintetico consiste nella fonte di substrato organico utilizzata. In particolare, non è stato utilizzato GS in polvere addizionato alla soluzione liquida di terreno ed inoculo.

All'inoculo è stata infatti addizionata, in questo caso, la soluzione liquida GLUC1 (sezione 2.1), proveniente da idrolisi di campioni di cotone e contenente glucosio in concentrazione, rilevata tramite HPLC, pari a 4,31 g/L.

Sulla base di questa concentrazione, dunque, sono state calcolate anche le quantità relative di inoculo e terreno necessarie per avere le condizioni iniziali precedentemente descritte, da aggiungere per diluire GLUC1 e raggiungere una concentrazione di partenza di 3 g/L di glucosio.

In questo esperimento, inoltre, non è stato aggiunto terreno AMM già preparato in precedenza. I nutrienti che lo costituiscono sono invece stati alimentati direttamente dagli stocks conservati, nelle quantità necessarie ad avere le giuste concentrazioni all'interno delle beute, considerando che la gran parte del liquido è costituita stavolta dalla soluzione di glucosio,

in cui i nutrienti non sono presenti e la cui assenza va compensata per garantire la crescita del ceppo in condizioni ottimali.

Per i motivi descritti all'interno del capitolo 3 dei risultati, non è stato possibile effettuare la raccolta della biomassa al termine dell'esperimento.

## 2.4 Procedure di raccolta dei dati

### 2.4.1 Osservazione al microscopio

L'osservazione al microscopio ottico non è stata adoperata come procedura di rilevanza per la quantificazione della biomassa microalgale.

L'unico utilizzo che ne è stato fatto è stato nell'ambito di verifiche qualitative di contaminazione dei campioni. Saltuariamente, solo quando fosse ragionevole immaginare che potesse essere avvenuta contaminazione dei campioni in base alle operazioni effettuate, l'osservazione al microscopio è stata utile per notare l'assenza di contaminazioni di rilievo da parte di specie biologiche diverse dal ceppo di *G. sulphuraria*.

### 2.4.2 Valutazione della concentrazione di biomassa microalgale tramite misura del peso secco

Le curve di crescita nel tempo di *G. sulphuraria* sono state costruite grazie alle misure del peso secco effettuate.

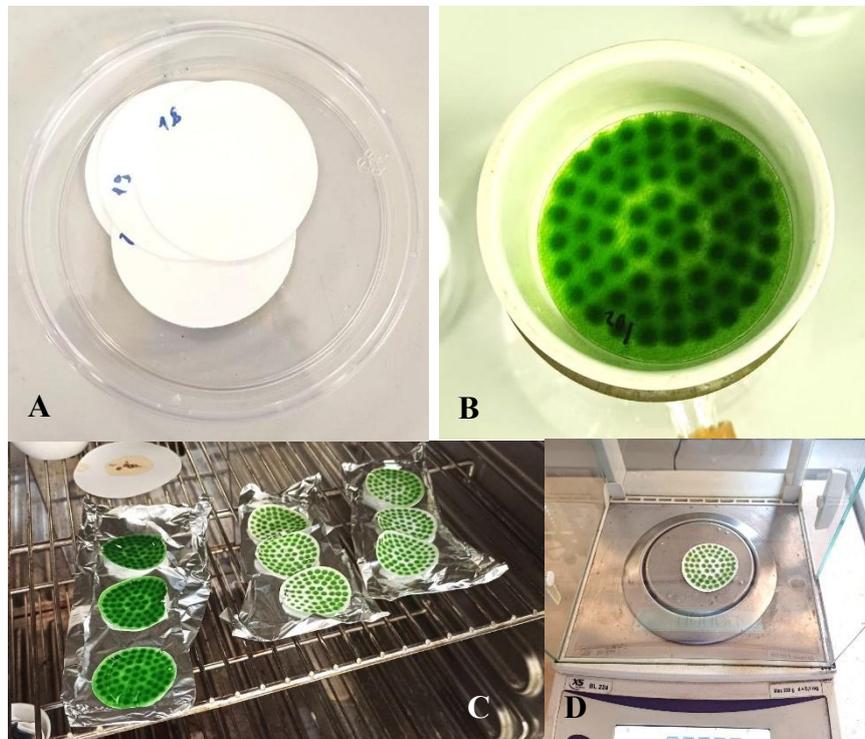
Ad intervalli di alcune ore (almeno 4) l'uno dall'altro, campioni da pochi ml (tra 2 e 10 ml) estratti direttamente dalla soluzione liquida contenente alghe, terreno e glucosio sono stati diluiti in meno di 30 ml di acqua distillata e poi filtrati sottovuoto per mezzo di pompa da vuoto collegata a beuta codata (Figura 2.21), attraverso filtri in fibra di vetro da 0,22  $\mu\text{m}$  (filtri ARTIGLASS in microfibra di vetro senza legante, diametro 47 mm) precedentemente essiccati e pesati come tara (Figura 2.22 A).



**Figura 2.21** Procedura di filtrazione dei campioni.

A seguire, i filtri ricoperti dal deposito di biomassa umida sono stati essiccati per almeno 2 ore in stufa a 105°C, e successivamente pesati (Figura 2.22 B, C, D).

Dal confronto su microbilancia di precisione tra il peso rilevato e quello di tara del filtro è stata ottenuta la massa netta di biomassa depositata e, noto il volume del campione prelevato, la concentrazione di biomassa all'interno della soluzione (DW, g/L).



**Figura 2.22** (A) Filtri essiccati da tara; (B) filtro umido con biomassa appena depositata; (C) filtri posti ad essiccare in stufa; (D) misurazione del peso secco.

#### 2.4.3 Valutazione della concentrazione di biomassa microalgale tramite spettrofotometria

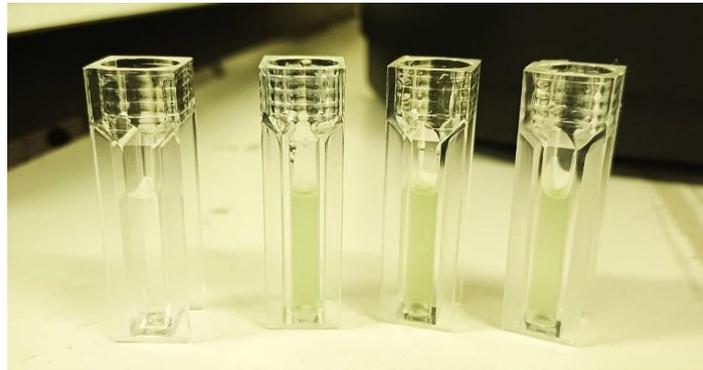
Ulteriori misure quantitative della concentrazione di biomassa delle stesse soluzioni contenenti alghe sono state ottenute tramite l'utilizzo di spettrofotometro (HACH LANGE DR5000 Spectrophotometer), impostato sulla misura della densità ottica per singola lunghezza d'onda pari a 750 nm ( $OD_{750}$ ), scelta in base a riferimenti consultati che pure facevano uso di questa impostazione del macchinario per la stessa specie microalgale (Abiusi et al., 2022a, 2021).

Si tratta senza dubbio di una misura meno precisa rispetto a quella del peso secco, tuttavia essendo molto più rapida è stata spesso utilizzata durante il lavoro per quantificare almeno approssimativamente la concentrazione di biomassa all'interno della soluzione. Tipicamente, il rapporto tra l'effettiva concentrazione di biomassa di *G.sulphuraria* all'interno della soluzione (espressa in g/L) e la misura di  $OD_{750}$  è circa pari a 0,6 o comunque inferiore all'unità (Abiusi et al., 2021).

Alla luce di ciò, anche tramite l' $OD_{750}$  si può avere un'idea di massima della concentrazione o comunque monitorare almeno qualitativamente trend di crescita o di

stazionarietà nel tempo. Ad esempio, è stato descritto l'utilizzo che è stato fatto di misure di OD<sub>750</sub> come definizione rapida delle condizioni iniziali di crescita per gli esperimenti (sezione 2.3.1).

Lo strumento è sempre stato preliminarmente tarato sulla rilevazione (alla stessa lunghezza d'onda di 750 nm) della concentrazione nulla di glucosio in una cuvetta da 1 ml di acqua distillata usata come "bianco" (Figura 2.23).



**Figura 2.23** Cuvette da 1 ml. A sinistra, il bianco contenente solo acqua distillata. A destra, tre campioni diluiti.

Solo nel caso di esperimenti con GT, il campione di bianco è stato preparato non con acqua distillata ma con la soluzione di glucosio e terreno.

Quando necessario, i campioni analizzati sono stati posti in cuvette per l'analisi non tali ma diluiti preliminarmente con acqua distillata, al fine di ricadere sempre in un range di rilevazione di OD<sub>750</sub> ritenuto affidabile (0,3 – 0,8 circa). Per ottenere il valore di OD<sub>750</sub> reale, è bastato poi moltiplicare la misura della macchina, ottenuta come output in un range di concentrazioni affidabile, per il fattore di diluizione utilizzata.

#### 2.4.4 Valutazione della concentrazione di glucosio tramite analisi cromatografica

Al fine di valutare il consumo nel tempo del glucosio da parte di *G.sulphuraria*, sono stati usati campioni da pochi ml (tra 2 e 4), prelevati dalla soluzione di coltura ad intervalli di alcune ore (almeno 4) l'uno dall'altro.

Questi sono stati sottoposti a centrifugazione a 5000 rpm per 10 minuti all'interno di Falcon dalla capienza di 15 ml, ed è stato conservato in freezer, anche per mesi, solamente il liquido surnatante. Non è stato conservato invece il residuo di fondo, costituito principalmente da un pellet di biomassa algale (Figura 2.24).



**Figura 2.24** Separazione delle fasi.

I campioni di liquido sono poi stati filtrati (attraverso filtri per siringhe SPHEROS PES 0.45  $\mu\text{m}$ , diametro 25 mm, sterili) ed analizzati tramite HPLC (Appendice C), in vials dal volume massimo di 1,5 ml (Figura 2.25). Nessuno di essi è stato diluito in alcuna maniera.



**Figura 2.25** Vials preparate per analisi HPLC.

In questo modo, è stato possibile valutare a diversi istanti temporali la concentrazione di glucosio all'interno della soluzione.

## 2.5 Metodi di elaborazione dei dati raccolti

### 2.5.1 Utilizzo delle misure di peso secco

Le misure di peso secco sono state utilizzate per valutare quantitativamente l'aumento di biomassa microalgale nel tempo. Grazie ai dati raccolti è stato possibile, infatti, costruire le curve di crescita nel tempo riportate all'interno della sezione 3.1 dei risultati (Figura 2.26).



**Figura 2.26** Variazione di colore dei filtri col passare del tempo, dovuta all'aumento della concentrazione di biomassa.

A partire da questi valori, inoltre, sono stati calcolati parametri come la velocità di crescita massima (formula 2.5), il tempo di duplicazione (formula 2.6), la resa massima e media di biomassa microalgale (formula 2.7), la produttività massima e media di biomassa microalgale (formula 2.8), l'efficienza di utilizzo del carbonio (formula 2.9).

### 2.5.2 Utilizzo delle misure spettrofotometriche e correlazione con peso secco

Come anticipato, le misure spettrofotometriche non sono state ritenute affidabili quanto quelle di peso secco per la valutazione dei parametri utili alla caratterizzazione dell'efficienza del processo. Sono state invece più spesso utilizzate per ottenere in brevissimo tempo indicazioni più qualitative che quantitative sull'andamento degli esperimenti.

Come descritto all'interno della sezione 2.3, spesso le misure tramite spettrofotometro sono servite per individuare rapidamente il valore di  $OD_{750}$  da cui far partire l'esperimento, confidando poi nelle altre misure più precise per le rilevazioni successive da cui estrapolare i risultati da analizzare.

È stato comunque effettuato un confronto tra le misure di peso secco e di  $OD_{750}$ , col fine di comprendere se esista una correlazione proporzionale secondo un coefficiente attendibile, verificando il rapporto circa pari a 0,6 citato alla sezione 2.4.3.

### 2.5.3 Utilizzo delle misure cromatografiche

Non è stato effettuato nessun tipo di diluizione sui campioni prima dell'analisi cromatografica. Ottenuti dall'analisi i risultati delle concentrazioni di glucosio a diversi istanti temporali, sono state costruite le curve di consumo di glucosio nel tempo riportate all'interno della sezione 3.1.

Inoltre, i dati ottenuti sono stati utili per il calcolo di parametri di resa massima e media di biomassa microalgale (formula 2.7), ed efficienza di utilizzo del carbonio (formula 2.9).

### 2.5.4 Calcolo dei parametri di processo

Per valutare la velocità massima di crescita  $\mu_{MAX}$  ( $h^{-1}$ ) delle microalghe, è stata utilizzata la formula 2.5, in cui  $X_{0,exp}$  e  $X_{f,exp}$  sono le concentrazioni di biomassa (g/L) rispettivamente all'istante iniziale  $t_0$  e finale  $t_f$  della fase di crescita esponenziale osservata.

$$\mu_{MAX} = \frac{\ln(X_{f,exp}) - \ln(X_{0,exp})}{t_f - t_0} \quad [2.5]$$

Per il calcolo del tempo di duplicazione ( $h$ ) si è fatto ricorso alla formula 2.6:

$$t_{DUPL} = \frac{\ln 2}{\mu_{MAX}} \quad [2.6]$$

La formula 2.7 è stata utilizzata per il calcolo delle rese di biomassa microalgale rispetto al glucosio alimentato ( $Y_{X/S}$ ), in g/g<sub>GLUC</sub>. In essa,  $S_0$  e  $X_0$  rappresentano rispettivamente la concentrazione iniziale di glucosio e di biomassa, mentre  $S(t)$  e  $X(t)$  quelle al tempo del campionamento effettuato durante la coltivazione. In questo studio,  $Y_{X/S_{MAX}}$  è stata valutata come la resa massima per ogni prova sperimentale mentre  $Y_{X/S_{END}}$  rappresenta la resa media al termine di ogni prova.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{(X(t) - X_0)}{(S_0 - S(t))} \quad [2.7]$$

La produttività di biomassa microalgale in g L<sup>-1</sup> giorno<sup>-1</sup> è stata determinata per mezzo della formula 2.8 ( $t$  a denominatore espresso in giorni). Da questa espressione sono stati ottenuti il grado di produttività massimo per ogni coltura batch in esame  $r_{X,MAX}$  e la produttività finale media per ogni test  $r_{X,END}$ .

$$r_X = \frac{X(t) - X_0}{t} \quad [2.8]$$

L'efficienza di utilizzo del carbonio, o in altri termini la resa di conversione del contenuto carbonioso da glucosio a biomassa  $Y_{X/S}^C$ , in gC/gC<sub>GLUC</sub> è stata calcolata con la formula 2.9.

$$Y_{X/S}^C = Y_{X/S} \cdot \frac{C_X\%}{C_S\%} \quad [2.9]$$

In essa,  $C_X\%$  è il contenuto di carbonio nella biomassa di *G. sulphuraria*, pari a circa il 48% come valore tipico (Abiusi et al., 2024), e  $C_S\%$  quello all'interno del glucosio (40%, considerando che per ogni molecola con massa molare pari a 180 g/mol, il carbonio ne costituisce 72).

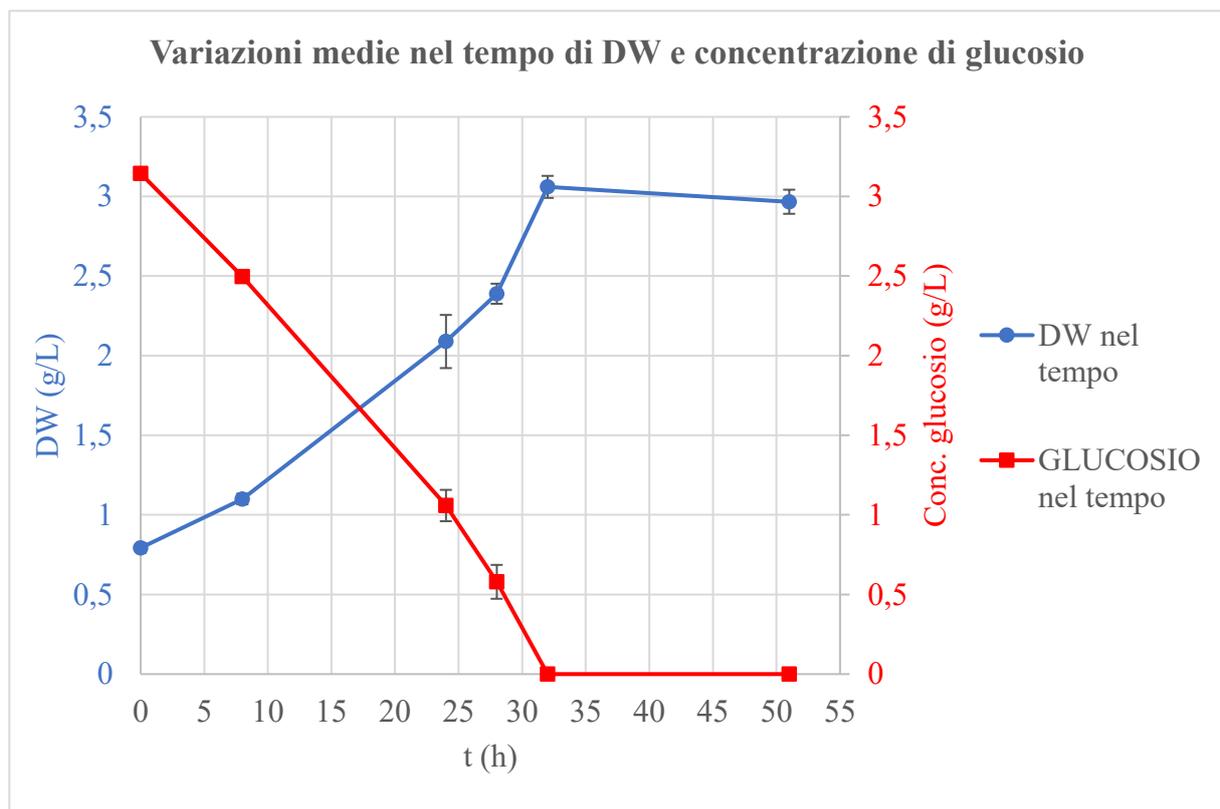
### 3. Risultati

#### 3.1 Risultati dei test su glucosio sintetico GS

Per confermarne l'attendibilità, più test sono stati effettuati, ma sono qui riportati solamente i risultati di quello più significativo (dal momento che questi test di crescita con GS avevano il solo scopo di confronto con gli esperimenti con GT, ce ne basta uno), condotto esattamente secondo le modalità descritte all'interno della sezione 2.3.1.

Le valutazioni di peso secco, densità ottica e concentrazione di glucosio tramite HPLC sono state effettuate su 6 diversi istanti temporali: l'istante iniziale e poi dopo 8, 24, 28, 32, 51 ore.

Come osservabile in Figura 3.1, la concentrazione di biomassa monitorata tramite il peso secco ed anche quella di glucosio hanno subito variazioni repentine, in sensi opposti, già poche ore dopo l'inoculo. Ciò suggerisce che è stata una buona misura quella di introdurre in soluzione nell'inoculo del glucosio prima della campagna di raccolta dei dati: ha permesso di risparmiare tempo evitando di monitorare la fase di latenza di adattamento iniziale.



**Figura 3.1** Variazione temporale della concentrazione di biomassa (punti blu) e di glucosio (riquadri rossi) di colture di *G. sulphuraria* in batch con GS. Entrambi i grafici costruiti a partire dai valori medi tra i triplicati biologici, con variazione standard rappresentata su ciascun punto rispettivamente.

Il glucosio viene fin da subito consumato in favore dell'accrescimento della colonia microalgale. L'intero quantitativo di glucosio, non molto elevato di per sé ma comunque sensibile (3 g/L), viene consumato interamente in meno di 2 giorni dal ceppo, che

successivamente si assesta su valori di peso secco costanti (dopo 32 ore, di fatto, si interrompe la fase di crescita esponenziale ed inizia la fase stazionaria). Anche la misura tramite HPLC effettuata sul liquido surnatante prelevato al termine dell'esperimento ha confermato l'assenza di glucosio residuo.

La deviazione standard, proveniente dall'aver ottenuto ciascun punto del grafico come una media tra 3 valori di replicati biologici paralleli, è comunque molto bassa: ciò indica che tutte le beute hanno mantenuto al proprio interno praticamente le stesse condizioni. Questo aspetto serve anche come verifica della correttezza delle operazioni di preparazione iniziale degli inoculi.

Data l'elevata versatilità metabolica, dopo qualche ora di latenza e riadattamento alle nuove condizioni del terreno senza glucosio la colonia avrebbe ripreso a crescere, più lentamente, in modalità fotoautotrofica, sfruttando l'illuminazione fornita e l'anidride carbonica presente in atmosfera, come tutte le colture di mantenimento descritte all'interno della sezione 2.2.4.

Tuttavia, questo aspetto non era d'interesse per gli scopi di Tesi. Al raggiungimento della fase stazionaria le beute non sono più state mantenute sotto osservazione ma rimosse dall'incubatore, e la biomassa al loro interno raccolta con le modalità descritte all'interno della sezione 2.3.1. Questa non è però stata analizzata per i motivi descritti all'interno della sezione 3.2.

Sono riportati, in Tabella 3.1, i parametri di crescita calcolati secondo le modalità descritte all'interno della sezione 2.5, basandosi sui valori medi di concentrazione di glucosio e biomassa tra i 3 triplicati biologici, considerando l'intero tempo di reazione tra 0 e 51 h.

**Tabella 3.1** Parametri medi di crescita sull'intero esperimento (compresa la fase stazionaria finale).

$Y_{X/S_{END}}$ (g/g <sub>GLUC</sub> )	$r_{X,END}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}^C$ (gC/gC,GLUC)
0,69	1,02	0,83

La Tabella 3.2, invece, riporta gli stessi parametri di resa e produttività media tra i replicati nei loro valori massimi raggiunti durante l'esperienza di crescita. In particolare, il ceppo è cresciuto con queste prestazioni considerando il periodo fino a 32 h. Questi risultano molto più utili per la comprensione delle prestazioni del ceppo in fase di crescita esponenziale. I valori considerati in Tabella 3.1, infatti, risultano più bassi perché viene considerata anche la fase stazionaria raggiunta, che in un processo industriale non andrebbe considerata dal momento che la coltura verrebbe interrotta al termine della fase esponenziale, e non certamente quasi 20 ore dopo.

**Tabella 3.2** Parametri medi di crescita massima (solo la fase esponenziale).

$\mu_{MAX}$ (h <sup>-1</sup> )	$t_{DUPL}$ (h)	$Y_{X/S_{MAX}}$ (g/g <sub>GLUC</sub> )	$r_{X,MAX}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}^C$ (gC/gC,GLUC)
0,042	16,4	0,72	1,7	0,87

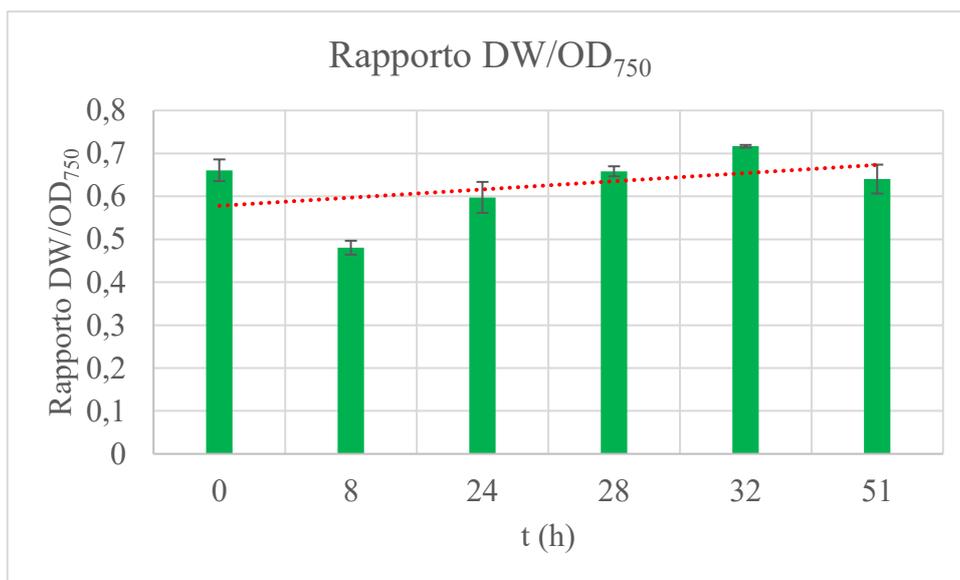
I valori sono piuttosto simili a quelli ottenuti dalle singole beute. D'altronde, è già stato osservato che le beute producessero tutte grosso modo gli stessi risultati, con bassa deviazione standard.

Ad esempio, il replicato biologico dei 3 che è risultato performare leggermente meglio degli altri due ha restituito i valori in Tabella 3.3, solo poco differenti da quelli medi.

**Tabella 3.3** Parametri di crescita del replicato biologico più performante.

$Y_{X/S_{MAX}}$ (g/g <sub>GLUC</sub> )	$r_{X,MAX}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}^C$ (gC/gC,GLUC)
0,74	1,75	0,89

Infine, il confronto tra i valori, istante per istante, di peso secco e densità ottica, ha prodotto il risultato riportato in Figura 3.2, all'interno della quale per ciascun istante di tempo è stato calcolato e posto ad ordinata il valore del rapporto tra la concentrazione media di biomassa (ottenuta dalle misure di peso secco, in g/L) ed il risultato medio di OD<sub>750</sub> da analisi spettrofotometrica.



**Figura 3.2** Valori del rapporto tra concentrazione di biomassa (g/L) rilevata tramite misura di peso secco e OD<sub>750</sub>. Oscillano intorno a 0,6 ma non con accuratezza tale da ritenere solo la densità ottica una misura affidabile della concentrazione.

In generale, questo rapporto varia circa tra 0,5 e 0,7: risulta confermato, perciò, che non è bene affidarsi alle misure di densità ottica come unico strumento da cui valutare la crescita, dato che non rispecchiano esattamente le effettive concentrazioni in soluzione ma oscillano attorno al valore corretto, dandone una stima di veloce e facile ottenimento ma di scarsa accuratezza.

### 3.2 Risultati dei test su glucosio di origine tessile GT

A differenza dei risultati ottenuti dai test con GS, quelli con GT sono risultati piuttosto negativi. In nessun caso è stato possibile raccogliere alcuna misura affidabile, né per il peso secco né per la densità ottica, sia per le proprietà della soluzione ottenuta sia, soprattutto, perché quasi immediatamente il contatto tra alghe e soluzione acida di glucosio ha portato alla morte delle prime (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Colonie microalgali dopo meno di 8 ore dall'inoculo con la soluzione GLUC1. L'assenza di verde è sintomatica della morte.

Torbidità e viscosità, causate dalla presenza di residui solidi nella soluzione di glucosio ottenuta per idrolisi, hanno ostacolato entrambe le misure, per motivi diversi.

Le misure di densità ottica sono risultate inefficaci per la difficoltà di risoluzione del campione bifasico, liquido con residui solidi sospesi:

- l'utilizzo di un bianco di acqua distillata sarebbe stato poco rappresentativo dei campioni da analizzare, le misure basate su questo tipo di taratura sarebbero state inevitabilmente sempre compromesse dalla quantità di solidi sospesi (se non perfettamente agitati e distribuiti in soluzione) prelevata nel campione. Rispetto ad un bianco di acqua distillata, due campioni identici nel quantitativo di alghe ma con diverso contenuto di solidi sospesi a causa di un impreciso prelievo dalla coltura poco agitata avrebbero dato misure spettrofotometriche molto differenti;
- anche l'utilizzo di un bianco di terreno e soluzione di glucosio, tuttavia, non ha permesso l'ottenimento di alcuna valutazione affidabile. Infatti, inevitabilmente, diluendo con acqua distillata il campione prima dell'analisi con spettrofotometro, al fine di riportarsi nel range di affidabilità dello strumento, le misure di  $OD_{750}$

non possono che risultare negative rispetto al bianco torbido e pieno di solidi sospesi.

Le misure di peso secco, invece, sono state falsate dal deposito degli stessi residui solidi sul filtro, che hanno costituito un'aggiunta di peso oltre a quello di biomassa che si voleva monitorare. Qualora fosse stato possibile effettuare più misure nel tempo, si sarebbe forse potuto osservare comunque un trend di crescita del peso secco, al netto del deposito fisso di solido, tuttavia la morte precoce della colonia ha impedito ragionamenti di questo tipo.

L'unica misura che ha dato un riscontro positivo, per quanto di influenza minima, è stata quella cromatografica effettuata all'istante iniziale. Questa ha infatti permesso di verificare che all'interno della soluzione liquida il glucosio fosse presente nella concentrazione voluta di circa 3 g/L, a conferma della correttezza dei calcoli di progettazione.

Allo stesso modo, anche la misura del pH della coltura indicava valori di circa 1,6, assolutamente consoni alla crescita di *G. sulphuraria*.

La causa del fallimento, dunque, potrebbe essere da ricercare in altre sostanze, intermedi di reazione, formati durante il processo di idrolisi del cotone, con azione antimicrobica, di cui non si era accertata la presenza.

Date le condizioni, non è stato possibile effettuare un'analisi elementare CHNS(O) sulla biomassa al termine dell'esperimento o tracciare profili amminoacidici e proteici, dal momento che non si aveva a disposizione una coltura vitale da prelevare dalle beute. Per tale motivo, non sono stati sottoposti ad analisi di questo tipo neanche i campioni di biomassa prelevati dall'esperimento con GS, i quali erano stati presi solo per effettuare un eventuale confronto con l'esperimento con GT.

### 3.3 *Discussione critica dei risultati*

Dai risultati precedentemente esposti, è possibile estrapolare alcune considerazioni, sia riguardo gli aspetti positivi che quelli critici.

Per quanto riguarda gli aspetti positivi, è stato verificato che la coltivazione in beute dotate di deflettori in modalità mixotrofica con concentrazioni di glucosio puro alimentato a 3 g/L funziona piuttosto bene. Per arrivare a questo risultato, sono state effettuate alcune iterazioni che non sono state riportate all'interno del presente elaborato. Coltivazioni effettuate in precedenza in reattori tubolari, in beute senza deflettori, o in beute con deflettori ma in altre configurazioni, non hanno fornito le stesse prestazioni, principalmente per problemi di insufficiente illuminazione o agitazione.

Per tale motivo, questa configurazione è stata ritenuta la migliore, per portare avanti anche gli esperimenti con GT.

I problemi dell'esperimento con GT, dunque, non sono probabilmente legati al sistema di illuminazione, mantenimento della temperatura ed agitazione, né alla forma del reattore utilizzato. Anche il pH è stato controllato ed era in un range accettabile per la sopravvivenza del ceppo.

La motivazione più plausibile consiste perciò nella soluzione di GT utilizzata, GLUC1. Le procedure di ottenimento di essa sono riportate nel dettaglio all'interno della sezione 2.1. Dai risultati di queste, è possibile osservare che il processo utilizzato non è stato ottimale. Trattandosi di un primo scale up di un processo simile effettuato su quantità 10 volte minori, sono stati effettuati vari tentativi, i quali hanno fornito risultati anche piuttosto diversi.

È stato notato che il processo di estrazione di glucosio risulta molto sensibile a variazioni anche piccole nelle procedure specifiche o a fattori esterni.

Ad esempio, l'agitazione durante il processo di idrolisi, come descritto, è stata garantita da un'ancoretta magnetica. La selezione della giusta dimensione di questo strumento è risultata un parametro cruciale. I primi campioni, a causa di ancorette troppo grandi o troppo piccole, non sono stati sottoposti alla giusta agitazione, e per tale motivo hanno portato a risultati per nulla soddisfacenti. Identificata la giusta dimensione, gli esperimenti successivi hanno fornito risultati migliori, e soluzioni con concentrazioni di glucosio utilizzabili per le colture.

Un altro aspetto cruciale è stato il processo di downstream utilizzato. Il primo testato, di quelli descritti in sezione 2.1, è stato quello di filtrazione, già utilizzato in precedenza per volumi minori con buoni risultati. Tuttavia, questo ha dato parecchi problemi a causa della elevata viscosità del prodotto di idrolisi, ricco di solidi in sospensione. Questi sarebbero forse risolvibili con diluizioni maggiori, che però non sono state testate, dal momento che l'unico obiettivo era in questo caso l'ottenimento di soluzioni di glucosio quanto più concentrate possibili.

La centrifugazione, testata come secondo processo, ha permesso di liberarsi della parte solida, ma richiedendo parecchie iterazioni: per ciascun campione, dopo più di 5 centrifughe era ancora possibile separare pochi ml di liquido alla volta, ma irrinunciabili per massimizzare il volume di soluzione ottenuta da utilizzare per le colture. Quando è stata utilizzata la centrifugazione, ciascun campione è stato processato non meno di 10 volte. Inoltre, è sempre stato necessario diluire almeno in minima parte.

Perciò, per gli ultimi campioni, si è preferito procedere senza processi di downstream, ma solamente conservando il prodotto di idrolisi diluito il meno possibile. Il vantaggio è che con questa modalità è stato ottenuto il campione più concentrato; lo svantaggio, la presenza di residui solidi nella soluzione finale GLUC1 utilizzata, i quali hanno portato ai problemi di misura descritti all'interno della sezione 3.2.

Il problema principale, infine, è che nessuna analisi è stata effettuata sulle soluzioni finali di glucosio ottenute da cotone, fossero esse in fase solo liquida dopo la separazione o ancora contenenti residui solidi. Molto probabilmente, data la sensibilità del processo a minime variazioni, l'ipotesi di selettività unitaria non è buona. Cioè, il processo di idrolisi, così come è stato portato avanti, favorisce la formazione in soluzione di ulteriori prodotti secondari non considerati, i quali hanno azione antimicrobica.

È plausibile, infatti, che tra i residui solidi siano presenti oligomeri di cellulosa solo parzialmente reagiti, che non dovrebbero essere dannosi per le cellule microalgali e anzi forse potenzialmente un'ulteriore fonte nutritiva, qualora queste mostrassero la capacità di metabolizzare questo substrato. Però è altrettanto probabile che anche altre specie si formino nel mezzo di reazione e lì si accumulino con effetto letale sulla coltura.

Altre motivazioni potrebbero risiedere in inefficienze dei processi di pretrattamento, anche se molto meno plausibili. Un'analisi cromatografica della soluzione pretrattata potrebbe mostrare se già prima dell'idrolisi una parte del contenuto carbonioso del cotone venga persa, ma questo aspetto non dovrebbe essere particolarmente rilevante. Infatti, prima e dopo la fase di pretrattamento chimico, il cotone è stato pesato e perdite consistenti avrebbero dovuto manifestarsi sotto forma di cali sensibili di peso, che non sono stati osservati.

## 4. Conclusioni e prospettive future

I risultati ottenuti con glucosio sintetico hanno confermato che non solo *G. sulphuraria* è in grado di portare avanti pathway metabolici mixotrofici, ma che in più questi vengono sfruttati con ottime rese (poco inferiori al 90%) e buone produttività (circa 1,7 g/L di biomassa prodotti giornalmente), rispetto ai valori tipici della modalità fotoautotrofica.

Vengono perciò ribaditi il senso e l'importanza di studi che permettano di utilizzare questa specie, sfruttandone la capacità di essere quasi del tutto immune a contaminazioni dato l'ambiente acido, ma non affidandosi a CO<sub>2</sub> come fonte carboniosa data la difficoltà di alimentazione di essa a causa dello stesso ambiente acido. Facendo attenzione, però, alla sostenibilità del processo nella sua interezza, e non contando sull'utilizzo di fonti organiche primarie o di produzione dedicata, ma provenienti ad esempio da scarti di altre filiere.

In particolare, le condizioni utilizzate in questa esperienza di Tesi non hanno fornito i risultati sperati, ma possono essere utilizzate come spunto per studi successivi, analizzandone aspetti positivi da riprodurre e negativi da migliorare o sostituire. Per tale motivo, la descrizione delle procedure adoperate è stata riportata in maniera quanto più fedele e dettagliata possibile.

I passaggi più critici, da attenzionare con cura, sono stati identificati non nella progettazione dell'esperimento di crescita quanto nella fase precedente di ottenimento di soluzioni di glucosio tessile, svolta come operazione accessoria all'interno di questo lavoro di Tesi ma che ricopre un ruolo fondamentale nel fornire le materie prime per lo svolgimento delle colture.

L'elevata sensibilità del processo a piccole variazioni richiede che alcuni steps siano ottimizzati: in particolare, la reazione di idrolisi ed il downstream che ne segue. Inoltre, la comprensione del meccanismo esatto di eventuali reazioni secondarie risulta cruciale per l'ottenimento di una soluzione che non solo contenga glucosio in elevate concentrazioni, ma che sia anche utilizzabile senza problemi per le colture.

Una volta identificate le migliori pratiche, queste vanno riprodotte con rigore, per verificare l'effettiva possibilità di sfruttare scarti tessili come fonte di cotone che tramite idrolisi possa divenire glucosio da adoperare come substrato per *G. sulphuraria*.

Esiste infatti anche la possibilità, per quanto poco probabile, che nel processo di idrolisi la formazione di alcune specie chimiche o di condizioni particolari sia inevitabile, ed in nessuna maniera sia possibile effettuare colture di *Galdieria* da questa via. Solo testando diverse opzioni e configurazioni, però, sarà possibile giungere a conclusioni definitive di questo tipo.

Qualora invece venissero trovate le condizioni migliori per la crescita del ceppo da GT, il passaggio successivo, che in questo lavoro di Tesi non è stato possibile effettuare, sarebbe quello dell'analisi elementare e dei profili amminoacidici e proteici, ricordando che il fine ultimo del lavoro è l'ottenimento di biochemicals.

Se queste analisi dovessero dare risultati interessanti, paragonabili ad esempio ai contenuti delle cellule di *G. sulphuraria* ottenuti in fotoautotrofia, risulterebbe più che sensato pensare ad uno scale up di processo, dal momento che i prodotti sarebbero le stesse biomolecole ottenibili fotoautotroficamente, ma con migliore resa e produttività, riducendo anche l'impatto dell'industria tessile come valore aggiunto.

In alternativa, altri processi da testare sarebbero quelli di *green extraction*, in cui sono utilizzati solventi poco aggressivi verso forme di vita microbica, a bassa tossicità ed impatto ambientale.



## 5. Lista di simboli ed abbreviazioni

**AMM:** terreno di Allen modificato

**ATP:** adenosina trifosfato

**CF:** centrifugazione

**$C_S\%$ :** percentuale in peso di carbonio all'interno del glucosio

**$C_X\%$ :** percentuale in peso di carbonio all'interno della biomassa

**COD:** chemical oxygen demand

**DW (dry weight):** peso secco della biomassa microalgale (g/L)

**F:** filtrazione

**FD:** fattore di diluizione

**FD<sub>MQ</sub>:** fattore di diluizione per aggiunta di acqua Milli-Q

**FD<sub>NaOH</sub>:** fattore di diluizione per aggiunta di soluzione di NaOH 14 M

**FD<sub>v</sub>:** fattore di diluizione della vial inviata ad HPLC

**GS:** glucosio di origine sintetica

**GT:** glucosio di origine tessile ottenuto secondo le modalità descritte

**HPLC:** cromatografia liquida ad alta prestazione

**$K_S$ :** costante di Monod di metà saturazione (g/L; M; mM) (Appendice A)

**NADPH<sub>2</sub>:** nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (forma ridotta di NADP<sup>+</sup>)

**NP:** nessun processo di downstream

**OD<sub>750</sub>:** densità ottica rilevata alla lunghezza d'onda di 750 nm tramite spettrofotometro

**PUFAs:** acidi grassi polinsaturi

**R<sup>2</sup>:** coefficiente di determinazione (Microsoft Excel)

**$r_X$ :** produttività di biomassa microalgale (g L<sup>-1</sup> giorno<sup>-1</sup>)

**$r_{X,END}$ :** produttività finale (g L<sup>-1</sup> giorno<sup>-1</sup>)

**$r_{X,MAX}$ :** produttività massima (g L<sup>-1</sup> giorno<sup>-1</sup>)

**[S]:** concentrazione del substrato cineticamente limitante (g/L; M; mM) (Appendice A)

**S<sub>0</sub>:** concentrazione iniziale di glucosio (g/L)

**S(t):** concentrazione di glucosio (g/L) al tempo t di campionamento

**t<sub>DUPL</sub>:** tempo di duplicazione della biomassa microalgale (h)

**v/v:** percentuale in volume della specie di interesse sul volume totale

**w/v:** percentuale in peso della specie di interesse su un volume di 100 ml di soluzione

**w/w:** percentuale in peso della specie di interesse sul peso totale

$X_0$ : concentrazione iniziale di biomassa (g/L)

$X(t)$ : concentrazione di biomassa (g/L) al tempo t di campionamento

$X_{0,exp}$ : concentrazione di biomassa (g/L) all'inizio della fase di crescita esponenziale

$X_{f,exp}$ : concentrazione di biomassa (g/L) al termine della fase di crescita esponenziale

$Y_{X/S}$ : resa di biomassa rispetto al glucosio alimentato (g/g<sub>GLUC</sub>)

$Y_{X/S_{END}}$ : resa finale (g/g<sub>GLUC</sub>)

$Y_{X/S_{MAX}}$ : resa massima (g/g<sub>GLUC</sub>)

$Y_{X/S}^C$ : resa di carbonio nella biomassa rispetto a quello alimentato nel glucosio (g<sub>C</sub>/g<sub>C,GLUC</sub>)

$\mu$ : velocità specifica di crescita della biomassa (h<sup>-1</sup>)

$\mu_{MAX}$ : velocità specifica massima di crescita della biomassa (h<sup>-1</sup>)

## 6. Riferimenti bibliografici

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem, I.B.M., 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19, 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Abiusi, F., Moñino Fernández, P., Canziani, S., Janssen, M., Wijffels, R.H., Barbosa, M., 2022a. Mixotrophic cultivation of *Galdieria sulphuraria* for C-phycocyanin and protein production. *Algal Research* 61, 102603. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102603>
- Abiusi, F., Trompetter, E., Hoenink, H., Wijffels, R.H., Janssen, M., 2021. Autotrophic and mixotrophic biomass production of the acidophilic *Galdieria sulphuraria* ACUF 64. *Algal Research* 60, 102513. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102513>
- Abiusi, F., Trompetter, E., Pollio, A., Wijffels, R.H., Janssen, M., 2022b. Acid Tolerant and Acidophilic Microalgae: An Underexplored World of Biotechnological Opportunities. *Front Microbiol* 13, 820907. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.820907>
- Abiusi, F., Tumulero, B., Neutsch, L., Mathys, A., 2024. Productivity, amino acid profile, and protein bioaccessibility in heterotrophic batch cultivation of *Galdieria sulphuraria*. *Bioresource Technology* 399, 130628. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130628>
- Abiusi, F., Wijffels, R.H., Janssen, M., 2020. Doubling of Microalgae Productivity by Oxygen Balanced Mixotrophy. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 8, 6065–6074. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00990>
- Ahmad, A., W. Hassan, S., Banat, F., 2022. An overview of microalgae biomass as a sustainable aquaculture feed ingredient: food security and circular economy. *Bioengineered* 13, 9521–9547. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2061148>
- Andersen, R.A., 2013. The Microalgal Cell, in: *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–20. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch1>
- Barbosa, M.J., Janssen, M., Südfeld, C., D’Adamo, S., Wijffels, R.H., 2023. Hypes, hopes, and the way forward for microalgal biotechnology. *Trends in Biotechnology* 41, 452–471. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.12.017>
- Barcytė, D., Nedbalová, L., Culka, A., Košek, F., Jehlička, J., 2018. Burning coal spoil heaps as a new habitat for the extremophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Fottea* 18, 19–29. <https://doi.org/10.5507/fot.2017.015>
- Becker, E.W., 2013. Microalgae for Human and Animal Nutrition, in: Richmond, A., Hu, Q. (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture*. Wiley, pp. 461–503. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch25>
- Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25, 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Binczarski, M.J., Zuberek, J.Z., Cieciora-Wloch, W., Borowski, S., Cieslak, M., Baranowska-Korczyn, A., Witczak, E., Witonska, I.A., 2024. Textile waste subjected to acid hydrolysis as raw materials for biogas production. *Renewable Energy* 227, 120428. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2024.120428>
- Boondaeng, A., Keabpimai, J., Srichola, P., Vaithanomsat, P., Trakunjae, C., Niyomvong, N., 2023. Optimization of Textile Waste Blends of Cotton and PET by Enzymatic Hydrolysis with Reusable Chemical Pretreatment. *Polymers (Basel)* 15, 1964. <https://doi.org/10.3390/polym15081964>
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Canelli, G., Abiusi, F., Vidal Garcia, A., Canziani, S., Mathys, A., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103287>
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Cho, E.J., Lee, Y.G., Song, Y., Kim, H.Y., Nguyen, D.-T., Bae, H.-J., 2023. Converting textile waste into value-added chemicals: An integrated bio-refinery process. *Environmental Science and Ecotechnology* 15, 100238. <https://doi.org/10.1016/j.es.2023.100238>
- de Farias Silva, C.E., Bertucco, A., 2016. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. *Process Biochemistry, Bioenergies: Present & Prospects* 51, 1833–1842. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.02.016>
- Dee, S.J., Bell, A.T., 2011. A study of the acid-catalyzed hydrolysis of cellulose dissolved in ionic liquids and the factors influencing the dehydration of glucose and the formation of humins. *ChemSusChem* 4, 1166–1173. <https://doi.org/10.1002/cssc.201000426>
- Di Caprio, F., Proietti Tocca, G., Stoller, M., Pagnanelli, F., Altimari, P., 2022. Control of bacterial contamination in microalgae cultures integrated with wastewater treatment by applying feast and famine conditions. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10, 108262. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108262>
- Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., (Ellen) Slegers, P., Brentner, L.B., Roy, A., Barbosa, M.J., 2013. Food commodities from microalgae. *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology • Plant biotechnology* 24, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.012>
- Egan, J., Wang, S., Shen, J., Baars, O., Moxley, G., Salmon, S., 2023. Enzymatic textile fiber separation for sustainable waste processing. *Resources, Environment and Sustainability* 13, 100118. <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2023.100118>
- Gholamzad, E., Karimi, K., Masoomi, M., 2014. Effective conversion of waste polyester–cotton textile to ethanol and recovery of polyester by alkaline pretreatment. *Chemical Engineering Journal* 253, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.109>
- Hajinajaf, N., Fallahi, A., Eustance, E., Sarnaik, A., Askari, A., Najafi, M., Davis, R.W., Rittmann, B.E., Varman, A.M., 2024. Managing carbon dioxide mass transfer in photobioreactors for enhancing microalgal biomass productivity. *Algal Research* 80, 103506. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103506>
- Håkansson, H., Ahlgren, P., 2005. Acid hydrolysis of some industrial pulps: effect of hydrolysis conditions and raw material. *Cellulose* 12, 177–183. <https://doi.org/10.1007/s10570-004-1038-6>
- Janssen, M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2022. Microalgae based production of single-cell protein. *Current Opinion in Biotechnology* 75, 102705. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102705>
- Jayakumari, M., Hayavadana, J., Srinivasulu, K., Murthy, E.K., Priyanka, S., Vijayasathy, M., 2024. Ethical Issues in Textile Industry. *African Journal of Biomedical Research* 27, 2889–2895.
- Kusmayadi, A., Leong, Y.K., Yen, H.-W., Huang, C.-Y., Chang, J.-S., 2021. Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans – Biotechnological and environmental aspects. *Chemosphere* 271, 129800. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129800>
- Li, X., Hu, Y., Du, C., Lin, C.S.K., 2019. Recovery of Glucose and Polyester from Textile Waste by Enzymatic Hydrolysis. *Waste Biomass Valor* 10, 3763–3772. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0483-7>

- Mammadova, A., Behagel, J., Masiero, M., Pettenella, D., 2022. Deforestation as a Systemic Risk. The Case of Brazilian Bovine Leather. *Forests* 13, 233. <https://doi.org/10.3390/f13020233>
- Monod, J., 1949. THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES. *Annual Review of Microbiology* 3, 371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
- Muys, M., Sui, Y., Schwaiger, B., Lesueur, C., Vandenneuvel, D., Vermeir, P., Vlaeminck, S.E., 2019. High variability in nutritional value and safety of commercially available *Chlorella* and *Spirulina* biomass indicates the need for smart production strategies. *Bioresource Technology* 275, 247–257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.059>
- Oesterhelt, C., Schmälzlin, E., Schmitt, J.M., Lokstein, H., 2007. Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*†. *The Plant Journal* 51, 500–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03159.x>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* 45, 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Pleissner, D., Schönfelder, S., Händel, N., Dalichow, J., Ettinger, J., Kvangarsnes, K., Dauksas, E., Rustad, T., Cropotova, J., 2023. Heterotrophic growth of *Galdieria sulphuraria* on residues from aquaculture and fish processing industries. *Bioresource Technology* 384, 129281. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129281>
- Proietti Tocca, G., Agostino, V., Menin, B., Tommasi, T., Fino, D., Di Caprio, F., 2024. Mixotrophic and heterotrophic growth of microalgae using acetate from different production processes. *Rev Environ Sci Biotechnol* 23, 93–132. <https://doi.org/10.1007/s11157-024-09682-7>
- Retta, B., Iovinella, M., Ciniglia, C., 2024. Significance and Applications of the Thermo-Acidophilic Microalga *Galdieria sulphuraria* (Cyanidiophytina, Rhodophyta). *Plants (Basel)* 13, 1786. <https://doi.org/10.3390/plants13131786>
- Ruiz, J., Wijffels, R.H., Dominguez, M., Barbosa, M.J., 2022. Heterotrophic vs autotrophic production of microalgae: Bringing some light into the everlasting cost controversy. *Algal Research* 64, 102698. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102698>
- Sanchis-Sebastiá, M., Ruuth, E., Stigsson, L., Galbe, M., Wallberg, O., 2021. Novel sustainable alternatives for the fashion industry: A method of chemically recycling waste textiles via acid hydrolysis. *Waste Management* 121, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.12.024>
- Sharma, J., Sarmah, P., Bishnoi, N.R., 2020. Market Perspective of EPA and DHA Production from Microalgae, in: *Nutraceutical Fatty Acids from Oleaginous Microalgae*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 281–297. <https://doi.org/10.1002/9781119631729.ch11>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101, 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Swanson, D., Block, R., Mousa, S.A., 2012. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in Nutrition* 3, 1–7. <https://doi.org/10.3945/an.111.000893>
- Wakade, G., Lin, S., Saha, P., Kumari, U., Daniell, H., 2023. Abatement of microfibre pollution and detoxification of textile dye – Indigo by engineered plant enzymes. *Plant Biotechnology Journal* 21, 302–316. <https://doi.org/10.1111/pbi.13942>
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., Ruan, R., 2010. Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Appl Biochem Biotechnol* 162, 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>

- Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2010. An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science* 329, 796–799. <https://doi.org/10.1126/science.1189003>
- Wild, K.J., Steingäß, H., Rodehutscord, M., 2019. Variability of in vitro ruminal fermentation and nutritional value of cell-disrupted and nondisrupted microalgae for ruminants. *GCB Bioenergy* 11, 345–359. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12539>
- Wood, P., Tavan, M., 2022. A review of the alternative protein industry. *Current Opinion in Food Science* 47, 100869. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100869>

## 7. Appendice A – Cenni teorici di riferimento sul metabolismo cellulare

### 7.1 Possibili vie metaboliche

All'interno della Tesi viene descritta la capacità di alcune specie di microalghe di crescere in diverse condizioni, sfruttando differenti vie metaboliche, che coinvolgono specie reagenti e substrati di varia natura per il raggiungimento, in ogni caso, dell'obiettivo della sopravvivenza tramite accumulo intracellulare di energia (da utilizzare quando necessario, ad esempio per la riproduzione) e materia organica (nella forma di composti principalmente carboniosi).

In particolare, le modalità trofiche a cui si fa riferimento sono tre: fotoautotrofia, eterotrofia e mixotrofia. In Tabella 7.1, sono riassunte le caratteristiche principali di ciascuna.

**Tabella 7.1** Differenze tra le diverse modalità trofiche.

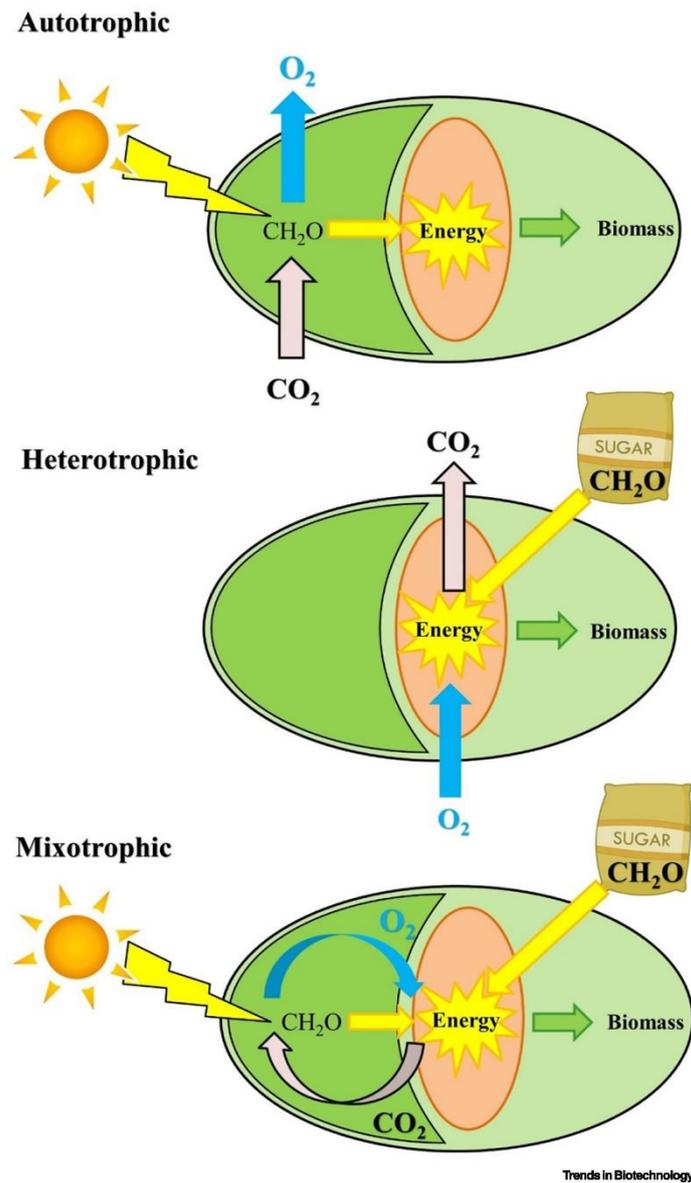
	<b>FONTE DI ENERGIA</b>	<b>FONTE DI CARBONIO</b>
<b>FOTOAUTOTROFIA</b>	LUCE	INORGANICO
<b>FOTOETEROTROFIA</b>	LUCE	ORGANICO
<b>CHEMIOETEROTROFIA</b>	COMPOSTI ORGANICI	ORGANICO
<b>MIXOTROFIA</b>	LUCE, ENERGIA CHIMICA DA COMPOSTI ORGANICI	ORGANICO ED INORGANICO

Il metabolismo fotoautotrofico coinvolge i plastidi presenti all'interno delle cellule microalgali ed è basato sul processo di fotosintesi:

- in una prima fase, detta luminosa, una catena di trasporto di elettroni permette di convertire l'energia luminosa (di origine solare o artificiale) assorbita dalle molecole di clorofilla in energia chimica, nella forma di composti come NADPH<sub>2</sub>, ATP e O<sub>2</sub>;
- il processo successivo, la fase oscura, non richiede la presenza di radiazione luminosa ma consiste nella riduzione di anidride carbonica, presa dall'ambiente esterno, in composti organici come carboidrati o lipidi, tramite il ciclo di Calvin in cui vengono utilizzati i composti prodotti nella fase precedente, ATP e NADPH<sub>2</sub>.

Il metabolismo eterotrofico, al contrario, non richiede radiazioni luminose (facendo riferimento in particolare alla via chemioeterotrofica). Sono invece necessari substrati organici da ossidare come fonti energetiche e carboniose in un processo di respirazione, dal momento che in questa modalità non avviene la fissazione di CO<sub>2</sub>.

Nella via mixotrofica, che solo alcune specie di microalghe sono in grado di portare avanti, l'azione simultanea del metabolismo respiratorio e di quello fotosintetico fanno sì che la radiazione luminosa sia utilizzata come fonte di energia mentre la fonte carboniosa sia costituita da substrati organici (Figura 7.1; Barbosa et al., 2023).

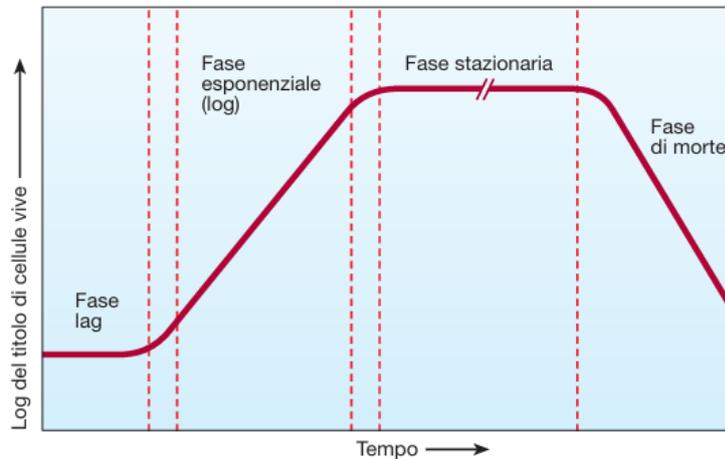


**Figura 7.1** Schema delle modalità trofiche principali.

## 7.2 Dinamiche di crescita microalgale

Tipicamente, le colture microalgali sono condotte in modalità batch, in cui ad una coltura di inoculo viene fornito adeguato nutrimento per permettere la riproduzione cellulare e l'accrescimento della colonia col passare del tempo, controllando parametri quali temperatura, pH, illuminazione, apporto di gas ed agitazione.

La Figura 7.2 (dal libro "Biologia dei microrganismi" edito da Zanichelli. Terza edizione.) contiene un tipico andamento di crescita nel tempo di una colonia microalgale.



**Figura 7.2** Curva di crescita microbica.

La prima fase, detta di latenza (o *lag phase*), ha durata variabile a seconda della specie e della tipologia di terreno utilizzato, e consiste in un periodo di adattamento da parte dei microrganismi alle condizioni in cui sono posti.

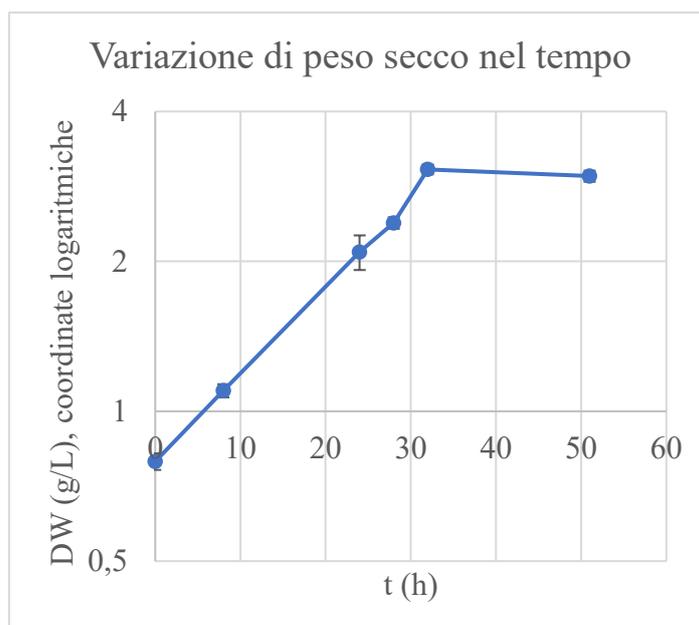
La seconda fase, quella di crescita esponenziale, è un arco temporale in cui aumenta esponenzialmente il numero di cellule della colonia tramite fissione binaria, come conseguenza di un rapido consumo dei nutrienti. Questa è caratterizzata da un tasso di crescita specifico calcolabile secondo modelli cinetici come quelli descritti più avanti in questa Appendice, che dipendono principalmente dalle caratteristiche del microrganismo e dall'alimentazione di nutrienti fornita.

La terza fase, stazionaria, è quella in cui il tasso di crescita eguaglia quello di morte, le quantità di nutrienti iniziano a scarseggiare ed il numero di microrganismi non varia.

Infine, la fase di morte: l'assenza di nutrienti nel terreno, o altre condizioni avverse (ad esempio, improvvise variazioni di pH o temperatura, accumulo di metaboliti tossici, presenza di specie competitive, ecc.) portano alla riduzione del numero di cellule.

La curva di crescita riportata in Figura 3.1 tra i risultati di questa Tesi, riportata in asse logaritmico in Figura 7.3, è un perfetto esempio dei tratti di crescita esponenziale e di fase stazionaria. Per ottenerla, infatti, l'inoculo è stato preadattato alla presenza del substrato organico ed alle condizioni di coltura, così da non osservare la fase di latenza all'interno della campagna di raccolta dati.

Il rapido trend di crescita si manifesta come un andamento pressochè lineare in scala logaritmica, seguito dal mantenimento nel tempo di un valore praticamente costante di concentrazione.



**Figura 7.3** Andamento di crescita di *G. sulphuraria* paragonabile a quello teorico in fase esponenziale e stazionaria.

### 7.3 Parametri di crescita

Uno dei modelli più accreditati ed utilizzati per la descrizione di cinetiche di crescita microbica, non solo per specie microalgali, è quello proposto da Jacques Monod nel 1949. Questo è basato su una relazione funzionale tra velocità di crescita specifica e concentrazione di substrato limitante, riportata nella formula 7.1, in una forma praticamente identica a quella del modello di Michaelis-Menten (utilizzato comunemente per la descrizione di cinetiche enzimatiche).

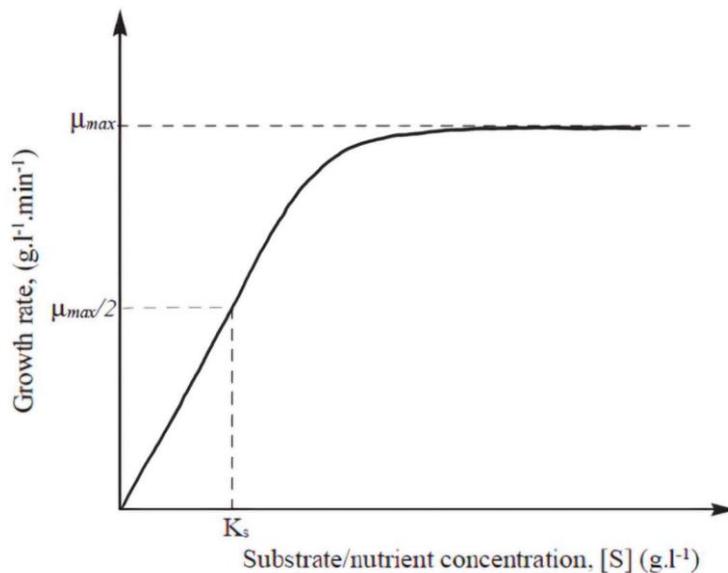
$$\mu = \frac{\mu_{MAX} \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad [7.1] \text{ (Monod, 1949)}$$

In essa,  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) è la velocità di crescita specifica, mentre  $[S]$  (g/L; M; mM) è la concentrazione del substrato cineticamente limitante, rispettivamente la variabile dipendente ed indipendente del modello. Gli altri due valori sono invece costanti che caratterizzano il sistema:  $\mu_{MAX}$  rappresenta la massima velocità di crescita raggiungibile dal microrganismo considerato, mentre  $K_s$  è il valore della concentrazione di substrato limitante corrispondente ad un tasso di crescita specifico pari alla metà di quello massimo.

La relazione e la sua rappresentazione grafica (Figura 7.4) permettono di individuare la concentrazione di substrato limitante come parametro chiave per la crescita. Valori molto bassi di concentrazione si traducono in una dipendenza pressochè lineare, mentre valori elevati portano a condizioni in cui la velocità di crescita specifica è indipendente da variazioni della concentrazione ma permane sul valore massimo.

Assodata l'importanza della concentrazione di substrato nella definizione dei risultati finali di crescita, parametri come la resa in biomassa o la produttività di biomassa possono essere utilizzati per la caratterizzazione ed il confronto di diversi test di crescita. Formule per

essi, utilizzate all'interno del lavoro di Tesi, sono state utilizzate e riportate all'interno della sezione 2.5.4.



**Figura 7.4** Rappresentazione grafica del modello di Monod, lineare a basse concentrazioni e con andamento di saturazione per alti valori. Il valore di  $K_s$  è riportato sul grafico come quello per cui la velocità specifica di crescita è la metà di quella massima.

#### 7.4 Confronto tra meccanismi trofici

In colture fotoautotrofiche, sia la luce che l'anidride carbonica possono costituire il substrato limitante. Colture eterotrofiche o mixotrofiche, invece, sono caratterizzate tipicamente da un solo limite da attenzionare nella progettazione delle esperienze di crescita: rispettivamente la fonte organica o quella luminosa. Risulta chiaro, dunque, il motivo per il quale in diversi studi vengano osservate in generale rese migliori con queste vie metaboliche rispetto alla via fotosintetica.

È pur da tenere in conto, però, la necessità di mantenere condizioni axeniche ed evitare in tutti i modi contaminazioni, nel caso di colture che sfruttano fonti organiche come substrato, traducibile in spese aggiuntive.

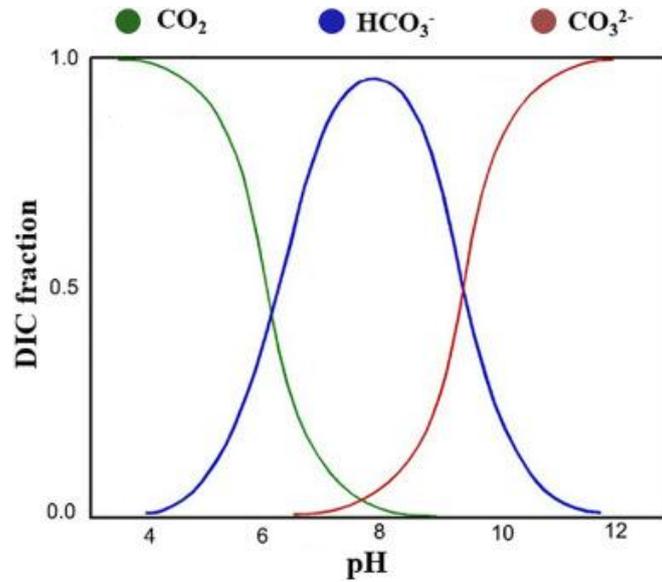
#### 7.5 Contestualizzazione: *G. sulphuraria*, pH acido e trasporto di $CO_2$

Alla luce delle ultime considerazioni, il caso di *G. sulphuraria* è piuttosto peculiare e senza dubbio porta a preferire meccanismi eterotrofici o mixotrofici.

Infatti, come riportato all'interno della sezione 1.4, il pH estremamente acido di crescita di questo microrganismo provvede autonomamente ad evitare contaminazioni rilevanti senza spese ulteriori, rimuovendo il principale ostacolo all'utilizzo di fonti carboniose.

Inoltre, proprio il pH acido sfavorisce il trasporto di  $CO_2$  in coltura liquida, rendendo necessario l'utilizzo di correnti gassose ricche in questa componente, o molto più semplicemente l'utilizzo di substrati organici.

Infatti, in condizioni acide, la formazione di carbonati in soluzione acquosa dalla reazione tra  $\text{CO}_2$  ed  $\text{H}_2\text{O}$  è minima per equilibrio chimico, come osservabile in Figura 7.5 (Hajinajaf et al., 2024). Ciò determina un accumulo di  $\text{CO}_2$  in fase liquida, e dunque un bassissimo valore della forza spingente per il suo trasporto molecolare, costituita dal gradiente di concentrazione di anidride carbonica tra atmosfera gassosa (tipiche concentrazioni di  $\text{CO}_2$  in aria si attestano intorno allo 0,04% v/v, molto basse) e fase liquida (in cui, come detto, l'anidride carbonica si accumula e non viene convertita in carbonati) (Hajinajaf et al., 2024).



**Figura 7.5**  $\text{CO}_2$  e carbonati in fase liquida al variare del pH

## 8. Appendice B – Composizione del terreno di crescita utilizzato

Come descritto all'interno della sezione 2.2.2, AMM è un terreno di composizione definita, con le concentrazioni riportate in Tabella 8.1 e 8.2. La conservazione di ciascun componente è avvenuta in stocks da 50 ml, ad eccezione del componente  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  preparato in stocks da 500 ml, con le concentrazioni da Tabella 8.3.

**Tabella 8.1** Composizione terreno AMM.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10,56 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,6 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,052 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,096 g/L
$\text{H}_3\text{PO}_4$ 85% (1,685 kg/L)	1,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,1 g/L
KCl	0,6 g/L
<b>Micronutrienti</b>	1 ml/L

**Tabella 8.2** **Micronutrienti.**

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4 g/L
$\text{ZnCl}_2$	4,5 g/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3,5 g/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4 g/L

**Tabella 8.3** Concentrazioni degli stocks.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	273,6 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	22 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 g/L
$\text{H}_3\text{PO}_4$ 85% (1,685 kg/L)	750 g/L
NaCl	9 g/L
$\text{H}_3\text{BO}_3$	50 g/L
KCl	250 g/L
<b>Micronutrienti</b>	Si veda la Tabella 8.2



## 9. Appendice C – Rette di taratura per la valutazione della concentrazione di glucosio tramite HPLC

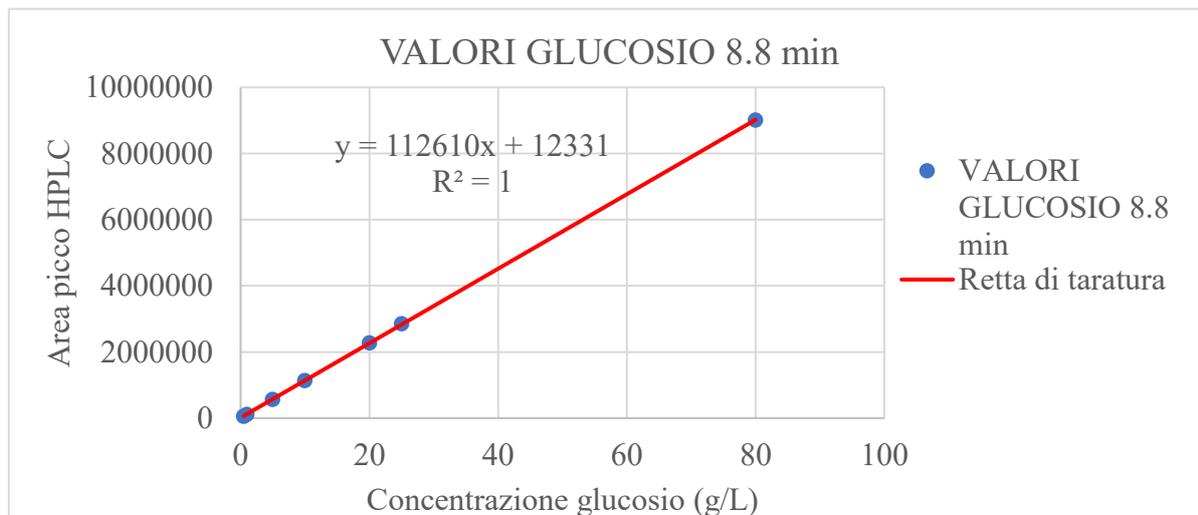
Per tutte le valutazioni di concentrazioni di glucosio tramite HPLC, sia nell'ambito delle colture microalgali sia in quello del processo a monte di estrazione del glucosio da cotone, si è fatto ricorso alla stessa apparecchiatura, un sistema HPLC Prominence (Shimadzu, JP) equipaggiato con detector di indice di rifrazione e con detector di array di diodi, in cui i composti sono stati separati per mezzo di colonna Resez ROA-Organic Acid (Phenomenex, USA) mantenuta a 50°C, in cui la fase mobile utilizzata consiste in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M con flusso di 0,7 mL/min.

Per poter estrapolare dei dati utili dalle misure, è stato necessario costruire preliminarmente una retta di taratura dello strumento per valutare, grazie a soluzioni di glucosio (glucosio-D-(+)  $\geq 99,5\%$  w/w, Sigma) a concentrazione nota, la risposta dell'apparecchio alla presenza di glucosio all'interno dei campioni analizzati. A tale scopo, sono state usate soluzioni di glucosio con concentrazioni variabili, le quali hanno fornito come output di area del picco a 8,8 minuti nel cromatogramma i valori leggibili all'interno della Tabella 9.1.

Da queste coppie di valori, è stata costruita la retta di taratura tramite Microsoft Excel riportata in Figura 9.1.

**Tabella 9.1** Dati usati per la costruzione della retta di taratura della strumentazione HPLC.

Concentrazione nota di glucosio (g/L)	Output HPLC ad 8,8 minuti
0,5	57670
1	114835
5	570369
10	1139033
20	2272419
25	2855379
80	9010865



**Figura 9.1** Retta di taratura per l'utilizzo della strumentazione HPLC.

L'equazione della retta, ritenuta attendibile come interpolazione dei dati dal momento che il valore di  $R^2$  è pari a 1, è espressa dalla formula 9.1.

$$y = 112610 x + 12331 \quad [9.1]$$

Tutti i campioni analizzati con HPLC, dunque, a fronte di un valore  $y$  di output dell'apparecchiatura come area del picco rilevato a 8,8 minuti nel cromatogramma, sono stati ricondotti a valori  $x$  di concentrazione di glucosio seguendo la formula inversa 9.2.

$$x = \frac{y - 12331}{112610} \quad [9.2]$$

In particolare, è da notare che non sono quasi mai stati inviati campioni non diluiti prima dell'analisi HPLC. Perciò, quando necessario, è stato introdotto nella formula utilizzata un fattore di diluizione  $FD$  che tenesse conto delle diluizioni effettuate sul campione di cui si volesse conoscere la concentrazione, trasformandola nella maniera espressa dall'equazione 9.3.

$$x = \frac{(FD \times y) - 12331}{112610} \quad [9.3]$$

La diluizione, infatti, agisce direttamente sulla risposta dell'apparecchiatura, riducendo l'ampiezza del picco rilevato (il valore di  $y$ ) proporzionalmente alla diluizione effettuata. Per ottenere il corretto valore di concentrazione del campione, dunque, bisogna riportare il valore della risposta dell'apparecchiatura su quello reale non diluito, a cui far corrispondere tramite la retta di taratura un coerente valore di concentrazione di glucosio.

Il fattore  $FD$  da inserire nel calcolo deve tener conto di tutte le  $n$  diluizioni  $FD_i$  effettuate rispetto al campione di cui si vuole conoscere la concentrazione, secondo la produttoria 9.4.

$$FD = \prod_{i=1}^n FD_i \quad [9.4]$$



## 10. Ringraziamenti

Nulla di buono accade per caso. Se questo percorso finalmente giunge alla fine è perché ad aiutarmi ho avuto tante persone che mi hanno voluto bene.

Ringrazio la mia famiglia: mia madre, mio padre e mio fratello Paolo. Il loro appoggio è sempre stato fondamentale per me.

Poi, i miei amici, quelli di Palermo, quelli conosciuti a Torino e quelli che sono in giro per il mondo. Non scrivo tutti i nomi ma ciascuno di loro sa di essere nel mio cuore.

Infine, ringrazio la Prof.ssa Tonia Tommasi, Giacomo e Francesca, per avermi dato l'opportunità di sviluppare questo progetto di Tesi con serenità, imparando tanto. Auguro a tutti e tre di continuare la propria carriera accademica nella maniera più proficua e soddisfacente possibile.