

# 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

## **Valorizzazione di effluente ricco in acetato da fermentazione gassosa per la crescita eterotrofa di biomassa microalgale ad alto valore aggiunto**



### **Relatore**

Prof.ssa Tonia Tommasi

### **Correlatore**

Dott. Giacomo Proietti Tocca

### **Candidata**

Martina Rita Miglietta

Dicembre 2023



*Alla mia famiglia, con immensa gratitudine*



## **Indice**

<b>1 Introduzione .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Condizioni di coltura e crescita delle microalghe.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Cinetica di crescita.....	2
1.1.2 Crescita in autotrofia ed eterotrofia a confronto.....	4
1.1.3 Utilizzo di acetato come substrato organico.....	7
1.1.4 Caratteristiche del terreno di coltura.....	10
<b>1.2 Principali soluzioni reattoristiche.....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Scale-up del processo: autotrofia ed eterotrofia a confronto.....	12
<b>1.3 Descrizione del genere <i>Chlorella</i>.....</b>	<b>13</b>
1.3.1 <i>Chlorella Sorokiniana</i> .....	13
1.3.2 Produzione di proteine da <i>Chlorella</i> .....	14
<b>2 Scopo del lavoro .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Attività sperimentale in laboratorio.....</b>	<b>15</b>
<b>3 Materiali e metodi .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Ceppo utilizzato e mantenimento delle microalghe.....</b>	<b>17</b>
3.1.1 Caratteristiche del terreno BG-11.....	17
<b>3.2 Configurazione dei fotobioreattori di laboratorio.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Fase 1: coltivazione in fotoautotrofia.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4 Fase 2: coltivazione in eterotrofia.....</b>	<b>22</b>
<b>3.5 Quantificazione della biomassa microalgale.....</b>	<b>23</b>
<b>3.6 Valutazione del peso secco.....</b>	<b>24</b>
<b>3.7 Analisi della variazione della concentrazione di acetato.....</b>	<b>24</b>
<b>3.8 Calcolo dei parametri di processo.....</b>	<b>25</b>
<b>3.9 Analisi della biomassa microalgale.....</b>	<b>26</b>
<b>3.10 Determinazione della percentuale proteica.....</b>	<b>26</b>
<b>3.11 Analisi del profilo amminoacidico.....</b>	<b>28</b>
3.11.1 Costruzione delle rette di taratura degli amminoacidi.....	29
<b>3.12 Analisi della biomassa di <i>Thermoanaerobacter kivui</i>.....</b>	<b>30</b>

<b>4 Risultati e discussione .....</b>	<b>31</b>
4.1 Fase 1: prova in fotoautotrofia.....	31
4.2 Fase 2: prove in eterotrofia.....	32
4.3 Confronto dei risultati ottenuti in autotrofia ed eterotrofia.....	33
4.4 Analisi della percentuale proteica in <i>Chlorella</i> .....	38
4.5 Costruzione delle rette di taratura degli amminoacidi.....	40
4.6 Analisi del profilo amminoacidico.....	41
4.7 Analisi del profilo amminoacidico di <i>Thermoanaerobacter kivui</i> .....	48
<b>5 Conclusioni e prospettive future .....</b>	<b>51</b>
<b>6 Lista dei simboli .....</b>	<b>53</b>
<b>7 Riferimenti bibliografici .....</b>	<b>55</b>
<b>8 Appendici .....</b>	<b>61</b>
Appendice 1: composizione terreno BG-11.....	61
Appendice 2: composizione terreno M-8.....	62
Appendice 3: rette di taratura AA essenziali.....	63
<b>9 Ringraziamenti.....</b>	<b>69</b>

# 1. Introduzione

Tra i problemi principali che riguardano la popolazione mondiale, quella di fornire cibo di qualità ad un numero di persone in costante aumento è una questione di grande attualità. Con 9 miliardi di persone previste nel 2050, infatti, la produzione alimentare dovrebbe aumentare del 70% (FAO, 2009) ma questo comporta gravi rischi soprattutto per l'ambiente.

Per far fronte a tale problematica, si cercano delle fonti nutrizionali alternative che siano sostenibili per l'ecosistema ma anche economicamente vantaggiose. Le microalghe, in tal senso, potrebbero rappresentare una valida alternativa alle tradizionali fonti proteiche e lipidiche, con le loro caratteristiche nutrizionali che le rendono facilmente sfruttabili anche a livello industriale.

Le microalghe sono organismi fotosintetici unicellulari che possono vivere in acque dolci o salate e appartengono alla classe dei fitoplancton, ricoprendo un ruolo estremamente importante nella catena alimentare dell'ambiente acquatico. Gli esemplari ad oggi classificati sono circa 35.000, tuttavia il numero totale di specie algali esistenti può variare tra 200.000 e 800.000 (Ebenezer et al., 2012).

L'impiego delle microalghe in ambito biotecnologico ha iniziato a svilupparsi a partire dalla metà del secolo scorso, al fine di sfruttare le vantaggiose caratteristiche di questi microrganismi (Spolaore et al., 2005).

Attualmente, infatti, vi sono numerose applicazioni commerciali che vedono come protagoniste le microalghe: ad esempio, possono essere utilizzate per migliorare il valore nutritivo degli alimenti destinati sia all'uomo che agli animali; sono utilizzate in ambito cosmetico, farmaceutico e nei processi di depurazione delle acque reflue; inoltre, possono essere ottenuti preziosi metaboliti secondari come amido, proteine, clorofille, carotenoidi, zuccheri e lipidi. Da questi ultimi, attraverso il processo chimico della transesterificazione, può essere ottenuto biocarburante.

L'elevato contenuto proteico di varie specie di microalghe porta a considerarle come una valida fonte di proteine alternativa a quelle convenzionali. Il contenuto proteico stimato in diverse specie è superiore al 50% del peso secco.

I carboidrati nelle microalghe sono presenti sotto forma di amido, glucosio, zuccheri e altri polisaccaridi con elevato livello di digeribilità (Becker, 2004). Il contenuto medio di lipidi, invece, varia tra l'1% e il 70% ma può raggiungere il 90% del peso secco in certe condizioni (Metting, 1996).

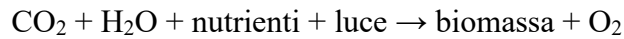
I lipidi algali sono composti da glicerolo, zuccheri o basi esterificati con acidi grassi saturi o insaturi (da 12 a 22 atomi di carbonio). In particolar modo, quelli di maggiore interesse sono gli acidi grassi delle famiglie  $\omega 3$  e  $\omega 6$  (Spolaore et al., 2005).

Le microalghe costituiscono una preziosa fonte di vitamine essenziali (ad es. A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina, acido folico e acido pantotenico) (Becker, 2004). Inoltre, esse sono ricche di pigmenti come la clorofilla (dallo 0,5% all'1% di peso secco), carotenoidi (da 0,1% a 0,2% di peso secco) e ficobiliproteine (Spolaore et al., 2005).

Queste caratteristiche relative alla loro composizione determinano un notevole interesse verso l'impiego di microalghe. Tuttavia, prima della commercializzazione, il materiale algale deve essere sottoposto ad analisi per eliminare l'eventuale presenza di composti come metalli pesanti, acidi nucleici o tossine, classificati come tossici dagli enti internazionali legislativi.

## 1.1 Condizioni di coltura e crescita delle microalghe

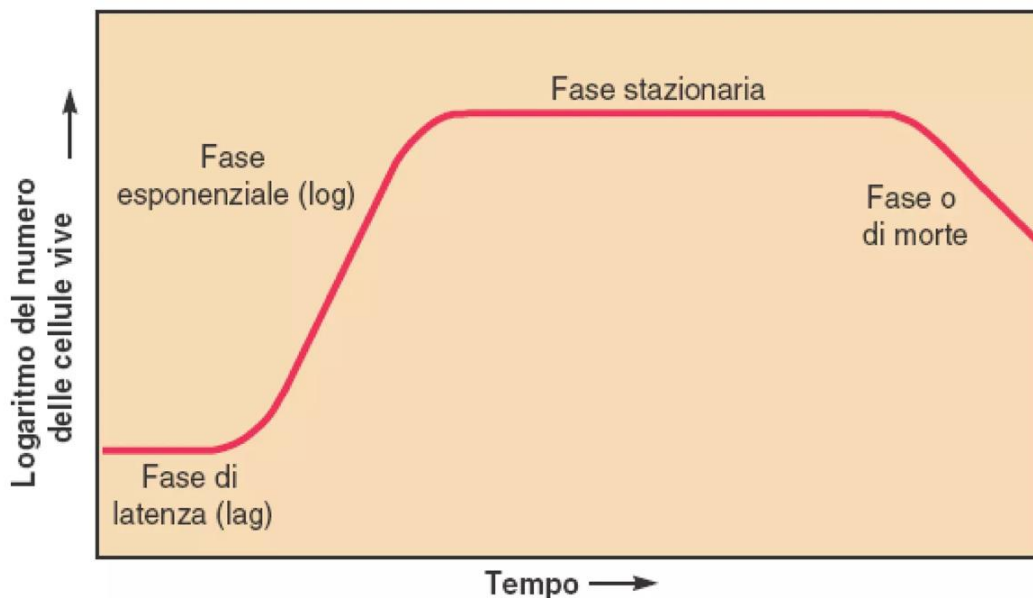
La presenza di luce come fonte energetica e di carbonio inorganico consente alle microalghe di ottenere le sostanze organiche necessarie per la propria crescita attraverso il processo della fotosintesi, secondo il seguente meccanismo:



L'utilizzo di fonti di carbonio organiche può avvenire invece in due modalità: in presenza di luce in mixotrofia oppure in assenza della fonte luminosa in condizioni eterotrofe (Je e Yamaoka, 2022).

### 1.1.1 Cinetica di crescita

In condizioni batch, la curva di crescita delle microalghe segue l'andamento riportato in figura 1.1:



**Figura 1.1:** Rappresentazione della curva di crescita delle microalghe in condizioni batch. Figura tratta con modifiche da: <https://www.slideshare.net/Zoologo/2crescita-batteri-stud>

In dettaglio, si distinguono le seguenti fasi:

- Fase di latenza: fase iniziale di adattamento al terreno di coltura e alle condizioni esterne come intensità della radiazione luminosa o condizioni di temperatura; tale fase ha una durata variabile a seconda del tipo della specie e della tipologia di terreno utilizzata.
- Fase esponenziale: è la fase in cui la crescita delle microalghe segue una legge di tipo esponenziale; la crescita della biomassa è estremamente rapida e si raggiunge il massimo consumo di nutrienti.

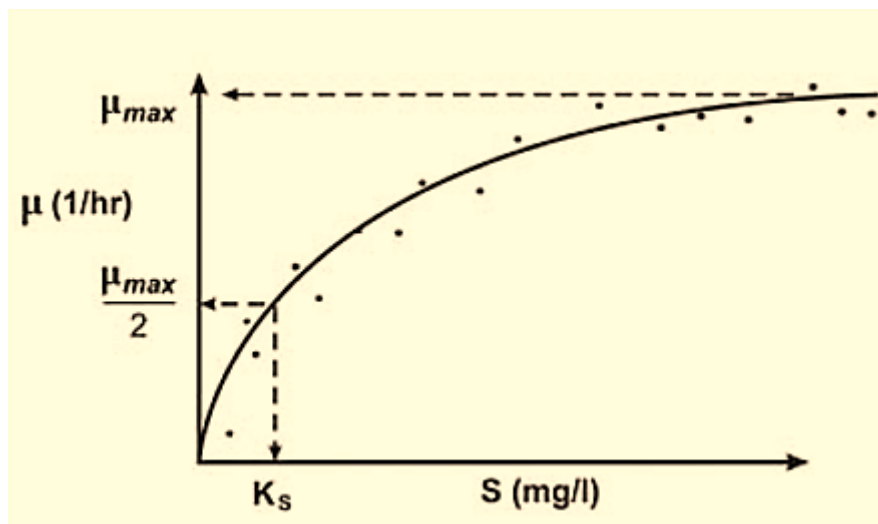


- Fase stazionaria: fase in cui il tasso di crescita delle microalghe uguaglia quello di morte, il numero di microrganismi resta costante e la presenza di nutrienti inizia a scarseggiare.
- Fase di morte: fase in cui il numero di cellule vive si riduce drasticamente; l'assenza di nutrienti nel terreno o la presenza di condizioni avverse alla crescita determina la morte delle cellule.

L'ampiezza temporale delle diverse fasi può variare in funzione di molteplici fattori: ad esempio, la fase di ritardo iniziale può dipendere dalle condizioni ambientali a cui i microrganismi si sono adattati mentre l'estensione temporale della fase esponenziale dipende fortemente dalla disponibilità di substrato in coltura ma anche dalla presenza di potenziali sostanze tossiche per la crescita.

### 1.1.1.1 Cinetica di Monod per la crescita microbica

Tra i vari modelli che descrivono la crescita della biomassa microbica, quello maggiormente utilizzato è stato proposto da Jacques Monod (figura 1.1.1):



**Figura 1.1.1:** Rappresentazione della curva di crescita della biomassa. Figura tratta con modifiche da: [https://www.hypertextbookshop.com/biofilmbook/v005/r002/Contents/01\\_Topics/02\\_Chapter\\_2/02\\_Section\\_2/03\\_Advanced/01\\_Page\\_1.html](https://www.hypertextbookshop.com/biofilmbook/v005/r002/Contents/01_Topics/02_Chapter_2/02_Section_2/03_Advanced/01_Page_1.html)

La velocità specifica di crescita della biomassa è ottenibile attraverso la relazione:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s}$$

dove  $\mu$  rappresenta la velocità specifica di crescita microbica [ $h^{-1}$ ];  $\mu_{max}$  è la velocità specifica massima di crescita;  $K_s$  è la concentrazione del substrato [mg/l] corrispondente alla metà della velocità specifica massima di crescita;  $S$  è la concentrazione del substrato limitante [mg/l].

## 1.1.2 Crescita in autotrofia ed eterotrofia a confronto

Nei processi di coltivazione industriale di microalghe, le strategie principali sono la coltivazione in modalità fotoautotrofa, ovvero in presenza di luce e di CO<sub>2</sub> atmosferica come fonte di carbonio, o eterotrofa, in assenza di luce e mediante l'utilizzo di substrati organici come acetato, glucosio o anche zuccheri di scarto (Ruiz et al., 2022).

### 1.1.2.1 Autotrofia

Le microalghe, includendo anche i cianobatteri, sono tra i più antichi organismi fotosintetici sulla terra (Hu et al., 2018): la capacità di convertire il carbonio inorganico atmosferico in biomassa organica sfruttando la luce solare le rende particolarmente adatte nei processi di riduzione dell'inquinamento ambientale causato dall'elevata presenza di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera, un noto gas serra responsabile del riscaldamento globale.

Il processo fotosintetico avviene in due tappe:

- Fase luce-dipendente: avviene all'interno dei cloroplasti, in cui l'energia solare viene sfruttata in una catena di trasporto degli elettroni al fine di produrre ATP e ridurre NADP<sup>+</sup> in NADPH;
- Fase oscura, o ciclo di Calvin: avviene nello stroma del cloroplasto; il carbonio inorganico viene organicato ottenendo gliceraldeide 3-fosfato tramite consumo delle molecole prodotte durante la fase luminosa.

Le molecole di gliceraldeide 3-fosfato ottenute durante il ciclo di Calvin vengono utilizzate per produrre glucosio attraverso la via metabolica della gluconeogenesi, o per ottenere acidi grassi oppure amminoacidi.

La crescita autotrofa dipende fortemente dalla presenza di CO<sub>2</sub> in quanto si stima che il carbonio presente nelle microalghe sia pari a circa il 50% di peso secco: per produrre 1 kg di biomassa microalgale sono necessari 1,83 kg di CO<sub>2</sub> (Abreu et al., 2022).

La concentrazione molto bassa di anidride carbonica nell'atmosfera (~0,04%) è un fattore che ne limita la diffusione nel mezzo di coltura, dunque spesso occorre acquistare e fornire CO<sub>2</sub> compressa o in forma di sali bicarbonati (Abreu et al., 2022).

Il costo di queste fonti di carbonio inorganico può rappresentare circa il 50% del costo totale di produzione della biomassa e la CO<sub>2</sub> può costituire circa il 66% del costo totale delle materie prime per la produzione di microalghe in un impianto su larga scala (Abreu et al., 2022).

Per la coltivazione su larga scala, si utilizzano solitamente sistemi aperti con bacini installati in corrispondenza della luce solare, i quali richiedono costi di realizzazione e funzionamento estremamente bassi ed una minore spesa energetica.

Diverse specie come *Spirulina*, *Dunaliella* e *Chlorella* sono coltivate con successo all'aperto per la produzione di proteine e pigmenti (Mata et al., 2010), tuttavia occorre considerare l'elevato rischio di contaminazione da agenti patogeni esterni che potrebbe comprometterne la purezza della coltura.

L'impiego a livello industriale di fotobioreattori chiusi (PBR) è spesso la tecnica più efficace nei processi di coltivazione autotrofi, portando alla produzione di composti di alta qualità, riducendo al minimo il rischio di contaminazione e garantendo l'axenicità delle colture. In questi processi, tuttavia, sono richiesti costi più elevati, dovuti principalmente alla progettazione, realizzazione e mantenimento in esercizio dei bioreattori.

Sia nei sistemi aperti che nei PBRs, la problematica più preoccupante è relativa alla fornitura della luce in maniera ottimale ed efficiente: nei sistemi aperti, la profondità della coltura nel bacino è limitata a circa 20 cm per ottenere la massima penetrazione della luce (Hu et al., 2018) mentre nei PBRs si cerca di ottimizzare la fornitura della fonte luminosa, anche se questo richiede una spesa energetica importante quando si utilizzano reattori con rapporto S/V elevato (Di Caprio et al., 2022).

Altri costi sono inoltre associati al mantenimento dell'agitazione costante nei bioreattori, ai sistemi di degasaggio per la rimozione di O<sub>2</sub> prodotto con la fotosintesi e al rifornimento di CO<sub>2</sub> a livelli adeguati.

In generale, si stima che le microalghe prodotte in questo tipo di processi abbiano un costo > 5 €/kg (Ruiz et al., 2016) ed inoltre, a seconda della tipologia di impianto, la richiesta energetica è compresa tra 6 e 16.000 kWh/kg (Di Caprio et al., 2022).

Anche i valori di produttività associati alla crescita autotrofa sono estremamente contenuti, con una densità cellulare generalmente inferiore a 5 g/L ed una resa in termini di biomassa prodotta solitamente più bassa di 1 g/L al giorno (Di Caprio et al., 2022), con risultati variabili a seconda della specie e delle condizioni di crescita applicate.

Dall'analisi degli studi effettuati fino ad ora, risulta come la densità massima cellulare di microalghe coltivate in PBRs sia stata pari a circa 40 g/L, mentre nei sistemi aperti non si superano i 10 g/L (Hu et al., 2018).

Per ottenere valori di produttività più elevati, si dovrebbe optare per l'utilizzo di fonti di energia alternative, realizzando processi di coltivazione in mixotrofia o eterotrofia.

In tabella 1.1.2 sono riportate nel dettaglio le modalità di coltivazione principali, mettendo a confronto la fonte energetica utilizzata e la tipologia di substrato.

**Tabella 1.1.2:** Confronto tra le fonti energetiche e di carbonio utilizzate per la crescita microalgale

	<i>Fonte Di Energia</i>	<i>Fonte Di Carbonio</i>
<i>Fotoautotrofia</i>	LUCE	INORGANICO
<i>Fotoeterotrofia</i>	LUCE	ORGANICO
<i>Chemoeterotrofia</i>	COMPOSTI ORGANICI	ORGANICO
<i>Mixotrofia</i>	LUCE E ENERGIA CHIMICA DA COMPOSTI ORGANICI	INORGANICO E ORGANICO

### 1.1.2.2 Eterotrofia

Il passaggio verso un processo di produzione eterotrofo presenta numerosi vantaggi, superando il principale problema della fornitura della luce (Bumbak et al., 2011).

Numerosi studi mostrano come diverse specie di *Chlorella*, come *C. protothecoides*, *C. vulgaris*, *C. minutissima* e *C. sorokiniana* siano in grado di crescere al buio, sfruttando diverse fonti di carbonio organico.

In questi processi è comunque determinante che la coltura di microalghe sia in condizioni axeniche, al fine di evitare la proliferazione di microrganismi quali batteri e muffe, i quali potrebbero diventare la biomassa dominante (Di Caprio et al., 2019).

Da un punto di vista economico, la spesa principale nelle coltivazioni eterotrofe è dovuta all'installazione di apparecchiature industriali, ricoprendo circa il 42% del totale costo di investimento, oltre al costo aggiuntivo della fonte di carbonio organico come acetato o glucosio (Hu et al., 2018).

Tuttavia, rispetto ai fotobioreattori che richiedono una fase di progettazione specifica per la specie algale di interesse, nei processi eterotrofi si impiegano dei fermentatori dal design universale; inoltre, al fine di ridurre i costi, il substrato organico può essere utilizzato sotto forma di materiale organico di scarto (Hu et al., 2018).

Nelle coltivazioni eterotrofe, i costi di produzione stimati con un'ottimizzazione del processo possono essere più bassi rispetto ai tradizionali processi autotrofi (circa 1,08 €/kg di peso secco) (Ruiz et al., 2022); inoltre, si possono raggiungere valori di concentrazione della biomassa fino a 286 g/L (Jin et al., 2020) con tassi di crescita più elevati ed una notevole riduzione dei tempi di coltivazione (Turon et al., 2015).

Analizzando dal punto di vista energetico i processi metabolici del processo eterotrofo, si riescono meglio a comprendere le ragioni per cui la prestazione migliore sia ottenuta in condizioni di oscurità.

Se si considera la sintesi della gliceraldeide-3-fosfato (G3P), la quale è un intermedio prodotto sia nel metabolismo autotrofo che eterotrofo, si stima che siano necessari circa  $1,15 \cdot 10^3$  kJ di energia luminosa per ottenere 2 mol di G3P, mentre la conversione di glucosio ne richiede solo 2,1 kJ (Abreu et al., 2022).

Il rapporto di conversione dell'energia in ATP è maggiore nel caso eterotrofo: il 18% dell'energia ottenuta può essere convertito in ATP in eterotrofia, mentre solo il 10% è stato convertito in condizioni fotoautotrofe (Yang et al., 2000).

Sebbene le colture autotrofe producano molto più ATP rispetto a quelle cresciute al buio per via del processo di fotofosforilazione che avviene nei cloroplasti, la quantità di energia richiesta per l'assimilazione della CO<sub>2</sub> nel ciclo di Calvin determina un notevole dispendio energetico, giustificando dunque la differenza nelle rese di ATP (Abreu et al., 2022).

In questo studio, l'attenzione sarà focalizzata sui processi eterotrofi, mettendone in risalto i vantaggi in termini di produttività rispetto ai tradizionali sistemi autotrofi.

In particolare, verrà utilizzato acetato come substrato organico: l'acetato viene convertito in acetil-CoA, che viene ulteriormente metabolizzato nei gliossisomi attraverso il ciclo del gliossilato oppure incorporato direttamente nel ciclo TCA (ciclo degli acidi tricarbossilici) che avviene nei mitocondri (Abreu et al., 2022). Attraverso questi percorsi metabolici si ottengono importanti intermedi per la produzione di amminoacidi e proteine.

### 1.1.3 Utilizzo di acetato come substrato organico

Nei processi di coltivazione delle microalghe, l'impiego di acetato come fonte di carbonio organico può essere di notevole interesse nella realizzazione della crescita eterotrofa.

Attualmente, la scelta delle materie prime ricade spesso su glucosio, saccarosio o amido, fonti commestibili che dovrebbero essere principalmente destinate alla catena alimentare umana (Kim et al., 2021). In alternativa, l'utilizzo di fonti meno costose e non commestibili porterebbe ad un superamento di tale problematica, soprattutto se destinate alla produzione di biocarburanti.

L'acido acetico potrebbe costituire un valido sostituto in tal senso: si tratta di un acido monocarbossilico a due atomi di carbonio avente formula  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , con un peso molecolare di 60 g/mol ed un valore di costante di dissociazione acida pari a 4,75.

Dalla dissociazione dell'acido acetico deriva la forma anionica dello ione acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) a pH fisiologico (Kim et al., 2021).

La produzione di acetato avviene principalmente attraverso processi chimici come la carbonilazione del metanolo, ma anche mediante processi biologici. In particolare, attraverso la via autotrofa Wood-Jungdahl, i batteri acetogeni producono acetato a partire dalla conversione di  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  (Kim et al., 2021).

L'acido acetico, tuttavia, è tossico per le cellule microbiche anche a concentrazioni inferiori a 5 g/L: pur essendo di natura idrofila, le ridotte dimensioni consentono alla molecola di passare attraverso la membrana cellulare per un fenomeno di semplice diffusione. Questo aspetto determina una diminuzione del pH intracellulare ed una acidificazione del citoplasma, perturbando dunque il potenziale di membrana (Kim et al., 2021).

Per tale motivo, nei processi eterotrofi occorre garantire un valore di pH compreso tra 6,5 e 7 (Lacroux et al., 2021) all'interno del mezzo di coltura, al di sopra dunque del valore di pKa dell'acido acetico al fine di mantenere la forma dello ione acetato. Si ritiene infatti che l'aumento del pH iniziale permetta di ridurre al minimo la concentrazione di acido indissociato (Lacroux et al., 2020).

Per il genere *Chlorella*, in condizioni ideali il pH deve essere compreso tra 7 e 8 per avere una crescita ottimale. La coltivazione in condizioni di pH al di fuori di questo intervallo può comprometterne la crescita e la riproduzione (Qui et al., 2017).

#### 1.1.3.1 Principali processi di produzione dell'acetato

L'acetato può essere utilizzato come fonte di carbonio organico, in alternativa al tradizionale glucosio: il suo costo di produzione (0,30-0,45 €  $\text{kg}^{-1}$ ) è più basso di quello del glucosio (0,50 €  $\text{kg}^{-1}$ ) (Kiefer et al., 2020) ed, inoltre, si limiterebbe l'impiego di zuccheri che dovrebbero essere destinati all'industria alimentare.

Attualmente, il principale processo di produzione dell'acido acetico è la carbonilazione del metanolo, il quale parte da precursori derivati dal petrolio ed ha un forte impatto ambientale in termini di  $\text{CO}_2$  prodotta, contribuendo dunque all'inquinamento atmosferico.

Oltre alla via di produzione sintetica, l'acetato può anche essere prodotto naturalmente: uno dei processi maggiormente sviluppati è la sintesi dell'acido acetico attraverso la fermentazione acetica ad opera di batteri aerobici noti come acetobatteri.

Questo processo è una fermentazione in due fasi: la prima fase è la fermentazione alcolica degli zuccheri, trasformati in etanolo dai lieviti; la seconda fase è l'ossidazione incompleta dell'etanolo da parte dei batteri *Acetobacter*.

Tuttavia, questo processo richiede dei costi più elevati, da 0,9 € a 1,5 € per kg di acetato prodotto (Turon et al., 2016), ed inoltre sono necessari dei processi di purificazione dell'acetato finale, il quale deve essere separato in un mezzo che contiene batteri ed altri residui cellulari.

Un'ulteriore alternativa potrebbe essere quella di produrre l'acetato attraverso processi termochimici, come la pirolisi.

La pirolisi è appunto un processo di trattamento termico (le temperature sono comprese tra 300 e 800 °C) utilizzabile per la conversione energetica di substrati organici a basso contenuto d'acqua, come le biomasse di scarto derivanti dalle lavorazioni agroalimentari.

Nel caso della produzione di acetato, questo può essere ottenuto dalla decomposizione non ossidativa di biomassa solida secca di cellulosa, emicellulosa e lignina.

La frazione liquida raccolta, nota come bio-olio, sarà ricca di componenti come l'acetato, presente in concentrazioni comprese tra 5 e 157 g/L (Sarchami et al., 2021).

Tuttavia, per i processi termochimici come la pirolisi, lo svantaggio principale è la bassa selettività, che porta ad ottenere diversi prodotti in cui l'acetato è miscelato con altri composti organici, dunque sono richiesti degli opportuni trattamenti di purificazione.

Un'altra tipologia di via biotecnologica per la produzione di acetato è la fermentazione anaerobica ad opera di diverse specie di batteri idrolitici, acetogeni e metanigeni, in un articolato processo che porta a convertire rifiuti organici complessi in biogas. In questo tipo di processo, l'acetato viene ottenuto come prodotto intermedio.

Infatti, la fermentazione anaerobica è articolata in diverse fasi: idrolisi, acidogenesi (produzione di acidi organici), acetogenesi (produzione di acetato e H<sub>2</sub>) e metanogenesi (conversione di H<sub>2</sub> e acetato in metano) (Ramos-Suarez et al., 2021).

La realizzazione di un processo di questo tipo per il trattamento delle acque reflue può essere estremamente vantaggiosa: l'acetato prodotto come intermedio può essere sfruttato come substrato organico per la crescita delle microalghe; inoltre, anche altri composti a base di azoto e fosforo presenti potrebbero essere valorizzati come nutrienti per la crescita microalgale.

Di conseguenza, si riuscirebbe a realizzare un processo di trattamento degli effluenti grazie alla presenza delle microalghe: gli inquinanti esistenti, espressi come COD, azoto totale (TN) e fosforo totale (TP), possono dunque essere rimossi.

Anche il rifiuto liquido derivante dalla fase di metanogenesi, ovvero il digestato anaerobico, che è ricco principalmente di elementi inorganici come N e P, potrebbe essere una potenziale fonte di nutrienti per la crescita microalgale (Bauer et al., 2021).

### 1.1.3.2 Produzione di acetato da fermentazione gassosa

Un'altra modalità per ottenere acetato è il processo di fermentazione gassosa, in cui i gas CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> vengono convertiti in acetato e altri prodotti di valore (es. etanolo, butanolo, butirrato) tramite la via metabolica di Wood-Ljungdahl (WLP).

Il WLP è costituito da due diversi percorsi metabolici: il ramo metilico e il ramo carbonilico.

Nel ramo metilico, una molecola di CO<sub>2</sub> viene ridotta in metil-CoFeSP con consumo di una molecola di ATP; nel ramo carbonilico, invece, avviene la riduzione di un'altra molecola di CO<sub>2</sub> in CO e la successiva sintesi di acetyl-CoA, legando questo gruppo carbonilico e il metil-CoFeSP ottenuto nel ramo metilico (Ragsdale et al., 2008).

L'acetyl-CoA prodotto viene convertito in acetato generando di 1 molecola di ATP.

Di seguito, sono riportate le reazioni per ottenere acido acetico a partire da CO e H<sub>2</sub>:

- $4 \text{ CO} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ CO}_2$  ( $\Delta G^\circ = - 175 \text{ kJ mol}^{-1}$ )
- $4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ H}_2\text{O}$  ( $\Delta G^\circ = - 95 \text{ kJ mol}^{-1}$ )

I ceppi acetogeni più studiati per la produzione di acetato comprendono alcune specie come *A. woodii*, *Thermoanaerobacter kivuii* e *M. thermoacetica*.

Tuttavia, la produzione di acetato da parte di questi batteri è accompagnata dalla produzione di altri composti organici come l'acido formico ma anche etanolo, butirrato e lattato, con concentrazioni variabili a seconda delle specie microbiche e dei parametri operativi impiegati.

Ad oggi, una delle problematiche principali relativa alla produzione di acetato da fermentazione gassosa è, appunto, la ridotta selettività del processo, richiedendo dunque delle operazioni a valle di purificazione del prodotto di interesse.

In aggiunta, vi sono degli ulteriori limiti relativamente alla produzione a livello industriale, per via del basso valore economico dell'acetato prodotto e degli alti costi di produzione (4,72 €/ kg) (Christodoulou et al., 2016).

Questo lavoro di tesi potrebbe portare a rendere il processo di fermentazione gassosa per la produzione di acetato più sostenibile, considerando che l'acetato prodotto potrebbe essere valorizzato come substrato organico per la crescita delle microalghe, al fine di ottenere preziosa biomassa ad alto valore aggiunto che potrebbe trovare applicazione in molteplici campi, come quello alimentare, cosmetico o farmaceutico.

Inoltre, è stato proposto anche di valorizzare la biomassa batterica impiegata nel processo di fermentazione, la quale potrebbe costituire una valida alternativa alle tradizionali fonti proteiche utilizzate per i mangimi degli animali acquatici.

Nel presente studio sarà inoltre superato il rischio della contaminazione batterica nel caso della coltivazione eterotrofa: l'impiego di effluenti ricchi di acetato derivanti dal processo di fermentazione gassosa ad opera di batteri acetogeni non ha, infatti, alcun effetto negativo sulla qualità del prodotto finale.

Questo aspetto è spiegato considerando che l'effluente di fermentazione gassosa proviene da reattori sterilizzati, utilizzati per avere delle colture pure nel corso del processo; inoltre, al termine della fermentazione gassosa, i batteri anaerobici residui sopravvissuti non possono proliferare in condizioni aerobiche, quando esposti all'aria (e dunque all'ossigeno).

Questo aspetto consente di giustificare l'impiego di tali effluenti per la crescita microalgale: il mantenimento di un ambiente sterile ed in condizioni axeniche può essere garantito, al fine di realizzare un processo eterotrofo ad alte prestazioni.

#### 1.1.4 Caratteristiche del terreno di coltura

La composizione del terreno di coltura richiede la presenza di macro e micronutrienti a base di carbonio (C), azoto (N), fosforo (P), potassio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca), zolfo (S), ferro (Fe), rame (Cu), manganese (Mn) e zinco (Zn), fondamentali per la crescita e riproduzione delle microalghe (Mandalam e Palsson, 1998).

Tra i vari nutrienti presenti, le fonti di carbonio, azoto e fosforo condizionano maggiormente il processo produttivo, dunque risulta essenziale controllare i rapporti C:N:P per ottenere delle rese ottimali.

L'azoto può essere fornito in diverse forme: come nitrato  $\text{NO}_3$ , nitrito  $\text{NO}_2$ , ammonio  $\text{NH}_4$  oppure come urea  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ .

Tuttavia, l'assimilazione del nitrato è più complessa in quanto dovrebbe essere ridotto a nitrito nel citosol, per poi essere ridotto ad ammonio nei cloroplasti o plastidi (Je e Yamaoka, 2022).

Di conseguenza, si preferisce utilizzare come fonte di azoto l'ammonio, essendo questo già direttamente assimilabile per l'ottenimento di importanti biomolecole quali amminoacidi, proteine, acidi nucleici.

Tuttavia, se presente in quantità eccessive, l'ammonio risulta essere tossico per le alghe in quanto induce il danneggiamento del complesso enzimatico PSII (Je e Yamaoka, 2022).

Il fosforo è assimilato sotto forma di  $\text{PO}_4^{3-}$ , dunque viene principalmente aggiunto al terreno come ortofosfato (Lacroux et al., 2021).

Come riferimento, si considera un rapporto molare ideale C:N:P pari a 106:16:1 per il genere *Chlorella* (Lacroux et al., 2021), anche se questo rapporto può avere delle variazioni a seconda della specie.

Rapporti C:N più elevati portano ad avere una carenza di azoto, determinando la produzione di composti di riserva a base di carbonio come lipidi e zuccheri (Sajjadi et al., 2018).



## 1.2 Principali soluzioni reattoristiche

Nei processi fotoautotrofi, cercando di sfruttare al meglio la luce, si utilizzano dei sistemi con dei bacini aperti (*open ponds*) al fine di imitare il più possibile l'habitat naturale delle microalghe. La forma più comune è quella "raceway", un fotobioreattore aperto con una caratteristica forma ovale (figura 1.2a). Questa tipologia presenta diverse criticità come l'eccessiva evaporazione del liquido, un elevato rischio di contaminazione biologica ed una bassa produttività dell'impianto (0,3-0,4 g/L).

Altri tipi di fotobioreattori sono quelli chiusi, del tipo tubolare (figura 1.2b), elicoidale o *flat panel*: tali sistemi permettono un maggior controllo delle condizioni ottimali di crescita come il controllo del pH, della temperatura e un minor rischio di contaminazioni delle colture, ma richiedono comunque un adeguato rifornimento di luce e dunque un notevole dispendio energetico.



**Figura 1.2:** Immagine di impianto Raceway (a) e fotobioreattori (PBRs) tubolari (b).

I PBRs impiegati su larga scala hanno diversi svantaggi che li rendono poco adatti alla produzione di biomassa a basso costo: per grandi volumi operativi, compresi tra 50-100 L, la dispersione della luce non avviene in maniera efficiente ed uniforme; inoltre, lo sviluppo e la crescita del biofilm algale tende ad accumularsi anche sulle superfici laterali del reattore, limitando ulteriormente la corretta penetrazione della luce (Perez-Garcia et al., 2010).

La coltivazione eterotrofa permette di superare queste problematiche, consentendo l'uso di fermentatori tradizionali come bioreattori su scala industriale.

Questi sistemi hanno un monitoraggio continuo delle condizioni di pH, temperatura, miscelazione, livelli di ossigeno e della fonte di carbonio presenti; il processo può avvenire in modalità batch, continua o fed-batch, ottenendo una densità cellulare molto elevata senza limitazioni dovute all'effetto di auto ombreggiamento che si verifica nei sistemi fotoautotrofi (Hu et al., 2018).

Generalmente, per avere un controllo ottimale della coltivazione ed evitare la contaminazione delle colture, si sceglie la modalità batch o fed-batch.

Rispetto alla coltura in modalità discontinua che rappresenta la tecnica più semplice per la realizzazione del processo, la tipologia fed-batch può risultare più vantaggiosa in quanto i nutrienti vengono alimentati in modo continuo o intermittente nel brodo di coltura, mantenendo dunque una concentrazione di nutrienti ad un livello ottimale per la crescita delle microalghe (Xie et al., 2023).

In un'ottica di scale up del processo, si inizia partendo da colture in piccoli volumi per poi passare a volumi crescenti (Doucha et al., 2011). In questo modo si riesce a ridurre il tempo di latenza dato che le colture saranno sempre nella loro fase di crescita esponenziale.

### 1.2.1 Scale-up del processo: autotrofia ed eterotrofia a confronto

Per testare l'efficacia del processo eterotrofo e metterne in luce i vantaggi relativi alla fase di scale-up, un recente studio riportato da *Barros et al.* ha utilizzato inoculi di *C. vulgaris* coltivati sia in presenza di luce nei tradizionali processi fotoautotrofi, sia in assenza di luce e con un substrato organico come il glucosio.

In questo studio, per mantenere le cellule al massimo del loro tasso di crescita, le colture autotrofe erano trasferite alla fase di incremento successivo ogni 7 giorni, fino al raggiungimento della quantità necessaria di inoculo per alimentare dei *flat panel (FP)* da 1 m<sup>3</sup> (Barros et al., 2019).

Il percorso di incremento autotrofico fino al raggiungimento del volume finale, complessivamente, durava 35 giorni (Barros et al., 2019). Al contrario, l'impiego di inoculi coltivati in maniera eterotrofa trasferiti in volumi crescenti è stato effettuato in 4,3 giorni, dunque con una riduzione di 8 volte del tempo di scale-up (Barros et al., 2019).

Inoltre, il processo eterotrofo ha portato ad una diminuzione di 100 volte del volume richiesto per avviare un FP, rispetto agli inoculi ottenuti in condizioni autotrofe che richiedevano l'utilizzo di volumi molto più elevati (Barros et al., 2019).

Questi aspetti confermano quanto i processi eterotrofi siano vantaggiosi anche in termini di riduzione dei tempi di coltivazione e area occupata, oltre al fatto di raggiungere livelli di produttività in termini di biomassa prodotta di gran lunga superiori.

### 1.3 Descrizione del genere *Chlorella*

Tra le specie più sfruttate in ambito commerciale, il genere *Chlorella* è ampiamente utilizzato.

Questa specie appartiene alla famiglia *Trebouxiophyceae* sotto la divisione di *Chlorophyta*, ovvero delle alghe verdi (Lizzul et al., 2018).

Attualmente, vi sono più di 20 specie di *Chlorella* classificate e circa 100 ceppi descritti. Si tratta di microrganismi unicellulari caratterizzati da una parete cellulare liscia e forma sferica, con un diametro di dimensioni variabili tra 2-10  $\mu\text{m}$  (Lizzul et al., 2018).

Le specie *Chlorella* vivono principalmente in acqua dolce, ma alcune specie si trovano anche in acque salate. Si tratta di autospore che si riproducono per via asessuata attraverso la mitosi (Yamamoto et al., 2004).

I prodotti a base di questa tipologia di microalga hanno nutrienti e vitamine, tra cui D e B12, in quantità superiore rispetto ad altri alimenti di origine vegetale. Si segnalano, inoltre, numerose proprietà associate all'impiego di *Chlorella* nell'alimentazione, tra cui azione antiossidante, antidiabetica ed antipertensiva (Bito et al., 2020).

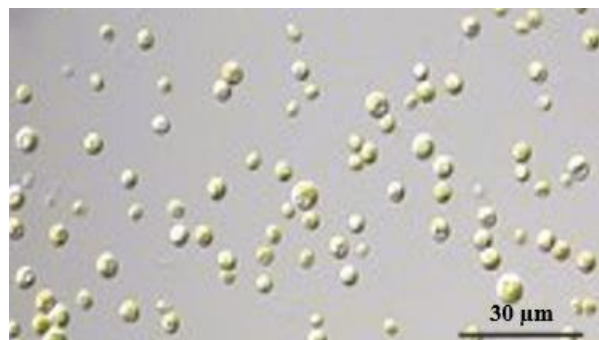
Si distinguono principalmente tre varietà appartenenti a questa categoria di microalghe, ovvero *C. vulgaris*, *C. lobophora*, e *C. sorokiniana* (Bito et al., 2020).

#### 1.3.1 *Chlorella Sorokiniana*

*Chlorella sorokiniana* è una sottospecie isolata per la prima volta nel 1953 da Sorokin: originariamente era considerata un mutante termotollerante di *Chlorella pyrenoidosa* (Sorokin et al., 1953). Questa identificazione tassonomica è stata successivamente modificata durante la fine degli anni '80 quando *C. sorokiniana* venne classificata come una sottospecie ben definita (Lizzul et al., 2018).

Si tratta di una microalga di ridotte dimensioni, circa 2-4,5  $\mu\text{m}$  di diametro, capace di sfruttare svariate fonti di carbonio ed azoto per la propria crescita, con preferenza per zuccheri come glucosio o acidi organici semplici come l'acetato (Lizzul et al., 2018).

Tale specie ha un notevole potenziale a livello industriale, in quanto è in grado di crescere in ambienti sfavorevoli per altre specie algali (Lizzul et al., 2018). Questo la rende particolarmente versatile e capace di resistere alle variazioni ambientali (Je e Yamaoka, 2022).



**Figura 1.3:** Immagine di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k da microscopia ottica. Figura tratta con modifiche da: [http://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str\\_number=211-8k](http://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=211-8k)

La crescita di questa tipologia di microalghe è fortemente condizionata da numerosi fattori di natura abiotica e biotica come la concentrazione di nutrienti nel mezzo di coltura, le condizioni di salinità, la temperatura, il pH, l'aerazione del mezzo, la presenza di ioni metallici, la presenza di agenti patogeni come batteri, funghi, muffe che potrebbero contaminare le colture.

### 1.3.2 Produzione di proteine da *Chlorella*

Nei prodotti a base di *Chlorella*, circa il 59% di peso secco è rappresentato da proteine, un valore superiore a quello ottenuto dalla soia (circa il 33% su base secca) (Bito et al., 2020).

La composizione amminoacidica di questi prodotti comprende gli amminoacidi essenziali per l'uomo (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina e istidina) oltre a quelli non essenziali quali glicina, alanina, acido aspartico, acido glutammico, serina, arginina, cisteina, prolina, tirosina.

Se si valuta l'indice degli amminoacidi essenziali (EAAI) utilizzato al fine di valutare la qualità delle proteine per l'alimentazione umana, la qualità di *C. pyrenoidosa* (EAAI, 1.35) è nettamente superiore rispetto a quella ottenuta dalle proteine della soia (EAAI, 0,66) (Bito et al., 2020).

Tuttavia, la presenza della parete cellulare cellulosa, che rappresenta circa il 10% della sostanza secca delle microalghe, costituisce un serio problema per la digeribilità della biomassa essendo questa composta da cellulosa, non digeribile per l'uomo. Dunque, si rendono necessari dei trattamenti opportuni per distruggere la parete cellulare e rendere così disponibile il contenuto proteico (Becker, 2006).

Analisi approfondite di numerosi studi dimostrano come le proteine derivanti dalla biomassa di microalghe siano di alta qualità ma, ad oggi, l'utilizzo di questi prodotti nell'alimentazione umana è ancora molto limitato ed i maggiori campi di utilizzo restano relegati alla produzione di integratori alimentari, prodotti cosmetici e mangimi per animali.

L'ostacolo principale resta la difficoltà di ottenere dei prodotti che siano appetibili in termini di gusto ed odore (Becker, 2006).

Considerando le informazioni disponibili sulle possibili proprietà tossiche o sui possibili effetti negativi che potrebbero avere le diverse tipologie di microalghe testate, finora nessun effetto avverso è stato registrato.

Oltre al contenuto proteico, circa il 17% del peso secco è rappresentato da carboidrati, prevalentemente in forma di fibre alimentari, mentre circa l'11% del peso secco costituisce la frazione lipidica (Bito et al., 2020).

## 2. Scopo del lavoro

L'obiettivo del presente lavoro è quello di valutare la crescita eterotrofa di *Chlorella Sorokiniana* utilizzando acetato come fonte di carbonio organico al fine di ottenere biomassa ad alto valore aggiunto.

In particolare, è stata effettuata un'analisi del contenuto proteico valutando il profilo degli amminoacidi ottenuti.

Questi risultati sono stati poi confrontati con quelli ottenuti attraverso la modalità fotoautotrofa, mettendone in luce le criticità in termini di produttività della biomassa ottenuta.

### 2.1 Attività sperimentale in laboratorio

L'approccio adottato si basa su un processo articolato in diverse fasi principali:

- Conversione della materia prima a base di CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> in acetato ad opera del ceppo batterico *Thermoanaerobacter kivui*, un acetogeno termofilo Gram-negativo che cresce in condizioni ottimali ad una temperatura di 66 °C e ad un valore di pH di 6,4. Questa fase avviene in un reattore agitato meccanicamente (STR).
- Crescita della microalga *Chlorella Sorokiniana* in fotobioreattori di laboratorio, realizzando il processo sia in autotrofia che in eterotrofia successivamente, al fine di effettuare un confronto tra queste due metodologie.
- Analisi del profilo amminoacidico ottenuto analizzando la biomassa prodotta in autotrofia ed eterotrofia attraverso tecniche cromatografiche.
- Analisi della variazione del profilo di concentrazione di acetato, valutando come questo sia consumato in coltura dalle microalghe.
- Analisi della biomassa di *Thermoanaerobacter kivui* raccolta in termini di profilo amminoacidico, al fine di confermare la sua potenziale applicazione per l'alimentazione degli organismi acquatici, come hanno già dimostrato altri ceppi acetogeni.

Nel presente lavoro di tesi, lo studio ha riguardato principalmente la realizzazione in laboratorio di processi di coltivazione di *Chlorella sorokiniana* in autotrofia ed eterotrofia, sfruttando in quest'ultimo caso l'acetato prodotto nel precedente step di fermentazione gassosa (non riportato in questo lavoro) come fonte di carbonio per la propria crescita.

L'analisi ha posto l'attenzione sull'utilizzo di concentrazioni crescenti di acetato in coltura, evidenziando come questi processi siano estremamente influenzati dal controllo del livello di pH e dal mantenimento delle condizioni di axenicità delle colture.

In ultima analisi, è stato riportato lo studio del contenuto proteico della biomassa prodotta, ottenuto attraverso tecniche cromatografiche.



### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Ceppo utilizzato nel lavoro di tesi e mantenimento delle microalghe

*Chlorella Sorokiniana* SAG 211/8k è stata raccolta dalla collezione di colture di alghe presso l'Università di Gottingen (SAG) e mantenuta in piastre sterili contenenti il terreno di crescita BG-11 (Appendice 1).

Il terreno BG-11, se confrontato con altri terreni come BBM, TAP, Chu 10 e D medium, è quello con le caratteristiche migliori per la crescita microalgale ed è un derivato del terreno n.11 comunemente utilizzato per la coltivazione di cianobatteri (Pandey et al., 2023).

BG-11 ha una composizione media tale da fornire tutti i nutrienti essenziali necessari per la coltivazione (Appendice 1): in particolare, sono presenti alti livelli di fosfato e micronutrienti.

Il terreno è stato arricchito con 20 g/L di D-glucosio per verificare che all'interno delle piastre le colture non fossero contaminate da agenti patogeni esterni.

La preparazione del terreno prevede l'aggiunta dei vari componenti nelle quantità previste, mediante l'impiego di una microbilancia di precisione; successivamente, il terreno è stato sterilizzato in autoclave verticale da banco (Savatec modello 760) per circa 50 min.

Infine, le piastre sterili (Greiner Bio-One cell culture dishes) sono state riempite con il terreno precedentemente sterilizzato, effettuando l'operazione sotto cappa biologica (Biological Safety Cabinet Class II BSC- G3).

##### 3.1.1 Caratteristiche del terreno BG-11

Il carbonio è l'elemento principale presente in *Chlorella* e può rappresentare tra il 51,4% e il 72,6 % del peso secco (Mandalam e Palsson, 1998). Dunque, la presenza di macronutrienti a base di carbonio è fondamentale all'interno del terreno.

Il terreno BG-11 prevede l'aggiunta di glucosio come fonte di carbonio, in quanto la sua presenza determina un aumento del tasso di respirazione in modalità eterotrofa e, quindi, un incremento nella resa di biomassa (Pandey et al., 2023).

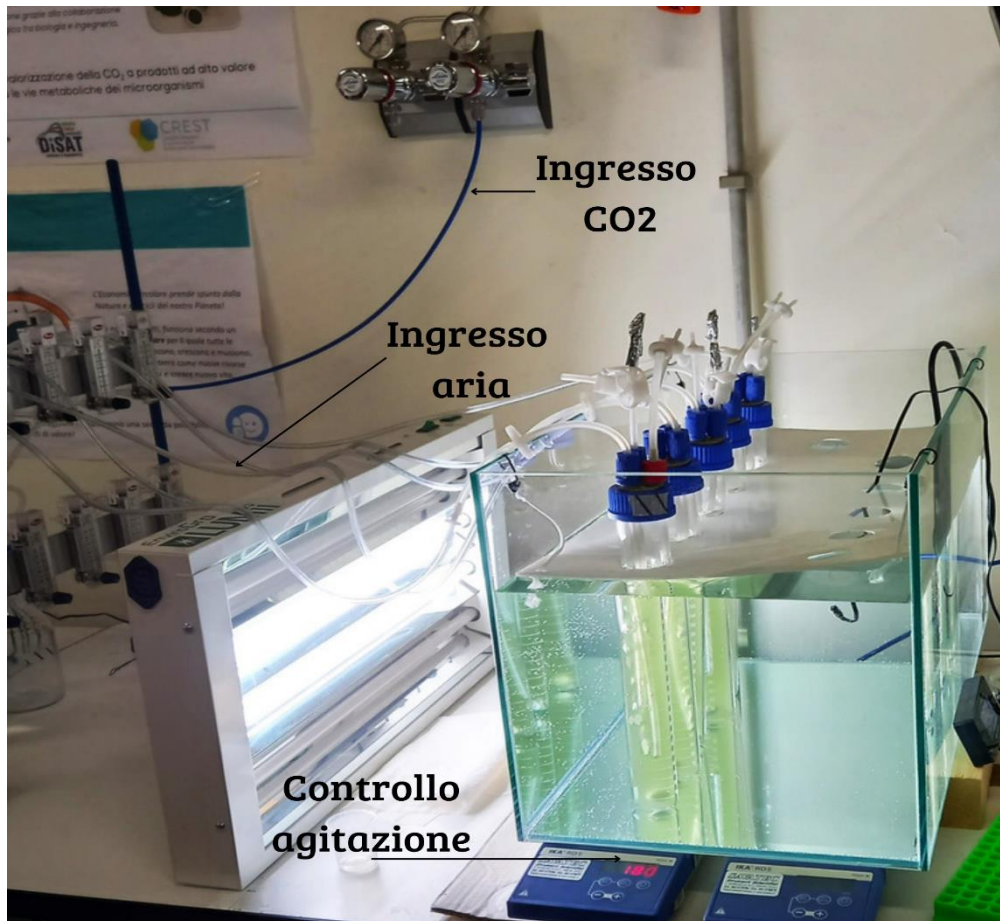
Oltre al carbonio, anche la presenza di azoto e fosforo è fondamentale per la crescita microalgale; altri componenti importanti sono sodio, magnesio, calcio, potassio e zolfo, i quali sono presenti come  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Pandey et al., 2023).

I micronutrienti in BG-11 sono presenti in quantità significativamente inferiori rispetto ai macronutrienti. Questi componenti sono presenti come  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .

Citrato ferrico di ammonio è combinato con acido citrico per creare la soluzione di citrato di ferro, che è presente in BG-11 in tracce (Pandey et al., 2023).

## 3.2 Configurazione dei fotobioreattori di laboratorio

Per la realizzazione degli esperimenti in modalità discontinua su scala di laboratorio, sono stati utilizzati dei fotobioreattori tubolari di capacità pari a 200 ml posti all'interno di una vasca di vetro la quale incorpora un bagnomaria controllato termostaticamente (figura 3.2.1).



**Figura 3.2.1:** Immagine del sistema impiantistico di laboratorio usato per la coltivazione di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k in fotoautotrofia.

Il vetro permette la penetrazione della luce proveniente da due sistemi di illuminazione artificiale (EnviroGro by LUMii T5 TLED) composti da 4 lampade fluorescenti, posti ai due lati della vasca ad una distanza di 30 cm.

L'agitazione è stata mantenuta costante tramite un agitatore magnetico digitale a cinque posizioni progettato per avere un'agitazione sincrona (Savatec Magnetic Stirrer IKA RO-5).

I reattori tubolari utilizzati in laboratorio sono in vetro borosilicato ed hanno un diametro esterno di 40 mm mentre l'altezza totale è pari a 300 mm.

Tali bioreattori sono dotati di un tubo per l'ingresso dell'aria il quale è dotato di filtro da 0,22  $\mu\text{m}$  e si estende per circa due terzi dell'altezza totale del reattore; un secondo tubo di sfiato per l'uscita del gas, ed un ultimo tubo di prelievo dotato di valvola di ritegno, che si estende anch'esso all'incirca quanto il tubo di ingresso (figura 3.2.2).



La presenza di quest'ultimo tubo è fondamentale per il prelievo e lo svolgimento dei campionamenti ad intervalli di tempo programmati, al fine di controllare durante l'esperimento l'evoluzione della crescita microalgale.



**Figura 3.2.2:** Immagine del fotobioreattore di laboratorio usato per la coltivazione di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k.

Per l'ingresso di aria all'interno dei fotobioreattori (aria o aria addizionata di CO<sub>2</sub>), sono stati utilizzati dei flussometri sintonizzabili per regolarne la portata (Figura 3.2.3).



**Figura 3.2.3:** Immagine dei flussometri sintonizzabili presenti nel sistema impiantistico di laboratorio usato per la coltivazione di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k.

All'interno del sistema impiantistico analizzato, l'aria viene distribuita tramite aria compressa e miscelata insieme alla CO<sub>2</sub> nei processi autotrofi. La CO<sub>2</sub> proviene da un contenitore dedicato.

Nell'impianto, dunque, è presente un sistema di miscelazione per consentire la miscelazione di aria e CO<sub>2</sub>; il gas in entrata passa successivamente in un umidificatore, operazione che consente di impedire che all'interno dei reattori avvenga l'evaporazione dei terreni di coltura (figura 3.2.4).



**Figura 3.2.4:** Immagine del sistema di miscelazione e umidificazione dell'aria in ingresso ai PBRs.

I fotobioreattori, prima del loro utilizzo, sono stati sterilizzati in autoclave.

Le operazioni che comprendono la preparazione dell'inoculo ed il riempimento dei fotobioreattori sono state svolte in condizioni di axenicità, lavorando sotto cappa biologica (Biological Safety Cabinet Class II BSC- G3) per impedire eventuali contaminazioni delle colture.

### 3.3 Fase I: coltivazione in fotoautotrofia

La coltivazione fotoautotrofa è stata condotta nel sistema impiantistico descritto in precedenza (figura 3.2.1), impostando un flusso d'aria di 100 ml/min, 1% di CO<sub>2</sub> e 300 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> di intensità luminosa.

Le colture sono state mantenute a 35°C e ad un livello di agitazione di 150 giri al minuto durante la coltivazione.

Le fasi principali del processo hanno riguardato la preparazione del terreno di coltura (medium M8, appendice 2) e la successiva filtrazione del mezzo utilizzando un sistema di microfiltrazione a vuoto (GVS Vacuum Filtration System 500 ml PES 0,22 µm).

Il pH iniziale è stato fissato a 6,7 mediante l'utilizzo del pH-metro.

Successivamente, è stato prelevato l'inoculo di *Chlorella Sorokiniana* dalle piastre di mantenimento, aggiungendolo progressivamente all'interno del mezzo di coltura contenente i sali M8 in condizioni axeniche.

Tutte le colture così ottenute al tempo iniziale partivano da un OD<sub>750</sub> = 0,2 ± 0,01.

Nel corso della prova sperimentale, sono stati eseguiti dei campionamenti ad intervalli di tempo programmati al fine di controllare l'evoluzione della crescita microalgale nei bioreattori (figura 3.3) ed, eventualmente, la presenza di contaminanti.

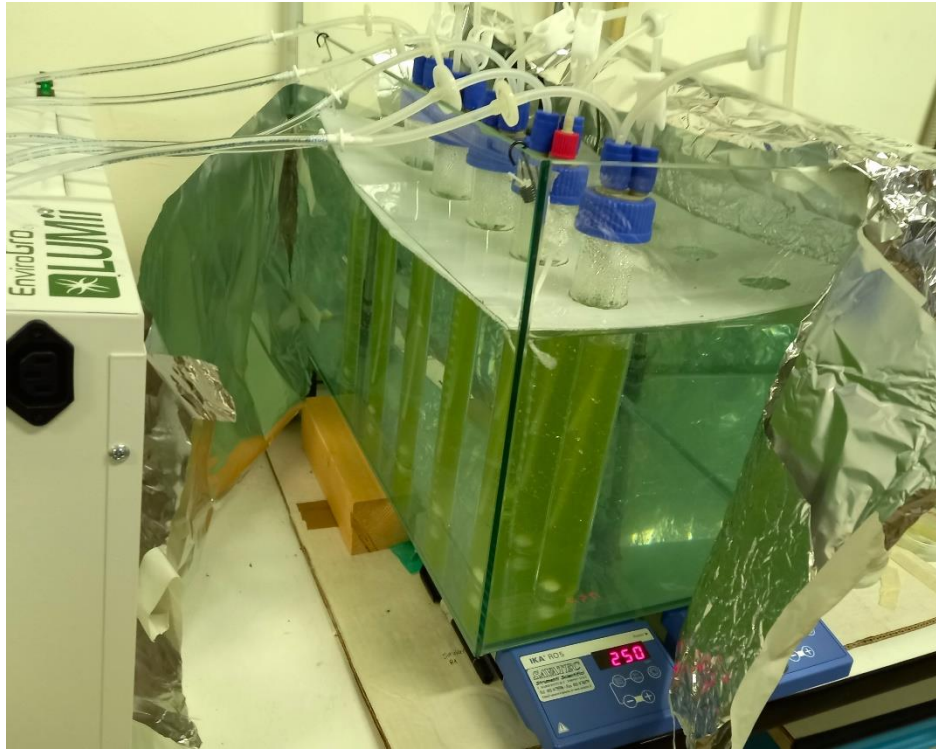
La prova è stata interrotta al termine della fase di crescita esponenziale e, successivamente, la biomassa ottenuta è stata raccolta ed analizzata.



**Figura 3.3:** Crescita di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k in fotoautotrofia.

### 3.4 Fase 2: coltivazione in eterotrofia

Per la coltivazione eterotrofa, il sistema originario composto dalla vasca esterna di vetro contenente i fotobioreattori tubolari ed il bagno termostato è stato completamente ricoperto con fogli di alluminio (figura 3.4) per impedire la penetrazione della luce.



**Figura 3.4:** Immagine del sistema impiantistico di laboratorio usato per la coltivazione di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k in eterotrofia.

Per lo studio della crescita eterotrofa delle microalghe, sono state testate le seguenti concentrazioni di acetato: 1.1 g/L, 3.3 g/L e 5.5 g/L.

Per ottenere queste concentrazioni, è stata prelevata una quantità prestabilita dell'effluente R-7 ricco di acetato (non riportato) proveniente dal reattore di fermentazione gassosa.

La conversione della materia prima a base di CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> in acetato ad opera del ceppo batterico *Thermoanaerobacter kivuii* non è stata approfondita in questo studio.

Il terreno ricco di acetato è stato successivamente centrifugato a 5000 giri al minuto e 15°C per 15 minuti mediante l'impiego della centrifuga (Thermo Scientific SL 16R Centrifuge).

Il surnatante raccolto dopo centrifugazione dell'effluente della fermentazione gassosa è stato diluito direttamente nel mezzo M-8 (appendice 2), in modo da ottenere le concentrazioni sopra elencate.

NH<sub>4</sub>Cl è stato utilizzato come fonte supplementare di azoto fino ad ottenere un rapporto molare C:N pari a 6.6, per evitare che la crescita in coltura venisse rallentata da una carenza di azoto, limitando dunque la percentuale proteica di interesse.

Il pH del terreno iniziale è stato impostato ad un valore di 7.8, valore ideale per non avere un'inibizione della crescita di *Chlorella Sorokiniana* a causa della presenza eccessiva di acido acetico nel mezzo.

Il terreno è stato quindi sterilizzato mediante microfiltrazione come nel caso autotrofo, utilizzando un sistema di filtrazione da vuoto (GVS Vacuum Filtration System 500 ml PES 0,22  $\mu\text{m}$ ).

È stato aggiunto l'inoculo di *Chlorella Sorokiniana* dalle piastre di mantenimento come nel caso autotrofo, facendo attenzione a garantire l'axenicità della coltura.

Anche in questo caso, le colture così allestite partivano da un  $\text{OD}_{750} = 0,2 \pm 0,01$ .

Per ciascuna concentrazione iniziale di acetato, le colture sono state riprodotte in triplicato, ottenendo le stesse condizioni iniziali all'interno dei bioreattori.

Durante le prove tutti i reattori sono stati mantenuti a 35°C, 150 giri al minuto di agitazione ed in assenza di luce. L'aria è stata distribuita con un flusso di 100 ml/min.

Dopo aver testato queste concentrazioni, è stata condotta un'ulteriore prova utilizzando il surnatante dell'effluente senza diluizione, corrispondente ad una concentrazione di acetato di 13,3 g/L. In questo caso i sali M-8 sono stati aggiunti direttamente all'effluente.

Il pH iniziale è stato fissato a 8. Le altre condizioni di coltivazione erano identiche a quelle delle prove precedenti.

### 3.5 Quantificazione della biomassa microalgale

La quantificazione della biomassa microalgale ( $X$ ) è stata ottenuta attraverso la misurazione della densità ottica a 750 nm ( $\text{OD}_{750}$ ) utilizzando lo spettrofotometro DH-5000 Spectrophotometer (HACH, USA).

Queste misure hanno permesso di monitorare ad intervalli di tempo programmati la crescita microalgale nelle colture sperimentali.

La possibile presenza di agenti contaminanti in coltura è invece stata monitorata qualitativamente mediante analisi dei campioni al microscopio ottico (Nexcope NE620 Biological Microscope).

Inoltre, la presenza di contaminazione è stata valutata qualitativamente anche alla fine di ciascuna prova sperimentale prelevando un'aliquota della coltura finale presente nei fotobioreattori e mantenendola in piastre BG -11 arricchite con 20 g/L di glucosio.

### 3.6 Valutazione del peso secco

La relazione diretta tra il peso secco della biomassa microalgale (DW, g/L) e la OD<sub>750</sub> è stata ottenuta coltivando *Chlorella* in modalità eterotrofa in 120 ml di terreno M-8 con l'aggiunta di 13,5 g/l di acetato di sodio, in beute da 500 ml.

Le beute sono state incubate a 35°C, 150 giri al minuto, in totale assenza di luce.

Sono stati raccolti diversi campioni in un intervallo compreso tra 0,1-5,0 g/l: la concentrazione di biomassa (DW, g/l) è stata ottenuta filtrando i campioni su dei filtri in fibra di vetro da 0,22 µm i quali erano stati precedentemente pesati.

Questi sono stati essiccati per una notte a 105°C e poi pesati nuovamente per valutare la quantità di biomassa trattenuta dal filtro.

Contemporaneamente, per i medesimi campioni è stata effettuata la misura della densità ottica (OD<sub>750</sub>) con l'impiego dello spettrofotometro.

Infine, è stata ottenuta la curva di calibrazione DW-OD<sub>750</sub>, risultante nella seguente correlazione matematica:

$$DW (g/l) = 0.4928 \cdot OD_{750} \quad (R^2 = 0.98) \quad (1)$$

La correlazione riportata è confermata anche in numerosi studi riguardanti la coltivazione microalgale in sistemi eterotrofi.

### 3.7 Analisi della variazione della concentrazione di acetato in coltura

Per le colture eterotrofe, è stata monitorata la concentrazione di acetato nel tempo, al fine di valutare come questo venisse consumato per la crescita microalgale.

Ad ogni campionamento effettuato ai diversi tempi prestabiliti, un campione di 2,5 ml è stato raccolto e successivamente sottoposto a centrifugazione per 10 minuti a 5000 giri/min.

Successivamente, i surnatanti raccolti ai vari tempi dopo centrifugazione sono stati filtrati mediante l'utilizzo di filtri per siringa in PES da 0,22 µm e trasferiti in fiale per l'analisi HPLC.

L'analisi è stata effettuata in colonna cromatografica mediante sistema HPLC (Shimadzu 20A Prominence), dotato di una colonna Phenomenex ROA-acido organico H<sup>+</sup> (8%).

### 3.8 Calcolo dei parametri di processo

Per valutare il tasso di crescita massimo  $\mu_{MAX}$  delle microalghe, si utilizza la seguente espressione:

$$\mu_{MAX} = \frac{\ln(X_{f,exp}) - \ln(X_{0,exp})}{t_f - t_0} \quad (2)$$

$X_{0,exp}$  e  $X_{f,exp}$  rappresentano le concentrazioni di biomassa (g/L) rispettivamente all'inizio e al termine della fase di crescita esponenziale.

Il tempo di duplicazione, invece, è ottenuto come:

$$t_{DUPL} = \frac{\ln 2}{\mu_{MAX}} \quad (3)$$

Le rese di biomassa microalgale ( $Y_{X/S}$ ) in g/g sono state ottenute utilizzando la seguente equazione:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{(X(t) - X_0)}{(S_0 - S(t))} \quad (4)$$

$S_0$  e  $X_0$  rappresentano rispettivamente la concentrazione iniziale di acetato e la concentrazione iniziale di biomassa, e  $S(t)$  e  $X(t)$  sono la concentrazione di acetato e la concentrazione di biomassa 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.

La produttività della biomassa microalgale in g L<sup>-1</sup> giorno<sup>-1</sup> è stata determinata come segue:

$$r_X = \frac{(X(t) - X_0)}{t} \quad (5)$$

Da questa correlazione è stato ottenuto il grado di produttività massimo per ogni coltura batch in esame ( $r_{X,MAX}$ ) e la produttività finale media per ogni test ( $r_{X,END}$ ).



### 3.9 Analisi della biomassa microalgale

La biomassa microalgale raccolta in ciascuna modalità di coltivazione è stata analizzata al fine di valutarne il contenuto proteico, analizzando il profilo degli amminoacidi attraverso tecniche cromatografiche.

Nel corso di ogni coltivazione sperimentale, la raccolta della biomassa ottenuta è stata effettuata al termine della fase di crescita esponenziale.

Le colture microalgali provenienti dai bioreattori sono state centrifugate a 5000 giri al minuto per 15 minuti.

Il pellet compatto che resta sul fondo dopo centrifugazione, il quale rappresenta la biomassa di *Chlorella* da analizzare, è stato sottoposto a due lavaggi successivi effettuati con acqua Milli-Q e quindi raccolto all'interno di becher graduati (figura 3.9).

Successivamente, la biomassa è stata essiccata a 100°C per 24 h e poi conservata nel congelatore (-20°C) prima dell'analisi.



**Figura 3.9:** Immagine della biomassa di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k raccolta al termine della prova in eterotrofia con 5.5 g/L acetato dopo le fasi di centrifugazione e lavaggio.

### 3.10 Determinazione della percentuale proteica

La percentuale di proteine nella biomassa microalgale è stata valutata utilizzando il metodo Dumas, un metodo di analisi elementare il quale si basa su un processo di combustione del campione a temperature elevate (1000 °C) in presenza di ossigeno puro, rilevando così il contenuto di azoto totale, non solo quello presente nelle proteine.

In particolare, la combustione determina il rilascio di anidride carbonica, acqua e ossidi di azoto. I gas prodotti sono raccolti e fatti passare entro una camera di riduzione contenente rame caldo a 650 °C: questa fase permette di convertire gli ossidi di azoto in azoto elementare, rimuovendo l'ossigeno in eccesso. Anche l'acqua residua e l'anidride carbonica sono allontanate.



La presenza di un rilevatore di conducibilità termica permette di misurare l'azoto presente, ottenendo dei risultati come % o mg di azoto, i quali possono essere poi convertiti in percentuale proteica utilizzando degli opportuni fattori di conversione.

Lo strumento utilizzato è un analizzatore elementare (MacroCube, Elementar), inizialmente calibrato utilizzando 5 campioni standard di sulfanilammide (figura 3.10).



**Figura 3.10:** Immagine dell'analizzatore elementare utilizzato in laboratorio per l'analisi della percentuale proteica dei campioni di interesse.

Per ciascuna delle prove sperimentali effettuate, ridotte quantità dei vari campioni ottenuti di biomassa essiccata sono state pesate con l'impiego di una microbilancia di precisione; successivamente, i campioni sono stati incapsulati in fogli di stagno e posizionati ordinatamente nelle corrispondenti stazioni dell'analizzatore.

Al termine dell'analisi, l'analizzatore ha rivelato la percentuale presente di azoto totale, oltre alla presenza delle percentuali di carbonio (C), idrogeno (H) e zolfo (S).

I risultati sono indicati come % o mg di azoto, che può essere convertito in proteine utilizzando l'equazione:

$$\text{proteine}(\%) = N(\%) \cdot 5.02 \quad (6)$$

Si è scelto di utilizzare il fattore di conversione 5.02, il quale costituisce il fattore di conversione realistico delle proteine per il genere microalgale *Chlorella*. Si tiene conto, infatti, che il tradizionale metodo Kjeldahl, utilizzato per la stima proteica attraverso il fattore di conversione 6.25, tenda a sovrastimare la presenza di azoto proteico.

La differenza sostanziale consiste nel fatto che il metodo Dumas valuta l'azoto totale, includendo anche la percentuale inorganica in forma di nitrito e nitrato; invece, il tradizionale metodo Kjeldahl determina solo l'azoto organico e l'ammoniaca.

Di conseguenza, il metodo dell'analisi elementare determina un valore più elevato di azoto totale e, quindi, un fattore di conversione inferiore (Wang et al., 2021).

### 3.11 Analisi del profilo amminoacidico

Il contenuto di amminoacidi della biomassa algale è stato determinato utilizzando il metodo ufficiale AOAC (metodo AOAC-Official 994.12, 1997).

Nel dettaglio, circa 50 mg di biomassa essiccata sono stati idrolizzati in 2.5 ml di HCl (6 M) per 22 ore a 110°C. Il controllo della temperatura è stato ottenuto ponendo le provette dei campioni all'interno di un becher contenente olio silconico, posto su una piastra riscaldante la quale controlla anche il livello di agitazione.

La soluzione standard degli amminoacidi è stata ottenuta con diluizione 1:10 con aggiunta di acqua Milli-Q partendo dalla soluzione madre caratterizzata da una concentrazione di 30 µmol/ml di ciascun amminoacido in soluzione con HCl 100 mM.

Nel caso di lisina e leucina, la diluizione effettuata è stata 1:100.

Prima dell'analisi HPLC, lo standard degli amminoacidi e il campione sono stati derivatizzati utilizzando come reattivo l'o-ftalaldeide (OPA), la quale in soluzione con 2-mercaptoetanolo reagisce con i gruppi amminici formando dei composti fluorescenti.

Il reagente di derivatizzazione è stato preparato sciogliendo 50 mg di o-ftalaldeide in 1 ml di metanolo e 40 µl di 2-mercaptoetanolo. Questa soluzione è stata diluita a 10 ml con tampone borato 0,4 M (pH 9,5).

Per la derivatizzazione, per ogni amminoacido sono stati prelevati 200 µl di soluzione standard contenente circa 3 µmol/ml di amminoacido e 1 ml di soluzione derivatizzante, poi iniettati in fiale per analisi nel sistema HPLC, avviando la misura dopo 90 s.

Allo stesso modo, l'analisi è stata poi effettuata sui campioni ottenuti dalla biomassa prodotta in coltura, i quali dopo essere stati a contatto con HCl 6M per 22 h sono stati neutralizzati con aggiunta di soluzione basica di KOH.

Successivamente, i campioni sono stati filtrati con l'utilizzo di filtri per siringa in PES da 0,22 µm e trasferiti in fiale per l'analisi HPLC. Anche in questo caso, sono stati prelevati 200 µl da ciascuna soluzione campione e 1 ml della soluzione di derivatizzante.

Valutando i tempi di ritenzione di ciascun amminoacido delle soluzioni standard all'interno della colonna cromatografica, è stato possibile effettuare il confronto con gli amminoacidi presenti nei campioni esaminati.

Il sistema HPLC (Shimadzu 20A Prominence) era equipaggiato con una colonna Kinetex EVO C18 (5µm, 150 × 4,6 mm) di Phenomenex e un rivelatore a serie di fotodiodi (PDA) (figura 3.11).

La fase mobile era composta da fosfato di potassio (0,02 M; pH 7,2) (A) e acetonitrile:metanolo:acqua (45:45:10,v/v/v) (B) in condizioni di eluizione con gradiente.

La velocità di flusso era di 1 ml/min, il volume di iniezione era di 19 µl e la temperatura della colonna era mantenuta a 30°C.



**Figura 3.11:** Immagine del sistema HPLC impiegato per l'analisi del profilo amminoacidico.

Gli amminoacidi primari (derivatizzati con OPA) sono stati monitorati alla lunghezza d'onda di 338 nm.

Il contenuto di ciascun amminoacido è stato determinato dalla costruzione delle rette di taratura ottenute utilizzando diverse concentrazioni di standard di amminoacidi primari.

### 3.11.1 Costruzione delle rette di taratura degli amminoacidi

Per poter effettuare l'analisi delle concentrazioni di amminoacidi contenuti nei campioni ottenuti, è stato necessario ricavare delle opportune curve di calibrazione per ciascun amminoacido.

Le curve di calibrazione (Appendice 3) mostrano le concentrazioni dell'amminoacido sull'asse delle ascisse (mg/ml), mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori corrispondenti dell'area del picco ottenuto dall'analisi effettuata in colonna HPLC.

Per ottenere le rette di taratura, sono stati preparati diversi standard per ciascun amminoacido, valutando concentrazioni che devono essere sia inferiori che superiori rispetto alla concentrazione prevista per il campione analizzato.

In particolare, sono state usate sette concentrazioni comprese tra 0,01  $\mu\text{mol/ml}$  e 3  $\mu\text{mol/ml}$  per la costruzione delle curve.

Effettuando successivamente le analisi in HPLC dei campioni di biomassa ottenuti, si riesce a risalire alla concentrazione dell'amminoacido corrispondente valutando l'area sottesa alla curva in corrispondenza del picco e quindi, attraverso la retta di taratura, leggendo la concentrazione corrispondente sull'asse delle ascisse.

### 3.12 Analisi della biomassa di *Thermoanaerobacter kivui*

La biomassa batterica ottenuta dopo centrifugazione dell'effluente derivante dalla fermentazione gassosa è stata sottoposta, come nel caso della biomassa microalgale, a due lavaggi successivi effettuati con acqua Milli-Q e quindi raccolta all'interno di becher graduati.

Successivamente, la biomassa è stata essiccata a 100°C per 24 h e poi conservata nel congelatore (-20°C) prima dell'analisi.

Per lo studio del profilo amminoacidico, è stata seguita la stessa procedura adottata per l'analisi dei campioni di *Chlorella* (3.11 Analisi del profilo amminoacidico).

## 4. Risultati e discussione

Di seguito sono riportati i principali risultati ottenuti in questo studio nelle diverse prove realizzate in laboratorio, effettuando un confronto tra le rese ottenute in modalità autotrofa ed eterotrofa.

Nel caso eterotrofo, sono stati analizzati i risultati relativi alle prove effettuate, testando concentrazioni crescenti di acetato come substrato organico.

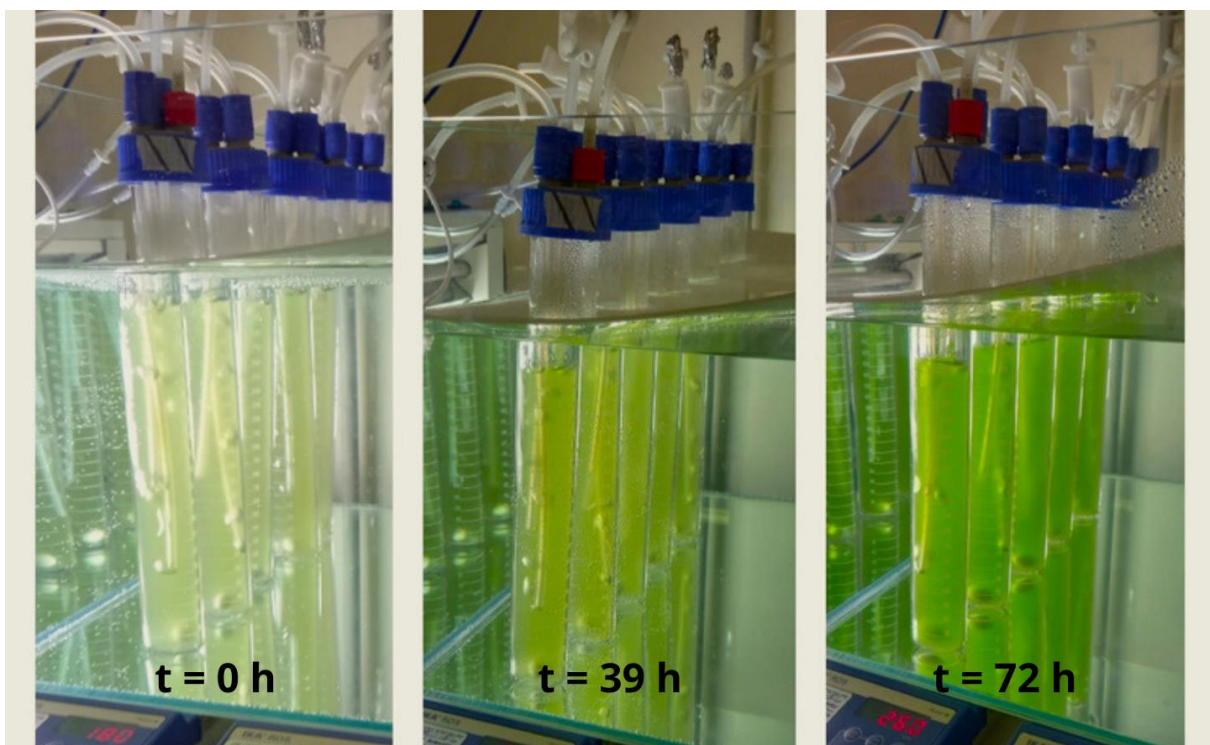
Infine, sono riportati i risultati relativi all'analisi del profilo amminoacidico della biomassa ottenuta dai processi di coltivazione.

### 4.1 Fase I: Prova in fotoautotrofia

La prima prova è stata realizzata in condizioni fotoautotrofe, ovvero in presenza di luce artificiale e di CO<sub>2</sub> come fonte di carbonio per la crescita microalgale.

Sono stati utilizzati cinque fotobioreattori, ciascuno con una coltura microalgale iniziale a cui corrispondeva un valore di OD<sub>750</sub> medio pari a 0,236.

La durata della prova è stata di 72 h ed ha portato ad ottenere una concentrazione finale media di biomassa pari a 0,83 g/L (figura 4.1.1).



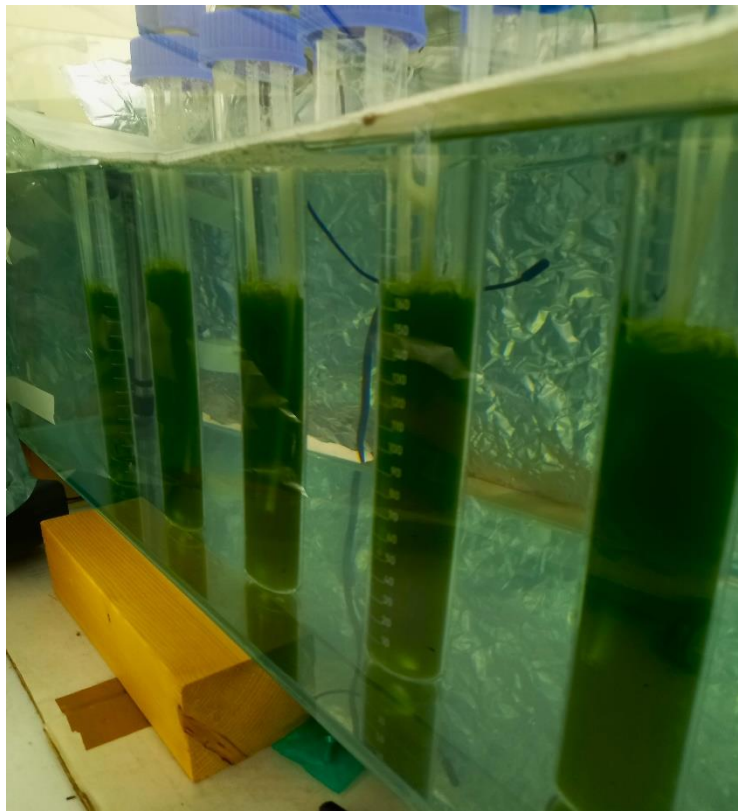
**Figura 4.1.1:** Fasi di crescita della biomassa di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k nel corso della prova in autotrofia a diversi tempi.

## 4.2 Fase 2: Prove in eterotrofia

Per testare la crescita di *Chlorella Sorokiniana* in eterotrofia in assenza di luce, sono state realizzate diverse prove a concentrazioni di acetato crescenti.

In particolare, le concentrazioni testate erano: 1,1 g/L – 3,3 g/L – 5,5 g/L di acetato ottenuto dall'effluente derivato dalla fermentazione gassosa e diluito nel mezzo contenente i sali M-8.

Di seguito, si riporta il caso della crescita eterotrofa a 5,5 g/L di acetato: la prova è durata 70 ore ed ha portato ad ottenere una concentrazione finale di biomassa pari a 2,1 g/L (figura 4.2.1).



**Figura 4.2.1:** Crescita della biomassa di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k nel corso della prova in eterotrofia a 5,5 g/L di acetato dopo 66 [h].

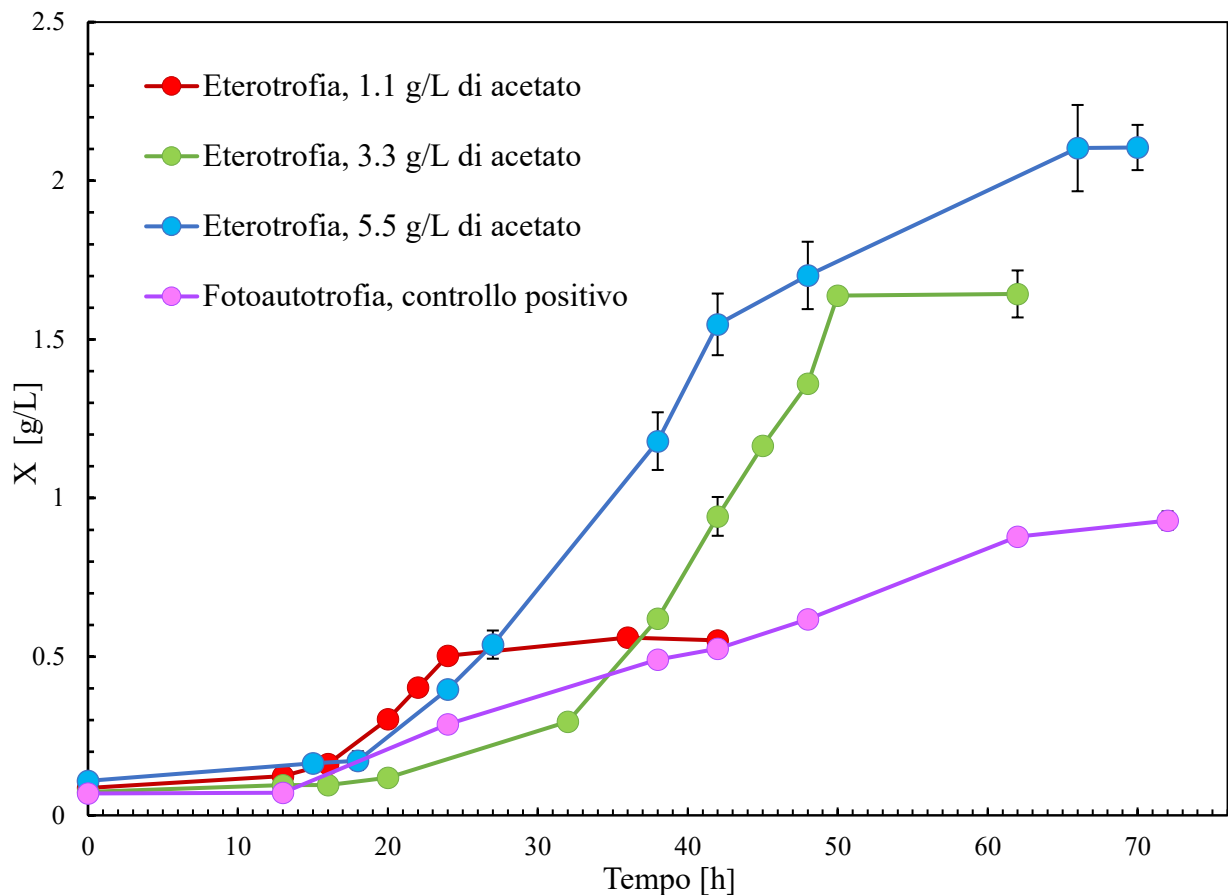
Dopo aver testato queste concentrazioni, è stata condotta un'ulteriore prova utilizzando il surnatante dell'effluente senza diluizione, corrispondente ad una concentrazione di acetato di 13,3 g/L.

In tutte le prove sperimentali realizzate, *Chlorella Sorokiniana* ha mostrato una crescita molto rapida ed una fase di latenza iniziale relativamente breve. La presenza di acetato nel mezzo di coltura permetteva di velocizzare il processo di coltivazione, ottenendo delle concentrazioni di biomassa finali crescenti quando si aumentava la fonte organica.



### 4.3 Confronto dei risultati ottenuti in autotrofia ed eterotrofia

Al termine delle prove sperimentali, è stato effettuato un confronto con i risultati precedentemente ottenuti in autotrofia, mettendo in risalto come la crescita in eterotrofia sia più efficiente in termini di rapidità del processo e di produttività della biomassa raccolta (figura 4.3.1).



**Figura 4.3.1:** Confronto delle concentrazioni di crescita della biomassa di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k nelle prove in eterotrofia a diverse concentrazioni di acetato e nel caso autotrofo.

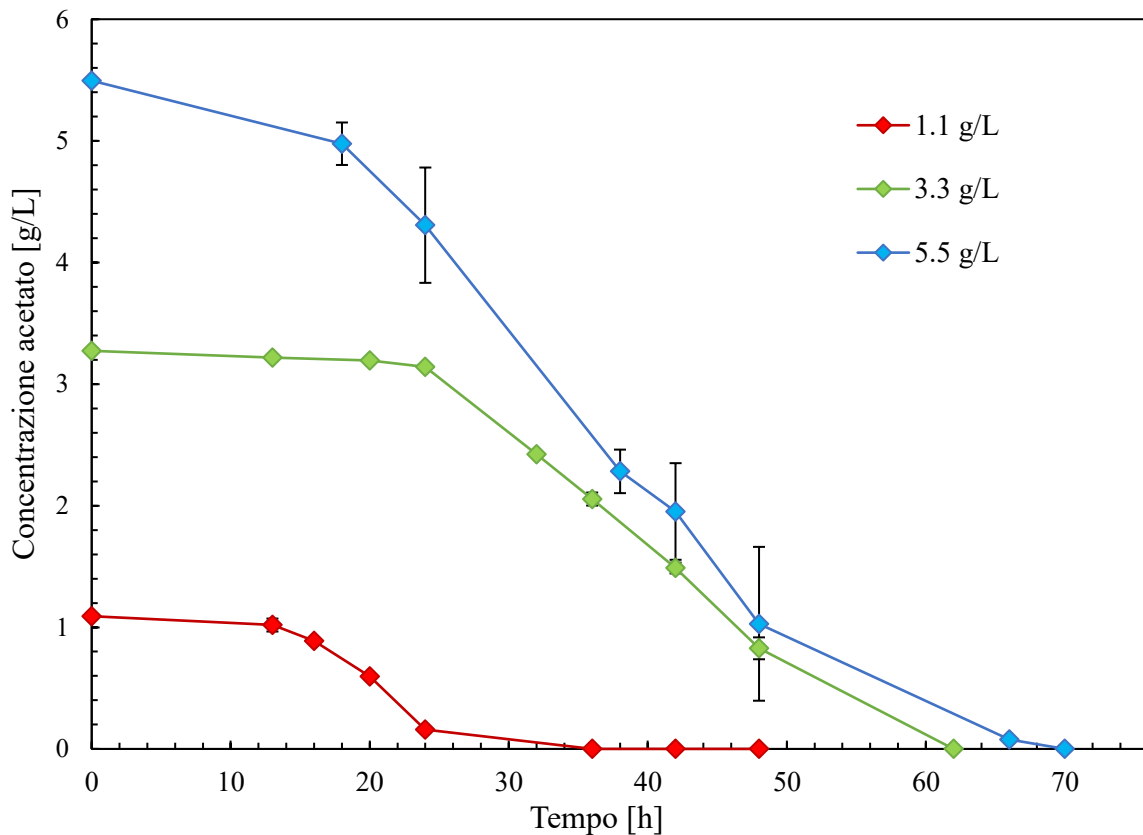
Le prove erano concluse al termine della fase di crescita esponenziale.

Si nota come per basse concentrazioni di acetato presente nel terreno (1,1 g/L), la concentrazione di biomassa finale non sia così distante da quella ottenuta nel caso autotrofo.

Al contrario, ad alte concentrazioni di acetato (3,3 g/L e 5,5 g/L), si ottengono concentrazioni maggiori di biomassa dopo breve tempo: si evidenzia infatti come la concentrazione finale di biomassa nel caso autotrofo sia stata raggiunta in eterotrofia con 5,5 g/L di acetato nella metà del tempo.

Nel corso di ogni prova, durante i vari campionamenti, sono stati raccolti ridotti volumi da destinare alla centrifugazione, con lo scopo di analizzare il surnatante per valutare come l'acetato venisse consumato nel tempo da *Chlorella*.

Gli andamenti ottenuti delle curve di concentrazione dell'acetato nel tempo sono stati confrontati (figura 4.3.2): si può notare come al termine di ciascuna fase di crescita esponenziale, si verifichi il completo consumo dell'acetato presente nel terreno di coltura.



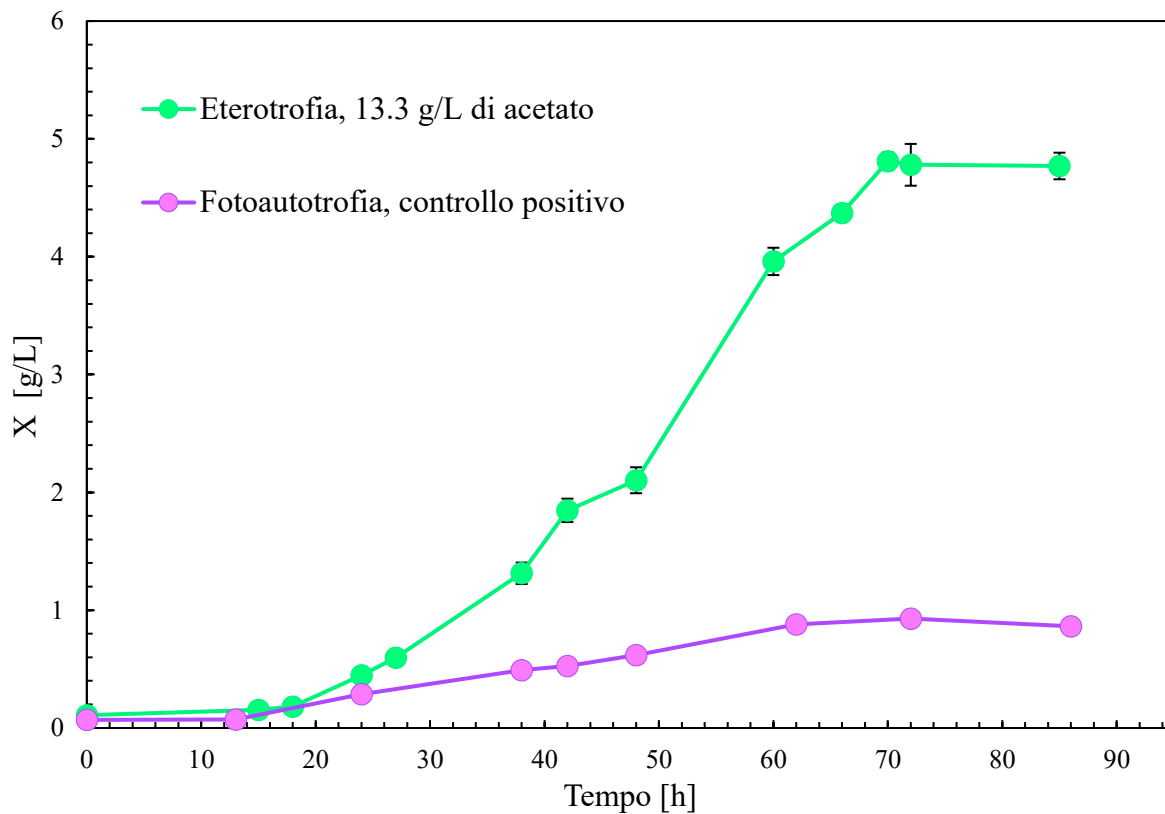
**Figura 4.3.2:** Confronto delle concentrazioni di consumo di acetato da parte di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k nelle prove in eterotrofia.

Tali risultati hanno portato a dimostrare che, se si imposta inizialmente il valore del pH nel mezzo di coltura, *Chlorella Sorokiniana* può crescere senza inibizione ad elevate concentrazioni di acetato, anche superiori a 5 g/L.

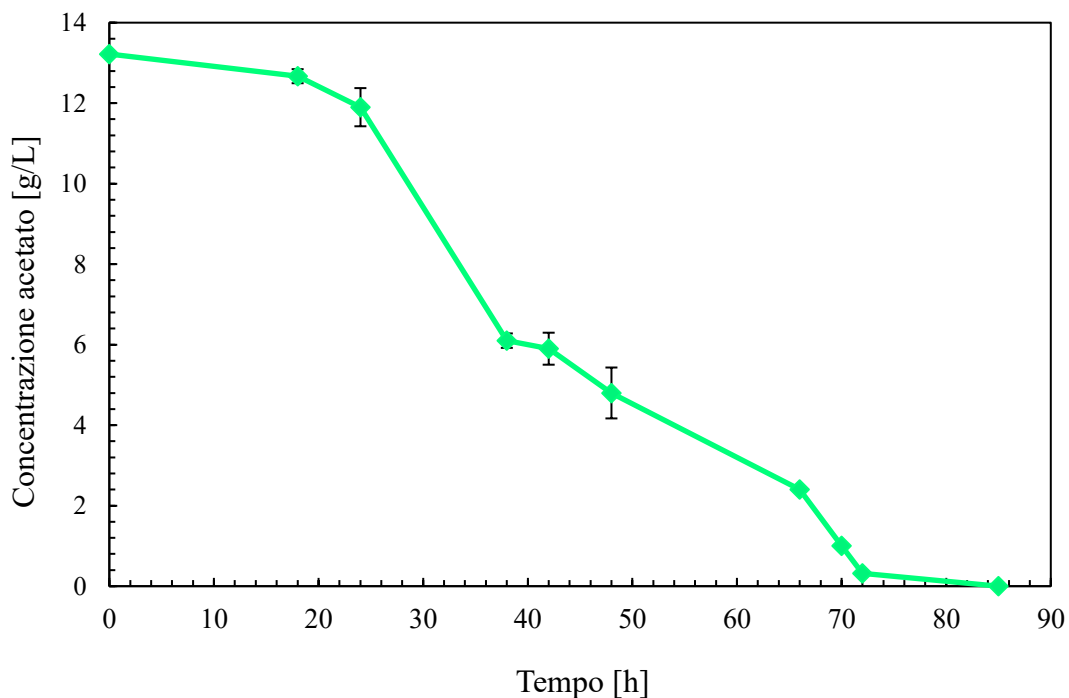
Considerati i risultati positivi ottenuti, è stata condotta un'ulteriore prova utilizzando direttamente l'effluente della fermentazione gassosa senza diluizione, caratterizzato da una concentrazione di acetato pari a 13,3 g/L.

Anche in questo caso, è stato riportato un confronto tra l'analisi del processo eterotrofo a 13,3 g/L e quello autotrofo (figura 4.3.3); in aggiunta, è stata riportata la curva di consumo dell'acetato da parte di *Chlorella Sorokiniana* (figura 4.3.4).





**Figura 4.3.3:** Confronto delle concentrazioni di crescita della biomassa di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k nella prova in eterotrofia a 13,3 g/L di acetato e nel caso autotrofo.



**Figura 4.3.4:** Andamento delle concentrazioni di consumo di acetato da parte di *Chlorella Sorokiniana* SAG 211-8k nella prova in eterotrofia a 13,3 g/L di acetato.

Anche in quest'ultima prova, il processo di crescita della biomassa si è concluso con risultati positivi: la fase esponenziale è terminata dopo 72 h, con una concentrazione finale della biomassa ottenuta pari a 4,78 g/L, di gran lunga superiore rispetto alle prove effettuate in precedenza. In corrispondenza di tale tempo, inoltre, *Chlorella Sorokiniana* in coltura ha consumato efficacemente tutto l'acetato presente nel mezzo.

Questo risultato porta delle ulteriori conferme al fatto che il genere *Chlorella* riesca a crescere ad alte concentrazioni di acetato: per far sì che ciò accada, tuttavia, è fondamentale controllare ed impostare opportunamente il pH iniziale del mezzo di coltura.

In assenza di un adeguato controllo del pH medio iniziale, si può verificare che la crescita microalgale sia inibita, portando ad avere una lunga fase di latenza o la completa mortalità delle cellule presenti in coltura a causa di una presenza eccessiva di acido acetico nel mezzo.

Alcune delle prove sperimentali realizzate in questo lavoro di tesi, infatti, non hanno portato ad ottenere dei risultati soddisfacenti quando venivano utilizzate alte concentrazioni di acetato: il problema fondamentale era appunto legato all'assenza di un sistema di controllo del pH nel nostro sistema impiantistico di laboratorio che potesse mantenere dei livelli adeguati di pH nel corso dell'intero processo di coltivazione.

Questa problematica è stata maggiormente accentuata quando è stata svolta la prova con concentrazione di acetato pari a 13,3 g/L.

Considerando il valore di pKa dell'acido acetico (4,75), se il pH viene mantenuto al di sopra di 5, la concentrazione di CH<sub>3</sub>COOH risulterà sotto il livello di inibizione.

Nelle nostre prove sperimentali, il pH è stato impostato inizialmente a valori compresi tra 7-8 che assicurassero di avere una quantità di acido acetico al di sotto della concentrazione critica di inibizione della crescita, la quale è pari a 88,5 mg/L per *Chlorella sorokiniana* (Lacroux et al., 2020).

Un'ulteriore problematica che ha condizionato negativamente la corretta riuscita delle prove sperimentali ad alte concentrazioni di acetato, oltre al controllo del pH, è stata la presenza di agenti contaminanti che potessero proliferare in coltura, divenendo la biomassa predominante.

La presenza di microrganismi estranei nei bioreattori poteva essere causata da un'errata prefase di sterilizzazione dei bioreattori o dal fatto che le operazioni di inoculo non venissero effettuate in condizioni perfettamente sterili.

Per verificare che al termine dei processi di coltivazione non ci fosse contaminazione batterica, ridotti campioni sono stati osservati al microscopio ottico con ingrandimento 100X.

In aggiunta, è stata prelevata un'aliquota della coltura finale presente nei fotobioreattori, mantenendola in piastre BG -11 sterili arricchite con 20 g/L di glucosio.

Infatti, la potenziale presenza di agenti estranei nei bioreattori porterebbe all'interno delle piastre ad esprimere la loro crescita, considerando che il glucosio rappresenta il substrato organico prediletto dai batteri e che quest'ultimi hanno dei tempi di crescita molto più rapidi rispetto alla biomassa microalgale.

Per il superamento di tale problematica, è stato fondamentale realizzare tutte le operazioni di sterilizzazione correttamente; anche le procedure di preparazione dell'inoculo e riempimento dei fotobioreattori dovevano essere effettuate in maniera opportuna in condizioni di assoluta sterilità, al fine di garantire la purezza delle colture finali.

La presenza della contaminazione da batteri estranei è spesso un'importante problematica nelle coltivazioni eterotrofe che sfruttano carbonio organico, soprattutto quando questo è presente in alte concentrazioni. Tuttavia, partendo dalle colture più pure possibili presenti nelle piastre con glucosio ed effettuando le varie procedure con attenzione per la sterilità del processo, l'effetto negativo della contaminazione è stato superato.

Pertanto, dai risultati ottenuti si dimostra che *Chlorella sorokiniana* può crescere efficacemente su un effluente ottenuto da un processo di fermentazione gassosa, ricco in acetato prodotto dagli acetogeni.

Il flusso di acetato proveniente da tale effluente non contiene sostanze che possono limitare o bloccare la crescita microbica.

La bassa quantità di acido formico (0,02 g/L) che deriva dall'effluente di fermentazione gassosa non ha influenzato la crescita delle microalghe, dunque si può considerare trascurabile.

**Tabella 4.3.5:** Confronto dei tassi di crescita medi di *Chlorella Sorokiniana* in modalità eterotrofa ed autotrofa; valori delle rese massime e finali della biomassa calcolati in condizioni eterotrofe.

<i>Modalità crescita Chlorella</i>	$\mu_{MAX} (h^{-1})$	$t_{DUPL} (h)$	$Y_{X/S_{MAX}} (g g^{-1})$	$Y_{X/S_{END}} (g g^{-1})$
<b>Eterotrofia</b>	$0.1099 \pm 0.0243$	$6.31 \pm 1.43$	$0.46 \pm 0.07$	$0.40 \pm 0.05$
<b>Fotoautotrofia</b>	$0.0601 \pm 0.005$	$11.53 \pm 0.97$	//	//

Come si nota dai risultati ottenuti riportati in tabella 4.3.5, il tasso di crescita medio delle fasi esponenziali ottenuto nelle prove eterotrofe presenta un valore di  $0.1099 \pm 0.024 h^{-1}$ , di gran lunga superiore rispetto a quello ottenuto in fotoautotrofia ( $0.0601 \pm 0.005$ ).

Si evidenzia, inoltre, come il tempo di duplicazione  $t_{DUPL}$  richiesto per raddoppiare la biomassa presente in coltura raggiunga un valore molto basso nel caso eterotrofo: le cellule, infatti, si duplicano nella metà del tempo rispetto alla modalità fotoautotrofa. Questo aspetto conferma la tesi che la coltivazione in eterotrofia sia un processo molto più rapido rispetto ai processi tradizionali in presenza di luce.

Per quanto riguarda le rese in termini di biomassa ottenuta rispetto al consumo di acetato nelle prove eterotrofe, per ciascuna prova sono stati valutati i valori di resa massima e di resa finale ottenuti e poi è stata riportata una media in tabella 4.3.5.

Il valore di  $Y_{X/S_{MAX}}$  pari a  $0.46 \pm 0.07$  è coerente con i risultati attesi, considerando che, in presenza di glucosio come substrato organico, il valore di resa di biomassa ottenuta per la crescita di *Chlorella Sorokiniana* in un altro studio era di  $0.47 g g^{-1}$  (Zheng et al., 2013).

**Tabella 4.3.6:** Confronto tra la produttività finale e massima della biomassa ottenuta per ciascuna modalità di crescita di *C. sorokiniana* testata in questo studio.

<b>Modalità crescita <i>Chlorella</i></b>	<b><math>r_{END}</math> (<math>g L^{-1}giorno^{-1}</math>)</b>	<b><math>r_{MAX}</math> (<math>g L^{-1}giorno^{-1}</math>)</b>
<b>Eterotrofia (1.1 g/L di acetato)</b>	0.227 ± 0.024	0.417 ± 0.001
<b>Eterotrofia (3.3 g/L di acetato)</b>	0.608 ± 0.029	0.751 ± 0.001
<b>Eterotrofia (5.5 g/L di acetato)</b>	0.684 ± 0.023	0.822 ± 0.052
<b>Eterotrofia (13.3 g/L di acetato)</b>	1.31 ± 0.11	1.61 ± 0.13
<b>Fotoautotrofia</b>	0.198 ± 0.008	0.275 ± 0.005

Dall'analisi dei valori di produttività ottenuti nelle diverse prove sperimentali (tabella 4.3.6), si nota come, per ogni concentrazione di acetato utilizzata in eterotrofia, i risultati in termini di produttività raggiunta abbiano valori superiori rispetto al caso autotrofo.

I risultati migliori sono stati ottenuti nel caso della coltivazione effettuata utilizzando l'effluente derivante dalla fermentazione gassosa senza diluizione, ovvero nel caso di concentrazione di acetato in coltura pari a 13.3 g/L.

Il valore di produttività massima ottenuto in tale caso, pari a  $1.61 \pm 0.13 g L^{-1}giorno^{-1}$ , è quasi 6 volte superiore rispetto al caso fotoautotrofo.

Si evidenzia, inoltre, sempre nel caso in assenza di diluizione, che utilizzando la concentrazione più alta di acetato, la produttività massima raggiunta supera il valore di produttività medio tipico delle coltivazioni fotoautotrofe, solitamente inferiore a 1 g/L al giorno (Di Caprio et al., 2022).

In sintesi, dunque, i risultati finora ottenuti confermano come la modalità di crescita eterotrofa risulti essere vantaggiosa in termini di rapidità del processo e di produttività della biomassa prodotta rispetto alla tradizionale coltivazione fotoautotrofa.

#### 4.4 Analisi della percentuale proteica in *Chlorella*

Al termine delle diverse prove sperimentali effettuate, la biomassa raccolta ed essiccata è stata analizzata per valutarne la composizione biochimica. I risultati ottenuti, riscontrati dall'analizzatore elementare, sono stati riportati in tabella 4.4.1.

Anche in questo caso, sono stati messi a confronto i risultati ottenuti in eterotrofia con quelli del caso autotrofo.

Non sono state evidenziate differenze sostanziali tra la composizione biochimica della biomassa ottenuta nei diversi test in eterotrofia. Questo risultato era atteso in quanto le percentuali di azoto proteico nelle varie prove non variano, sebbene cambi la concentrazione iniziale di acetato.

La biomassa cresciuta in condizioni eterotrofe è caratterizzata da una percentuale proteica molto alta (circa 52% della biomassa secca), mentre nel caso autotrofo la percentuale è leggermente più bassa (circa 45%).

Questi risultati sono in linea con la composizione biochimica di *Chlorella* già riportata in altri studi, i quali portano a considerare che il contenuto proteico sia compreso tra il 40% ed il 60% su peso secco.

**Tabella 4.4.1:** Percentuale di proteine su base secca.

<i>Condizione di crescita</i>	Proteine (%)
Eterotrofia	<b>52.12 ± 1.98</b>
Fotoautotrofia	<b>45.36 ± 2.84</b>

Nel dettaglio, i risultati rilevati dall'analizzatore elementare hanno fornito una percentuale di azoto totale (N%) media del 10,39% nella biomassa cresciuta in eterotrofia. Moltiplicando per il fattore di conversione di 5,02, è stata ottenuta la percentuale proteica di interesse per i vari campioni analizzati.

Il fattore di conversione proteica selezionato in questo studio (5,02) è stato calcolato dal profilo amminoacidico di *Chlorella vulgaris* nella fase iniziale del suo ciclo vitale, quando l'accumulo e il contenuto proteico sono elevati (Templeton et al., 2015).

L'elevato contenuto proteico nel genere *Chlorella* è dovuto al mantenimento del rapporto ideale C:N pari a 106:16, il quale porta ad avere durante il processo di coltivazione e crescita un rifornimento adeguato di azoto per l'ottenimento di importanti biomolecole come, appunto, le proteine.

Inoltre, la biomassa è stata raccolta al termine della fase di crescita esponenziale, in corrispondenza della quale si ha la fase di maggiore produzione di proteine; la produzione di lipidi e carboidrati si verifica invece nel corso della fase stazionaria, quando la carenza di azoto porta ad accumulare sostanze di riserva a base di carbonio, come appunto lipidi e zuccheri.

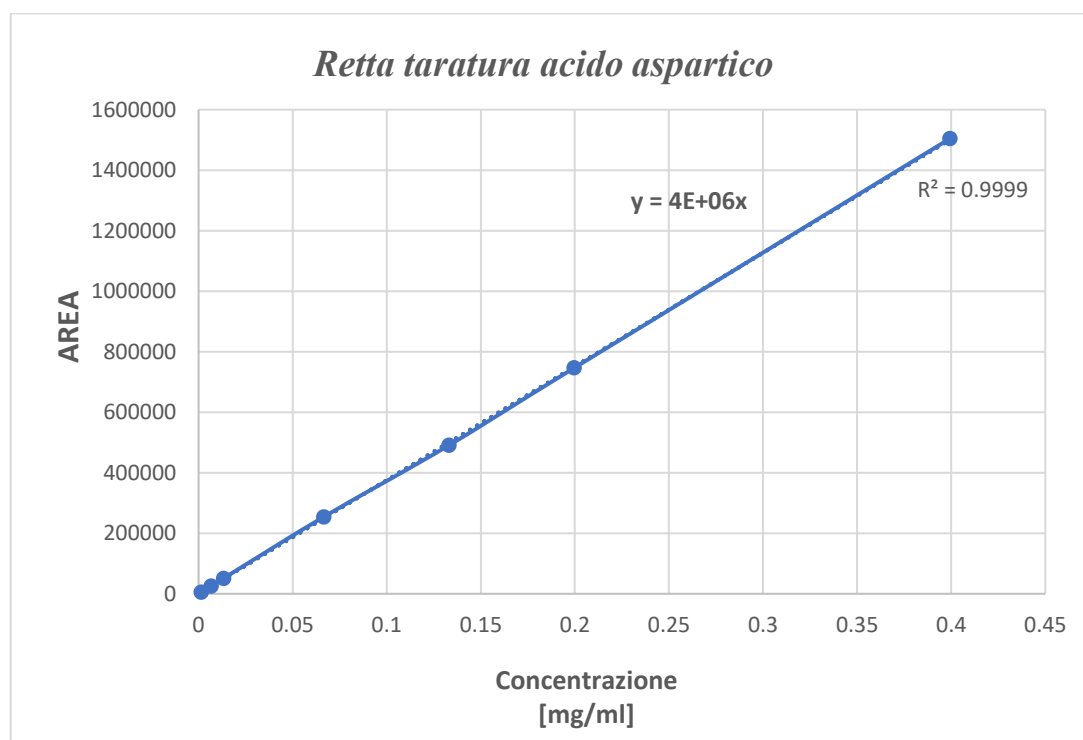
## 4.5 Costruzione delle rette di taratura degli amminoacidi

Le curve di calibrazione ricavate mostrano le concentrazioni dell'amminoacido corrispondente sull'asse delle ascisse (mg/ml), mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori dell'area del picco ottenuto dall'analisi effettuata in colonna HPLC.

Di seguito, è stato riportato l'esempio di ottenimento della retta di taratura per l'acido aspartico (figura 4.5.2).

**Tabella 4.5.1:** Valori di area del picco e corrispondenti concentrazioni di amminoacido riportati per la costruzione della retta di taratura dell'acido aspartico.

Area picco	Concentrazione AA [ $\mu\text{mol/ml}$ ]	Concentrazione AA [mg/ml]
4866	0,01	0,001331
25149	0,05	0,006655
51151	0,1	0,01331
254236	0,5	0,06655
490855	1	0,1331
746560	1,5	0,19965
1504167	3	0,3993



**Figura 4.5.2:** Retta di taratura dell'acido aspartico. Sono riportate le concentrazioni dell'amminoacido sull'asse delle ascisse (mg/ml), mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori dell'area del picco ottenuto dall'analisi effettuata in colonna HPLC.

## 4.6 Analisi del profilo amminoacidico

Dalle analisi svolte sui campioni di biomassa ottenuti, è stato ricavato il profilo amminoacido per il ceppo di *Chlorella* analizzato in questo studio.

Come atteso, il profilo amminoacidico relativo alle diverse biomasse ottenute in eterotrofia a concentrazioni di acetato crescenti non presentava delle variazioni rilevanti.

Per tale motivo, viene riportato solo il confronto tra le biomasse eterotrofe (ricavando la media della quantità di ciascun amminoacido calcolata per ogni condizione eterotrofa) e quelle fotoautotrofe (tabella 4.6.1).

**Tabella 4.6.1:** Confronto dei profili amminoacidici del contenuto proteico estratto dalla biomassa di *Chlorella* cresciuta in modalità autotrofa ed eterotrofa. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard, in mg AA/ g Proteina. I valori riportati in eterotrofia sono stati ottenuti dalla media dei valori della quantità di amminoacidi relativi a ciascuna condizione eterotrofica. \*Amminoacidi essenziali

<i>Amminoacido</i>	<i>Eterotrofia</i>	<i>Fotoautotrofia</i>
	<i>mg AA / g Proteina</i>	
<i>Istidina*</i>	$15.37 \pm 1.04$	$15.31 \pm 0.20$
<i>Isoleucina*</i>	$34.68 \pm 3.23$	$36.70 \pm 2.22$
<i>Leucina*</i>	$84.80 \pm 7.07$	$89.33 \pm 7.45$
<i>Lisina*</i>	$45.16 \pm 7.03$	$27.29 \pm 4.59$
<i>Metionina*</i>	$14.27 \pm 2.09$	$17.32 \pm 3.63$
<i>Valina*</i>	$54.43 \pm 2.13$	$54.55 \pm 2.87$
<i>Fenilalanina*</i>	$40.81 \pm 4.14$	$53.06 \pm 5.15$
<i>Treonina*</i>	$41.94 \pm 2.16$	$41.76 \pm 3.31$
<i>Cisteina</i>	$1.98 \pm 0.07$	$1.78 \pm 0.09$
<i>Tirosina</i>	$33.17 \pm 0.87$	$36.53 \pm 1.14$
<i>Acido aspartico</i>	$76.62 \pm 1.68$	$77.77 \pm 1.91$
<i>Acido glutammico</i>	$94.48 \pm 3.78$	$95.40 \pm 4.44$
<i>Arginina</i>	$51.97 \pm 3.73$	$55.60 \pm 4.49$
<i>Glicina</i>	$46.6 \pm 2.73$	$53.84 \pm 3.98$
<i>Alanina</i>	$70.89 \pm 0.89$	$70.84 \pm 1.11$
<i>Serina</i>	$41.48 \pm 1.60$	$48.4 \pm 3.01$
<i>Prolina</i>	$25.23 \pm 1.34$	$24.33 \pm 1.87$

Dall'analisi del profilo amminoacidico ricavato emerge come non ci siano delle differenze sostanziali tra le due modalità di crescita microalgale.

Tuttavia, si nota come nel caso di glicina, metionina, fenilalanina e serina le concentrazioni siano superiori nel caso fotoautotrofo. Al contrario, la quantità di lisina è nettamente superiore nel caso eterotrofo.

Gli amminoacidi che mostrano le concentrazioni maggiori sono l'acido glutammico, l'acido aspartico e la leucina. Questo aspetto era già stato confermato da altri studi effettuati su diverse specie microalgali (Bito et al., 2020).

Gli amminoacidi che sono presenti in minore quantità sono invece la metionina e la cisteina, i quali contengono zolfo nella loro formula di struttura.

La presenza di un quantitativo di amminoacidi essenziali elevato permette di confermare il valore biologico della biomassa ottenuta, la quale potrebbe essere destinata all'alimentazione animale ed umana proprio per le sue caratteristiche nutrizionali.

Una delle possibili applicazioni è quella di sfruttare la biomassa microalgale come mangime per la dieta dei microrganismi acquatici.

Numerosi studi, infatti, hanno analizzato la possibilità di sfruttare l'elevato contenuto in amminoacidi essenziali presente in specie come *Chlorella* e *Spirulina* per sostituire le tradizionali fonti proteiche impiegate nell'acquacoltura.

La farina di pesce e l'olio di pesce sono attualmente gli ingredienti maggiormente impiegati nei mangimi per la dieta dei pesci (Chen et al., 2023).

Tuttavia, il costo di questi componenti è notevolmente aumentato a causa dell'impossibilità di soddisfare una richiesta sempre crescente nel campo dell'acquacoltura.

Si cercano dunque delle fonti proteiche alternative: le proteine vegetali, in tal senso, sono state scartate a causa dei problemi di digeribilità e della potenziale presenza di fitotossine; inoltre, le fonti vegetali non presentano un adeguato profilo amminoacidico ed un contenuto di acidi grassi insaturi che possa soddisfare i requisiti richiesti per ottenere dei validi mangimi (Chen et al., 2023).

In particolare, un recente studio ha analizzato il profilo amminoacidico del ceppo *SU-9* di *Chlorella sorokiniana* cresciuto eterotroficamente e lo ha confrontato con il profilo amminoacidico della farina di pesce e della soia, rivelando l'elevato potenziale nell'utilizzo della biomassa eterotrofica microalgale come fonte di proteine per l'alimentazione dei pesci, sostituendo la tradizionale farina di pesce come mangime.

Gli amminoacidi essenziali come arginina, cisteina, insieme alla glutammina e glutammato, erano presenti in alte concentrazioni, rendendo dunque la biomassa microalgale un valido sostituto proteico nell'alimentazione acquatica (Chen et al., 2023).

Nel presente lavoro di tesi sono stati messi a confronto il profilo amminoacidico ottenuto dalla biomassa cresciuta in eterotrofia con la richiesta di amminoacidi essenziali per l'alimentazione degli organismi acquatici, stabilita dal Consiglio Nazionale delle Ricerche delle Accademie Nazionali (NRC).

Inoltre, è stata riportata anche la composizione amminoacidica della farina di pesce (tabella 4.6.2) per effettuare un ulteriore confronto.



**Tabella 4.6.2:** Confronto del profilo di amminoacidi essenziali presenti nella biomassa di *Chlorella* cresciuta eterotroficamente in questo studio con la richiesta amminoacidica NRC e con il profilo di amminoacidi essenziali della farina di pesce. \*Amminoacidi solforati: metionina + cisteina; Amminoacidi aromatici: fenilalanina + tirosina.

	<i>Chlorella</i> <i>eterotrofica</i> <i>cresciuta in</i> <i>questo studio</i>	<i>Requisiti NRC</i> <i>per i mangimi per</i> <i>l'acquacoltura</i> <i>(Jia et al., 2022)</i>	<i>Farina di pesce</i> <i>(Li et al., 2011)</i>
	<b>mg AA / g Proteina</b>		
<b>Arginina</b>	51.97 ± 3.73	45	76
<b>Istidina</b>	15.37 ± 1.04	23	24
<b>Isoleucina</b>	34.68 ± 3.23	31	51
<b>Leucina</b>	84.80 ± 7.07	47	83
<b>Lisina</b>	45.16 ± 7.03	62	83
<b>Valina</b>	54.43 ± 2.13	38	60
<b>Treonina</b>	41.94 ± 2.16	34	37
<b>Amminoacidi contenenti zolfo</b>	16.25 ± 2.16	31	42
<b>Amminoacidi aromatici</b>	73.98 ± 5.01	54	81

In questo lavoro di tesi, la biomassa cresciuta in eterotrofia ha portato ad ottenere risultati molto positivi in termini di contenuto di amminoacidi essenziali: dall'analisi dei dati riportati in tabella 4.6.2, infatti, si evidenzia che molti amminoacidi come leucina, isoleucina, valina, treonina e amminoacidi aromatici sono presenti in concentrazioni superiori rispetto a quelle richieste dal Consiglio Nazionale delle Ricerche (NRC) per l'applicazione nell'alimentazione dei pesci.

Tuttavia, gli amminoacidi solforati e la lisina sono presenti in quantità minori rispetto alle concentrazioni previste per l'acquacoltura.

Bassi livelli di amminoacidi contenenti zolfo sono principalmente correlati ad una bassa quantità di cisteina mentre la metionina è stata osservata in percentuale soddisfacente.

Di conseguenza, dato che alcuni degli amminoacidi sono presenti in quantità inferiori rispetto ai requisiti ufficiali per la dieta dei pesci, la biomassa ottenuta in questo studio non potrebbe essere utilizzata come sostitutivo della farina di pesce nell'alimentazione degli organismi acquatici.

Tuttavia, questo studio potrebbe portare ad un utilizzo della biomassa di *Chlorella* cresciuta in eterotrofia come integratore per la dieta dei pesci, riducendo dunque almeno in parte la richiesta delle tradizionali fonti proteiche. Si deve, infatti, considerare che oltre al contenuto proteico, la biomassa microalgale è ricca di altri preziosi componenti come vitamine, minerali e acidi grassi polinsaturi.

Oltre alla possibilità di utilizzare la biomassa microalgale come fonte proteica per l'alimentazione animale, un'importante alternativa è quella di sfruttare le caratteristiche nutrizionali delle microalghe anche nel cibo destinato all'uomo.

La biomassa microalgale ha infatti numerosi effetti positivi sulla salute umana: studi clinici e test su animali hanno dimostrato come un alimento a base di microalghe possa ridurre l'alta pressione sanguigna, abbassando i livelli di colesterolo e glucosio nel sangue (Fu et al., 2021).

Un aspetto di grande rilevanza è che le proteine ottenute da *Chlorella* possono rappresentare un valido sostituto delle proteine animali, portando ad avere un impatto molto positivo sull'ambiente, dato che si potrebbero ridurre notevolmente gli allevamenti intensivi.

Infatti, recenti studi hanno dimostrato che l'allevamento del bestiame contribuisce approssimativamente al 14,5% delle emissioni di gas serra (GHG) indotte dall'uomo (Fu et al., 2021).

Gli studi hanno anche associato al consumo eccessivo di carne alcune malattie tra cui obesità, diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari; con una sostituzione delle proteine animali con quelle vegetali, invece, il tasso di mortalità associato era di gran lunga inferiore.

Un confronto della biomassa cresciuta eterotroficamente in questo studio con le principali tipologie di carne e con le uova bianche in termini di profilo amminoacidico è stato riportato in tabella 4.6.3.

**Tabella 4.6.3:** Confronto del profilo di amminoacidi essenziali presenti nella biomassa di *Chlorella* cresciuta eterotroficamente in questo studio con quello che caratterizza diverse tipologie di carne e le uova bianche (Fu et al., 2021).

\*Amminoacidi solforati: metionina + cisteina; Amminoacidi aromatici: fenilalanina + tirosina.

	<i>Chlorella eterotrofica cresciuta in questo studio</i>	<i>Carne di pollo (Fu et al., 2021)</i>	<i>Carne di manzo (Fu et al., 2021)</i>	<i>Carne di maiale (Fu et al., 2021)</i>	<i>Uova (Fu et al., 2021)</i>
<b>mg AA / g Proteina</b>					
<b>Isoleucina</b>	34.68 ± 3.23	34.5	34.7	33.5	52.8
<b>Leucina</b>	84.80 ± 7.07	69.4	70.8	72.6	87.6
<b>Lisina</b>	45.16 ± 7.03	78.3	80.5	82.3	69.8
<b>Valina</b>	54.43 ± 2.13	57.9	43.3	40.5	67.8
<b>Treonina</b>	41.94 ± 2.16	39.6	30.3	27.6	46.8
<b>Amminoacidi contenenti zolfo</b>	16.25 ± 2.16	48.9	43.4	47.8	66.4
<b>Amminoacidi aromatici</b>	73.98 ± 5.01	54.1	51.8	54.1	106

Anche in questo caso, si evidenzia come i campioni di biomassa analizzati abbiano un basso quantitativo di lisina e di amminoacidi solforati, quali metionina e cisteina, se confrontati con i valori presenti nella carne e nelle uova.

Tuttavia, i dati relativi alle concentrazioni di leucina, isoleucina, valina, treonina e amminoacidi aromatici sono soddisfacenti e portano ad avvalorare l'ipotesi che l'integrazione della biomassa microalgale nell'alimentazione umana possa rappresentare una valida soluzione per ridurre il consumo globale di carne.

Viene riportato, inoltre, uno studio comparativo del profilo amminoacidico ottenuto per i campioni di biomassa analizzati in questo studio con le richieste ufficiali del fabbisogno di proteine e amminoacidi nella nutrizione umana espresso dagli enti congiunti FAO/OMS/UNU (tabella 4.6.4). Tali valori sono stati poi confrontati con quelli riferiti alla soia e alla caseina.

**Tabella 4.6.4:** Confronto del profilo di amminoacidi essenziali presenti nella biomassa di *Chlorella* cresciuta eterotroficamente in questo studio con quello che caratterizza la soia e la caseina (Han et al., 2015); confronto con standard FAO/OMS/UNU.

	<i>Chlorella</i> <i>eterotrofica</i> <i>cresciuta in questo</i> <i>studio</i>	<b>Requisiti</b> <b>FAO/WHO/</b> <b>UNU</b> <b>(2007)</b>	<i>Soia</i> <i>(Han et al.,</i> <i>2015)</i>	<i>Caseina</i> <i>(Han et al.,</i> <i>2015)</i>
	<b>mg AA / g Proteina</b>			
<b>Istidina</b>	15.37 ± 1.04	15	27	30
<b>Isoleucina</b>	34.68 ± 3.23	30	49	49
<b>Leucina</b>	84.80 ± 7.07	59	85	97
<b>Lisina</b>	45.16 ± 7.03	45	69	82
<b>Valina</b>	54.43 ± 2.13	39	52	59
<b>Treonina</b>	41.94 ± 2.16	23	42	43
<b>Amminoacidi contenenti zolfo</b>	16.25 ± 2.16	22	28	29
<b>Amminoacidi aromatici</b>	73.98 ± 5.01	38	88	107

Dall'analisi riportata, si nota come i requisiti ufficiali sulla concentrazione di ciascun amminoacido per l'alimentazione umana stabiliti dalla FAO siano stati raggiunti.

L'unica eccezione è rappresentata dal contenuto di amminoacidi solforati, ovvero metionina e cisteina, che mostrano delle concentrazioni inferiori a quelle richieste.

Anche la presenza di lisina è molto limitata, come era già stato evidenziato in precedenza: se si confronta la biomassa analizzata con i riferimenti della soia e della caseina, ad esempio, si nota come la presenza di lisina sia molto bassa.

In ultima analisi, è stato riportato un confronto tra il profilo amminoacidico ottenuto dalla biomassa eterotrofica cresciuta in questo studio con il profilo ottenuto per un'altra specie microalgale molto utilizzata in ambito commerciale, la *Spirulina* (tabella 4.6.5); in aggiunta, è stata valutata la composizione amminoacidica media ottenuta dall'analisi di diverse specie di *Chlorella* commerciale (Mobin e Alam, 2017).

**Tabella 4.6.5:** Confronto del profilo amminoacidico della biomassa di *Chlorella* cresciuta in modalità eterotrofa in questo studio con quello della *Spirulina* e della *Chlorella* commerciale. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard, in mg AA/ g Proteina. I valori riportati in eterotrofia sono stati ottenuti dalla media dei valori della quantità di amminoacidi relativi a ciascuna condizione eterotrofica. \*Amminoacidi essenziali

<i>Amminoacido</i>	<i>Chlorella eterotrofica cresciuta in questo studio</i>	<i>Spirulina (Mobin e Alam, 2017)</i>	<i>Chlorella (Mobin e Alam, 2017)</i>
<b>mg AA / g Proteina</b>			
<i>Istidina*</i>	15.37 $\pm$ 1.04	10	13
<i>Isoleucina*</i>	34.68 $\pm$ 3.23	36	26
<i>Leucina*</i>	84.80 $\pm$ 7.07	54	53
<i>Lisina*</i>	45.16 $\pm$ 7.03	29	35
<i>Metionina*</i>	14.27 $\pm$ 2.09	14	15
<i>Valina*</i>	54.43 $\pm$ 2.13	40	36
<i>Fenilalanina*</i>	40.81 $\pm$ 4.14	28	31
<i>Treonina*</i>	41.94 $\pm$ 2.16	32	27
<i>Cisteina</i>	1.98 $\pm$ 0.07	6	4
<i>Tirosina</i>	33.17 $\pm$ 0.87	30	21
<i>Acido aspartico</i>	76.62 $\pm$ 1.68	61	52
<i>Acido glutammico</i>	94.48 $\pm$ 3.78	91	63
<i>Arginina</i>	51.97 $\pm$ 3.73	43	36
<i>Glicina</i>	46.6 $\pm$ 2.73	32	34
<i>Alanina</i>	70.89 $\pm$ 0.89	47	48
<i>Serina</i>	41.48 $\pm$ 1.60	32	28
<i>Prolina</i>	25.23 $\pm$ 1.34	27	29

Come si nota anche da questo ulteriore confronto, la biomassa raccolta nelle nostre prove sperimentali è caratterizzata da una quantità ridotta di cisteina. Questo aspetto era già stato evidenziato nell'applicazione in acquacoltura e nel confronto con il profilo amminoacidico della carne e della soia.

Tuttavia, questo limite può essere giustificato considerando che la cisteina è presente in quantità ridotta anche in diverse specie di *Chlorella* analizzate in altri studi, il cui profilo amminoacidico medio è stato riportato in tabella 4.6.5.

Inoltre, anche nel caso della *Spirulina*, si conferma come la cisteina sia presente in quantità molto bassa rispetto alla concentrazione degli altri amminoacidi presenti.

Tuttavia, ad eccezione della cisteina, è stato dimostrato dai vari confronti analizzati come la biomassa microalgale raggiunga le richieste in termini di contenuto amminoacidico essenziali per l'alimentazione umana.

Questo porterebbe a confermare l'ipotesi di come le microalghe possano divenire una fonte proteica di seconda generazione, la quale potrebbe integrare o sostituire completamente le tradizionali fonti proteiche come la carne e la soia.

In conclusione, si può dunque affermare come la preziosa biomassa eterotrofica raccolta in questo studio abbia un elevato valore biologico e nutrizionale.

Dal confronto con i profili amminoacidici della *Spirulina* e della *Chlorella* commerciale riportato, emerge come la nostra biomassa sia caratterizzata da una quantità molto elevata di importanti amminoacidi come leucina, valina, arginina, alanina e serina.

In particolare, si nota una notevole presenza di arginina: quest'ultima funziona da substrato per la sintesi di NO, un importante segnale intracellulare; inoltre, l'arginina è coinvolta nei processi di regolazione delle funzioni immunitarie (Bito et al., 2020).

Tutti gli amminoacidi essenziali, ad eccezione di quelli solforati, hanno superato i requisiti ufficiali della FAO.

Inoltre, il confronto con le tradizionali fonti di alimentazione degli organismi acquatici ha portato a considerare la biomassa ottenuta come un valido prodotto da utilizzare come mangime per l'acquacoltura.

Infine, l'assenza di differenze sostanziali della biomassa cresciuta in eterotrofia rispetto a quella raccolta in autotrofia è un ulteriore aspetto vantaggioso, confermando come *Chlorella* possa crescere in maniera efficace e rapida in assenza di luce, sfruttando l'acetato come substrato organico.

#### 4.7 Analisi del profilo amminoacidico di *Thermoanaerobacter kivui*

La biomassa batterica raccolta dopo centrifugazione dell'effluente ottenuto dal processo di fermentazione gassosa è stata analizzata per valutarne il profilo amminoacidico, al fine di valorizzare anche questa biomassa ottenuta nelle prove sperimentali.

Numerosi studi hanno considerato proprio la possibilità di sfruttare il contenuto proteico presente nella biomassa batterica proveniente dalla fermentazione gassosa, al fine di ottenere fonti proteiche da destinare all'acquacoltura.

In particolare, un recente studio ha utilizzato un ceppo non patogeno di *Clostridium autoethanogenum*, il quale utilizza monossido di carbonio per la fermentazione gassosa su scala industriale (Zhang et al., 2022).

Dall'analisi del profilo amminoacidico della biomassa batterica, è emerso come questa fosse un'importante fonte di proteine per gli animali acquatici: il livello ottimale di sostituzione della tradizionale farina di pesce con la fonte proteica batterica era del 15%, senza avere degli effetti negativi sulla crescita degli organismi acquatici (Zhang et al., 2022).

Tuttavia, l'applicazione di fonti proteiche batteriche potrebbe avere degli effetti collaterali avversi: la presenza di batteri potrebbe portare ad esempio alla produzione di metaboliti tossici come l'ammina biogenica, dannosa per gli animali (Wang et al., 2018).

Di conseguenza, ad oggi sono ancora necessari degli studi approfonditi per ogni singolo ceppo batterico potenzialmente applicabile, al fine di indagare eventuali effetti avversi prima di procedere con processi industriali su larga scala.

Nel presente studio, è stato riportato il profilo amminoacidico del batterio *Thermoanaerobacter kivui*, confrontandolo con il profilo, già riportato in precedenza, della farina di pesce (tabella 4.7.1).

Anche in questo caso, sono stati valutati i requisiti ufficiali in termini di concentrazione di amminoacidi essenziali stabiliti dal Consiglio Nazionale delle Ricerche delle Accademie Nazionali (NRC), considerando il fabbisogno proteico di diverse specie ittiche.

Nell'analisi riportata, è stata valutata la percentuale di amminoacido su base secca, considerando che non era stata ottenuta la percentuale di proteine presente nella biomassa batterica come nel caso dell'analisi della biomassa microalgale.

Infatti, i batteri sono caratterizzati da un'elevata presenza di acidi nucleici, dunque non sarebbe stato opportuno utilizzare il tradizionale fattore di conversione proteica di 6.25, ritenendolo troppo elevato.

In tal senso, sono necessari studi più approfonditi per ricavare un fattore di conversione appropriato per la biomassa batterica, al fine di non sovrastimare erroneamente il contenuto proteico.

Dai risultati ottenuti, si nota come tutte le richieste in termini di percentuale amminoacidica previste siano state superate, dunque la biomassa ottenuta ed analizzata potrebbe trovare un potenziale utilizzo nel campo dell'acquacoltura.

Come nel caso della biomassa microalgale, anche con la biomassa batterica è stato riscontrato il limite di una bassa presenza degli amminoacidi solforati, ovvero metionina e cisteina.

**Tabella 4.7.1:** Analisi del profilo amminoacidico della biomassa del batterio *Thermoanaerobacter kivui* ottenuta dalla centrifugazione dell'effluente della fermentazione gassosa; confronto con il fabbisogno proteico previsto dal Consiglio Nazionale delle Ricerche delle Accademie Nazionali (NRC) e con il profilo amminoacidico della farina di pesce. I valori sono espressi come % di AA/ base secca. \*Aminoacidi essenziali

<i>Amminoacido</i>	<i>Thermoanaerobacter kivui</i> (in questo studio)	<i>Requisiti NRC</i> (Jia et al., 2022)	<i>Farina di pesce</i> (Li et al., 2011)
<b>% di sostanza secca</b>			
<i>Istidina*</i>	0.93 ± 0.31	0.92	1.51 ± 0.02
<i>Isoleucina*</i>	3.27 ± 0.62	1.24	3.26 ± 0.04
<i>Leucina*</i>	3.44 ± 1.23	1.88	5.24 ± 0.05
<i>Lisina*</i>	3.34 ± 0.45	2.48	5.29 ± 0.04
<i>Metionina*</i>	1.02 ± 0.01	0.84	2.02 ± 0.02
<i>Valina*</i>	3.75 ± 0.83	1.52	3.80 ± 0.03
<i>Fenilalanina*</i>	1.64 ± 0.35	1.2	2.78 ± 0.03
<i>Treonina*</i>	1.93 ± 0.49	1.36	4.11 ± 0.04
<i>Arginina</i>	2.84 ± 0.48	1.80	4.85 ± 0.05
<i>Cisteina</i>	0.58 ± 0.13		0.67 ± 0.02
<i>Tirosina</i>	1.10 ± 0.47		2.36 ± 0.03
<i>Acido aspartico</i>	4.14 ± 0.87		4.34 ± 0.05
<i>Acido glutammico</i>	5.30 ± 1.21		6.01 ± 0.11
<i>Glicina</i>	2.39 ± 0.23		6.58 ± 0.07
<i>Alanina</i>	2.62 ± 0.57		5.07 ± 0.04
<i>Serina</i>	1.41 ± 0.39		2.80 ± 0.04
<i>Prolina</i>	2.75 ± 0.33		4.25 ± 0.03

Il profilo amminoacidico ottenuto è sicuramente incoraggiante, tuttavia si nota come le percentuali di ciascun amminoacido presente siano comunque distanti da quelle ottenute dall'analisi della farina di pesce.

Questo porta a concludere che, come nel caso delle microalghe, ad oggi la completa sostituzione della farina di pesce come ingrediente principale per l'acquacoltura non sia possibile. Tuttavia, la biomassa batterica potrebbe essere utilizzata per limitarne almeno in parte la crescente richiesta.

Come per le microalghe, sono necessari ulteriori studi per verificare la digeribilità di questo tipo di biomassa, oltre all'assenza di effetti negativi per lo sviluppo e la crescita degli organismi acquatici.





## 5. Conclusioni e prospettive future

Nel presente lavoro di tesi, è stato dimostrato come la biomassa di *Chlorella Sorokiniana* possa crescere in maniera rapida ed efficiente in processi eterotrofi, utilizzando acetato come substrato organico.

Questo aspetto permetterebbe di sostituire i tradizionali processi fotoautotrofi di coltivazione microalgale, i quali presentano la principale problematica della fornitura costante ed adeguata della luce per far avvenire le fasi di coltivazione.

Con l'utilizzo di acetato come fonte organica, invece, è stata registrata una crescita più rapida, con rese di biomassa prodotta e valori di produttività molto superiori rispetto al caso autotrofo.

Inoltre, l'utilizzo dell'acetato presenta una serie di vantaggi, essendo più economico del tradizionale glucosio e non entrando in conflitto con la richiesta di fonti zuccherine per il mercato alimentare.

Dai test realizzati in laboratorio, è emerso come *Chlorella Sorokiniana* può crescere senza inibizione in un terreno di coltura caratterizzato da un'alta concentrazione di acetato (fino a 13,3 g/L in questo studio), risolvendo dunque alcune problematiche relative al controllo del pH del mezzo e al potenziale rischio di contaminazione batterica.

I risultati ottenuti sono molto incoraggianti dal punto di vista del profilo amminoacidico della biomassa analizzata nei diversi test in eterotrofia: è stato confermato, infatti, come le microalgahe possano costituire il cibo del futuro per via del loro valore nutrizionale e delle loro caratteristiche benefiche per la salute umana.

Il confronto degli amminoacidi analizzati con il profilo amminoacidico della soia e della carne ha portato a considerare la biomassa di *Chlorella* come una preziosa fonte proteica: questo potrebbe condurre ad una riduzione del consumo delle tradizionali fonti di proteine, come quelle derivanti dalla carne, riducendo notevolmente l'impatto ambientale associato agli allevamenti intensivi che sono tra le principali cause dell'emissione di gas serra.

In aggiunta, è stato dimostrato come la biomassa microalgale possa essere utilizzata nel campo dell'acquacoltura, in alternativa all'impiego della farina e dell'olio di pesce come mangimi per gli organismi acquatici.

Nell'ottica di realizzare un processo sostenibile ed economicamente vantaggioso, l'acetato prodotto dalla fermentazione gassosa ad opera di batteri acetogeni è stato valorizzato, sfruttandolo come substrato per la crescita microalgale; inoltre, anche la frazione batterica residua è stata valorizzata: dall'analisi del contenuto proteico, è emerso come anche questa biomassa potesse trovare applicazione nel campo dell'acquacoltura.

Tuttavia, ad oggi il campo di applicazione della biomassa microalgale resta limitato alla produzione di integratori, mangimi, prodotti cosmetici: sono, infatti, necessari ulteriori studi sul grado di digeribilità di questi prodotti.

Inoltre, il problema della contaminazione da batteri estranei, tipicamente associato alla coltivazione eterotrofa, desta forte preoccupazione da parte degli enti legislativi in merito alla sicurezza della biomassa, qualora questa fosse destinata all'alimentazione umana.

Nel nostro studio, è stato dimostrato come il rischio di contaminazione possa essere superato operando in condizioni perfettamente sterili e partendo da colture pure: agendo in questo modo, anche ad alte concentrazioni di acetato non è stata rilevata contaminazione.



## 6. Lista dei simboli

**FAO:** Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura

**$\mu$ :** velocità specifica di crescita della biomassa [ $\text{h}^{-1}$ ]

**$\mu_{max}$  :** velocità specifica massima di crescita [ $\text{h}^{-1}$ ]

**ATP:** adenosina trifosfato

**NADPH:** nicotinammide adenina dinucleotide fosfato

**PBR:** fotobioreattore

**G3P:** gliceraldeide 3-fosfato

**TCA:** ciclo degli acidi tricarbossilici

**COD:** domanda chimica di ossigeno

**$R^2$ :** coefficiente di determinazione (Microsoft Excel)

**NT:** azoto totale

**NP:** fosforo totale

**WLP:** via metabolica di Wood-Ljungdahl

**EDTA:** acido etilendiammonotetracetico

**FP:** flat panel photobioreactor

**EAAI:** indice degli amminoacidi essenziali

**STR:** reattore agitato meccanicamente

**SAG:** collezione di colture di Alghe dell'Università di Göttingen, Germania

**OD<sub>750</sub>:** densità ottica valutata a 750 nm

**DW:** peso secco della biomassa microalgale

**PES:** polietersulfone

**$X_{0,exp}$  :** 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

**$t_{DUPL}$**  : tempo di duplicazione della biomassa microalgale (h)

**$S_0$** : concentrazione iniziale di acetato (g/L)

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

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

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

**$Y_{X/S_{MAX}}$** : resa massima (g/g)

**$Y_{X/S_{END}}$**  : resa finale (g/g)

**$r_{X,MAX}$**  : produttività massima ( $g L^{-1} giorno^{-1}$ )

**$r_{X,END}$** : produttività finale ( $g L^{-1} giorno^{-1}$ )

**$N\%$** : percentuale di azoto totale

**AOAC**: Association of Official Agricultural Chemists

**OPA**: o-ftalaldeide

**HPLC**: cromatografia liquida ad alta prestazione

**NRC**: Consiglio Nazionale delle Ricerche

**AA**: amminoacidi

**EAA**: amminoacidi essenziali

**GHG**: gas ad effetto serra

**OMS**: Organizzazione Mondiale della Sanità

**UNU**: Università delle Nazioni Unite

**BG-11**: Blue green medium

**BBM**: Bold's Basal Medium

**TAP**: TRIS acetate phosphate medium

**PSII**: fotosistema II (o acqua-plastochinone ossidoreduttasi)

## 7. Riferimenti bibliografici

- Abiusi, F., Wijffels, R. H., Janssen, M. (2020) Doubling of microalgae productivity by oxygen balanced mixotrophy. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 8,6065–6074. [DOI: [10.1021/acssuschemeng.0c00990](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00990)]
- Abreu, A.P., Morais, R.C., Teixeira, J.A., et al. (2022) A comparison between microalgal autotrophic growth and metabolite accumulation with heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic cultivation modes. *Renewable Sustainable Energy Rev.*;159:112247. [DOI: [10.1016/j.rser.2022.112247](https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112247)]
- Barros, A., Pereira, H., Campos, J., Marques, A., Varela, J., Silva, J. (2019) Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae. *Sci Rep*; 9:13935. [DOI: [10.1038/s41598-019-50206-z](https://doi.org/10.1038/s41598-019-50206-z)]
- Bauer, L., Ranglová, K., Masojídek, J., Drog, B., Meixner, K. (2021) Digestate as Sustainable Nutrient Source for Microalgae—Challenges and Prospects. *Appl Sci*, Vol 11, Page 1056 2021;11:1056. [DOI:[10.3390/APP11031056](https://doi.org/10.3390/APP11031056)]
- Becker, E.W. (2004) Microalgae in human and animal nutrition. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (ed. A. Richmond), pp. 312–351. Blackwell Science, Oxford.
- Becker, E.W. (2007) Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.*, 25, 207–210
- Bito, T., Okumura, E., Fujishima, M., Watanabe, F. (2020) Potential of *Chlorella* as a Dietary Supplement to Promote Human Health. *Nutrients*. 12(9): 2524. [DOI: [10.3390/nu12092524](https://doi.org/10.3390/nu12092524)]
- Borowitzka, M.A. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters, *Journal of Biotechnology*, Volume 70, Issues 1–3, Pages 313-321, ISSN 0168-1656. [DOI:[10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)]
- Bumbak, F., Cook, S., Zachleder, V., Hauser, S., Kovar, K. (2011) Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 31–46. [DOI: [10.1007/s00253-011-3311-6](https://doi.org/10.1007/s00253-011-3311-6)]
- Chen, C.Y., Lu, J.C., Chang, Y.H., Chen, J.H., Nagarajan, D., Lee, D.J., Chang, J.S. (2023) Optimizing heterotrophic production of *Chlorella sorokiniana* SU-9 proteins potentially used as a sustainable protein substitute in aquafeed. *Bioresour Technol.*; 370:128538. [DOI: [10.1016/j.biortech.2022.128538](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128538)]
- Christodoulou, X., Velasquez-Orta, S.B. (2016) Microbial Electrosynthesis and Anaerobic Fermentation: An Economic Evaluation for Acetic Acid Production from CO<sub>2</sub> and CO. *Environ Sci Technol*;50:11234–42. [DOI: [10.1021/acs.est.6b02101](https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02101)]
- Costa, S.S., Miranda, L.A., Andrade, B.B., De Jesus, D.A., Souza, C.O., De Morais, M.G., Costa, A.V., Druzian, J.I. (2018) Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. *International Journal of Biological Macromolecules* 116, 552–562. [DOI:[10.1016/j.ijbiomac.2018.05.064](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.064)]
- Di Caprio F. (2021) Cultivation processes to select microorganisms with high accumulation ability. *Biotechnol. Adv.* 49, 107740. [DOI: [10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107740](https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107740)]

- 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. [DOI: 10.1016/j.jece.2022.108262]
- Doucha, J., Lívanský, K. (2012) Production of high-density chlorella culture grown in fermenters, *J. Appl. Phycol.* 24, 35–43. [DOI: 10.1007/s10811-010-9643-2]
- Ebenezer, V., Medlin, L.K., Ki, J.S. (2012) Molecular Detection, Quantification, and Diversity Evaluation of Microalgae. *Mar. Biotechnol.* 14, 129–142. [DOI: 10.1007/s10126-011-9427-y]
- FAO/WHO/UNU (2007) Protein and amino acid requirements in human nutrition. WHO, pp 150 [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_935\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_935_eng.pdf)
- Han, S.W., Chee, K.M., Cho, S.J. (2015) Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chem* 172: 766–769. [DOI:10.1016/j.foodchem.2014.09.127]
- Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J-S, Lee, D-J (2017) Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: a review. *Biotechnol Adv* 36: 54–67. [DOI: 10.1016/J.BIOTECHADV.2017.09.009]
- Je, S., Yamaoka, Y. (2022) Biotechnological Approaches for Biomass and Lipid Production Using Microalgae *Chlorella* and Its Future Perspectives. *J Microbiol Biotechnol*; 32(11):1357-1372. [DOI: 10.4014/jmb.2209.09012]
- Jia, S., Li, X., He, W., Wu, G. (2022) Protein-Sourced Feedstuffs for Aquatic Animals in Nutrition Research and Aquaculture. *Adv Exp Med Biol.*; 1354: 237-261. [DOI: 10.1007/978-3-030-85686-1\_12]
- Kiefer, D., Merkel, M., Lilge, L., Henkel, M., Hausmann, R. (2021) From Acetate to Bio-Based Products: Underexploited Potential for Industrial Biotechnology. *Trends Biotechnol.*; 39(4):397-411. [DOI: 10.1016/j.tibtech.2020.09.004]
- Kim, Y., Lama, S., Agrawal, D., Kumar, V., Park, S. (2021) Acetate as a potential feedstock for the production of value-added chemicals: Metabolism and applications. *Biotechnol Adv.*; 49:107736. [DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107736]
- Kliphuis, A.M., Janssen, M., van den End, E.J., Martens, D.E., Wijffels, R.H. (2011) Light respiration in *Chlorella sorokiniana*. *Journal of applied phycology*, 23, 935-947. [DOI: 10.1007/s10811-010-9614-7]
- Lacroux, J., Seira, J., Trably, E., Bernet, N., Steyer, J.P., van Lis, R. (2021) Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* on acetate and butyrate: interplay between substrate, C:N ratio and pH. *Front. Microbiol.* 12:703614. [DOI: 10.3389/fmicb.2021.703614]
- Lacroux, J., Trably, E., Bernet, N., Steyer, J.P., van Lis, R. (2020) Mixotrophic growth of microalgae on volatile fatty acids is determined by their undissociated form. *Algal Res*; 47:101870. [DOI:10.1016/j.algal.2020.101870]
- Li, X., Rezaei, R., Li, P., Wu, G. (2011) Composition of amino acids in feed ingredients for animal diets. *Amino Acids.* 40(4):1159-68. [DOI: 10.1007/s00726-010-0740-y]
- Li, X., Song, M., Yu, Z., Wang, C., Sun, J., Su, K., et al. (2022) Comparison of heterotrophic and mixotrophic *Chlorella pyrenoidosa* cultivation for the growth and lipid accumulation through acetic acid as a carbon source. *J. Environ. Chem. Eng.* 10:107054. [DOI: 10.1016/j.jece.2021.107054]

- Li, Y.R., Tsai, W.T., Hsu, Y.C., Xie, M.Z., Chen, J.J. (2014) Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. *Energy Proc*; 52:371–6. [DOI: [10.1016/j.egypro.2014.07.088](https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.07.088)]
- Lizzul, A.M., Lekuona-Amundarain, A., Purton, S., Campos, L.C. (2018) Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. *Biology*, 7, 25. [DOI:[10.3390/biology7020025](https://doi.org/10.3390/biology7020025)]
- Mandalam, R.K., Palsson, B.O. (1998) Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnol Bioeng.* 59(5): 605-11. [DOI: [10.1002/\(sici\)1097-0290\(19980905\)59:5<605::aid-bit11>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19980905)59:5<605::aid-bit11>3.0.co;2-8)]
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew.Sust. Energ. Rev.* 14, 217-232. [DOI: [10.1016/j.rser.2009.07.020](https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020)]
- Metting, F.B. (1996) Biodiversity and application of microalgae. *J.Ind. Microbiol.*, 17, 477-489.
- Mobin, S., Alam, F. (2017) Some Promising Microalgal Species for Commercial Applications: A review. *Energy Procedia.* 110. 510-517. [DOI:[10.1016/j.egypro.2017.03.177](https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.177)]
- Morales-Sánchez, D., Martínez-Rodríguez, O.A., Kyndt, J., Martínez, A. (2015) Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1–9. [DOI: [10.1007/s11274-014-1773-2](https://doi.org/10.1007/s11274-014-1773-2)]
- Pandey, S., Narayanan, I., Ramesh, V., Selvaraj, R., Varadavenkatesan, T., Pugazhendhi, A. (2023) A Review on the Effect of Blue Green 11 Medium and its Constituents on Microalgal Growth and Lipid Production. *Journal of Environmental Chemical Engineering.* 11. 109984. [DOI:[10.1016/j.jece.2023.109984](https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.109984)]
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., De-Bashan, L.E., Bashan, Y. (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res* 45:11–36. [DOI: [10.1016/j.watres.2010.08.037](https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037)]
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P.A., Ogden, K.L. (2017) Effects of pH on cell growth, lipid production and CO<sub>2</sub> addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Res.* 28: 192-199. [DOI: [10.1016/j.algal.2017.11.004](https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004)]
- Ragsdale, S.W., Pierce, E. (2008) Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*; 1784: 1873–98. [DOI:[10.1016/j.bbapap.2008.08.012](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.08.012)]
- Ramos-Suarez, M., Zhang, Y., Outram, V. (2021) Current perspectives on acidogenic fermentation to produce volatile fatty acids from waste. *Rev Environ Sci Bio/Technology* 202; 20:439–78. [DOI: [10.1007/S11157-021-09566-0](https://doi.org/10.1007/S11157-021-09566-0)]
- Ruiz, J., Olivieri, G., J. de Vree, Bosma, R., Willems, P., Reith, J.H., Eppink, M.H.M., Kleinegris, D.M.M, Wijffels, R.H., Barbosa, M.J. (2016) Towards industrial products from microalgae. *Energy Environ. Sci.* 9 3036–3043. [DOI: [10.1039/ C6EE01493C](https://doi.org/10.1039/C6EE01493C)]
- 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 Res.* 64: 102698. [DOI: [10.1016/j.algal.2022.102698](https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102698)]

- Sajjadi, B., Chen, W.Y., Raman, A.A.A., Ibrahim, S. (2018) Microalgae lipid and biomass for biofuel production: a comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renew.Sustain. Energy Rev.* 97, 200–232. [DOI: 10.1016/j.rser.2018.07.050]
- Sarchami, T., Batta, N., Berruti, F. (2021) Production and separation of acetic acid from pyrolysis oil of lignocellulosic biomass: a review. *Biofuels, Bioprod Bioref*; 15:1912–37. [DOI: 10.1002/bbb.2273]
- Shi, X.M., Wu, Z.W., Chen, F. (2006) Kinetic modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* at various pH and temperatures. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 763–768. [DOI: 10.1002/mnfr.200600037]
- Shi, X.M., Zhang, X.W., Chen, F. (2000) Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzym. Microb. Technol.* 27, 312–318. [DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00208-8]
- Sorokin, C.; Myers, J. (1953) A high-temperature strain of *Chlorella*. *Science*, 117, 330–331.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert A. (2006) Commercial Applications of Microalgae. *Journal Of Bioscience And Bioengineering* Vol. 101, No. 2, 87–96. [DOI: 10.1263/jbb.101.87]
- Sundaram, T., Rajendran, S., Gnanasekaran, L., Rachmadona, N., Jiang, J.J., et al. (2023) Bioengineering strategies of microalgae biomass for biofuel production: recent advancement and insight. *Bioengineered*, 14:1, 2252228. [DOI: 10.1080/21655979.2023.2252228]
- Templeton, D., Laurens, L. (2015) Nitrogen-to-protein conversion factors revisited for applications of microalgal biomass conversion to food, feed and fuel. *Algal Research*. 11. 359-367. [DOI:10.1016/j.algal.2015.07.013]
- Turon, V., Baroukh, C., Trably, E., Latrille, E., Fouilland, E., Steyer, J.P. (2014) Use of fermentative metabolites for heterotrophic microalgae growth: Yields and kinetics. *Bioresour. Technol.* 175, 342–349. [DOI: 10.1016/J. BIORTECH.2014.10.114]
- Turon, V., Trably, E., Fouilland, E., Steyer, J.P. (2016) Potentialities of dark fermentation effluents as substrates for microalgae growth: A review. *Process Biochem*; 51:1843–54. [DOI:10.1016/j.procbio.2016.03.018]
- Verma, R., Kumari, K.V.L., Srivastava, A., Kumar, A. (2020) Photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culture media optimization for enhanced microalgae production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 8. 104149. [DOI:10.1016/j.jece.2020.104149]
- Waghmare, A., Salve, M., LeBlanc, J.G., Arya, S. (2016) Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing*. 3. [DOI:10.1186/s40643-016-0094-8]
- Wang, C., Chuprom, J., Wang, Y., Fu, L. (2020) Beneficial bacteria for aquaculture: nutrition, bacteriostasis and immunoregulation. *J Appl Microbiol.*; 128(1): 28-40. [DOI: 10.1111/jam.14383]
- Wang, Y., Tibbetts, S.M., McGinn, P.J. (2021) Microalgae as Sources of High-Quality Protein for Human Food and Protein Supplements. *Foods*; 10(12): 3002. [DOI: 10.3390/foods10123002]



- Williamson, E., Ross, I.L., Wall, B.T., Hankamer, B. (2023) Microalgae: potential novel protein for sustainable human nutrition. *Trends Plant Sci.* S1360-1385(23)00268-6. [DOI: [10.1016/j.tplants.2023.08.006](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.08.006)]
- Wu, Z.Y., Shi, C.L., Shi, X.M. (2007) Modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* in batch and fed-batch cultures. *World J. Microb. Biotechnol.* 23 (9), 1233–1238. [DOI [10.1007/s11274-007-9354-2](https://doi.org/10.1007/s11274-007-9354-2)]
- Xie, T., Xia, Y., Zeng, Y., Li, X., Zhang, Y. (2017) Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris* Over-compensation strategy. *Bioresource Technol.* 233, 247–255. [DOI: [10.1016/j.biortech.2017.02.099](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.099)]
- Xie, Y., Zhang, Z., Ma, R., Liu, X., Miao, M., Ho, S.H., Chen, J., Kit Leong, Y., Chang, J.S. (2022) High-cell-density heterotrophic cultivation of microalga *Chlorella sorokiniana* FZU60 for achieving ultra-high lutein production efficiency. *Bioresour Technol.*; 365:128130. [DOI: [10.1016/j.biortech.2022.128130](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128130)]
- Yao, S., Lyu, S., An, Y., Lu, J., Gjermansen, C., Schramm, A. (2018) Microalgae-bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review. *Journal of Applied Microbiology.* 126. [DOI:[10.1111/jam.14095](https://doi.org/10.1111/jam.14095)]
- Zhang, J., Dong, Y., Song, K., Wang, L., Li, X., Lu, K., Tan, B., Zhang, C. (2022) Substituting Fish Meal with a Bacteria Protein (*Clostridium autoethanogenum* Protein) Derived from Industrial-Scale Gas Fermentation: Effects on Growth and Gut Health of Juvenile Large Yellow Croakers (*Larimichthys crocea*). *Fishes*, 7, 228. [DOI:[10.3390/fishes7050228](https://doi.org/10.3390/fishes7050228)]
- Zheng, Y., Li, T., Yu, X., Bates, P., Dong, T., Shulin, C. (2013) High-density fed-batch culture of a thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. *Applied Energy.* 108. 281-287. [DOI: [10.1016/j.apenergy.2013.02.059](https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.02.059)]



## Appendice 1

### Composizione del terreno BG-11

Per 100 ml di terreno

$\text{NaNO}_3$	1 ml
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	1 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1 ml
Acido citrico	1 ml
Citrato ferrico di ammonio	1 ml
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	1 ml
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	1 ml
<i>Micronutrienti</i>	100 $\mu\text{l}$

Stock solutions (100 ml)

$\text{NaNO}_3$	1,5 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	0,305 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,75 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,36 g
Acido citrico	0,06 g
Citrato ferrico di ammonio	0,06 g
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	0,01 g
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	0,2 g

*Micronutrienti* (1 L)

$\text{H}_3\text{BO}_3$ ,	61 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	287 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,	2,5 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	12,5 mg

Agar 15 g/l

D-Glucosio 20 g/l

## Appendice 2

### Composizione del medium M-8

	<i>mg/L</i>	<i>mL/L</i>
$KH_2PO_4$	734,86	
$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$	266,99	
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	394,35	
$CaNH_4$	1540,51	
<i>EDTA ferric sodium salt</i>	110,12	
$Na_2EDTA \cdot 2 H_2O$	37,22	
<i>Stock 1</i>		50
<i>Stock 2</i>		10

#### *Preparazione stock 1*

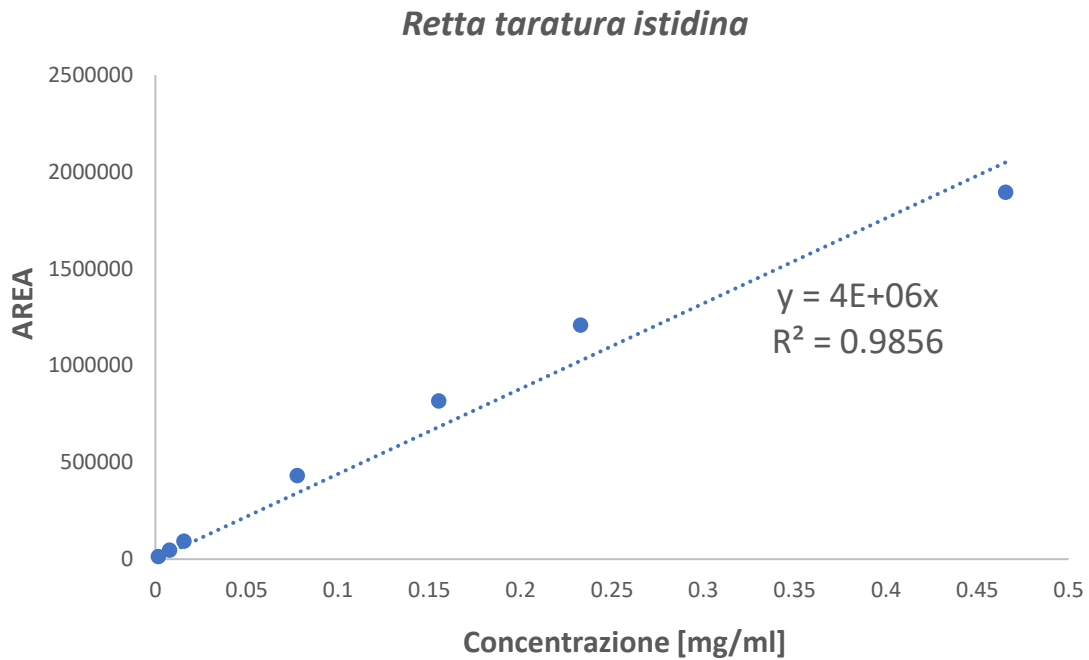
	<i>mg/L</i>
$H_3BO_3$	1,24
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	259,66
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	63,84
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	36,45

#### *Preparazione stock 2*

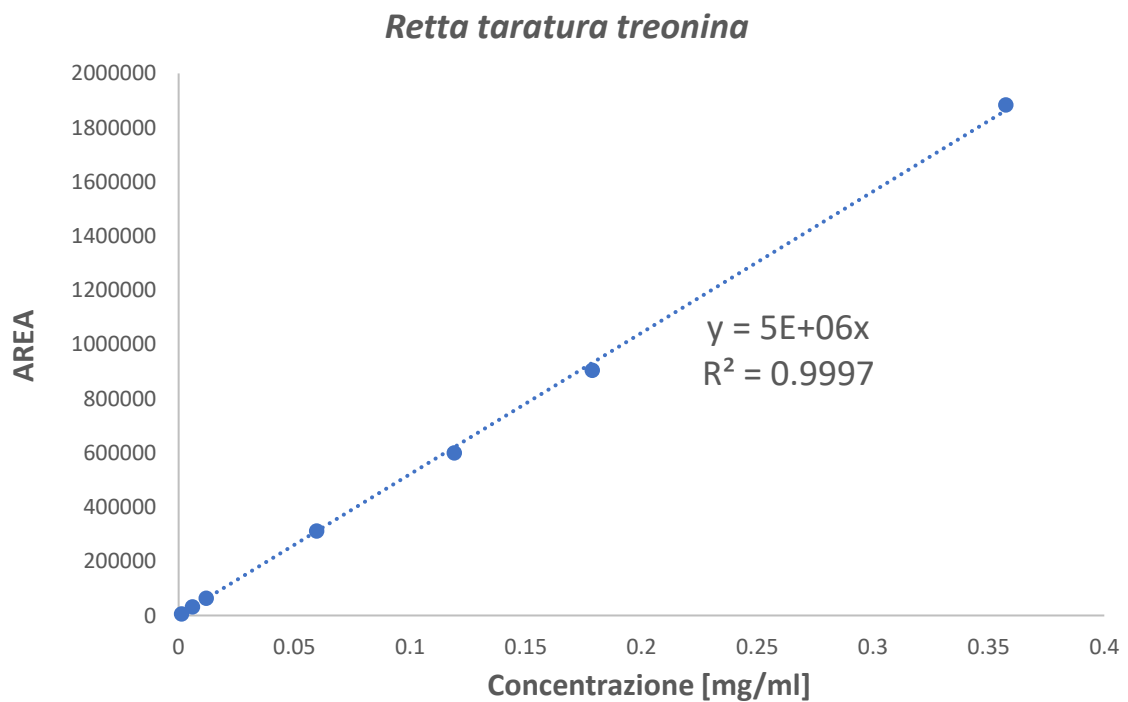
	<i>mg/L</i>
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	1323,09

### Appendice 3

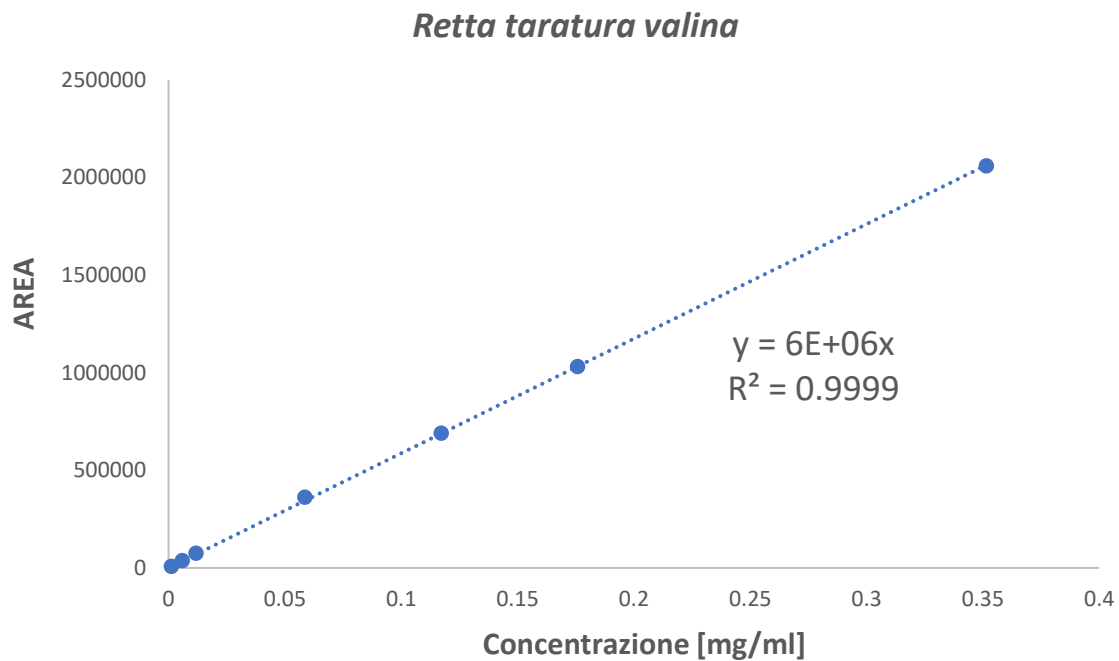
#### Rette di taratura AA essenziali



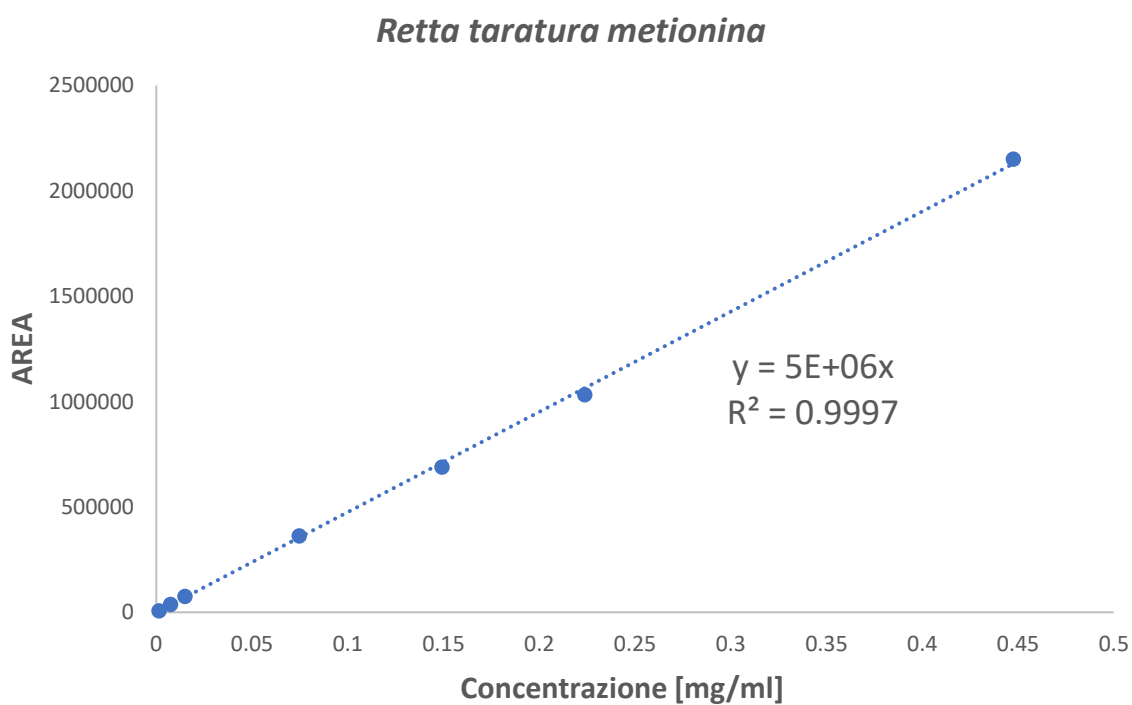
**Figura 8.1:** Retta di taratura istidina.



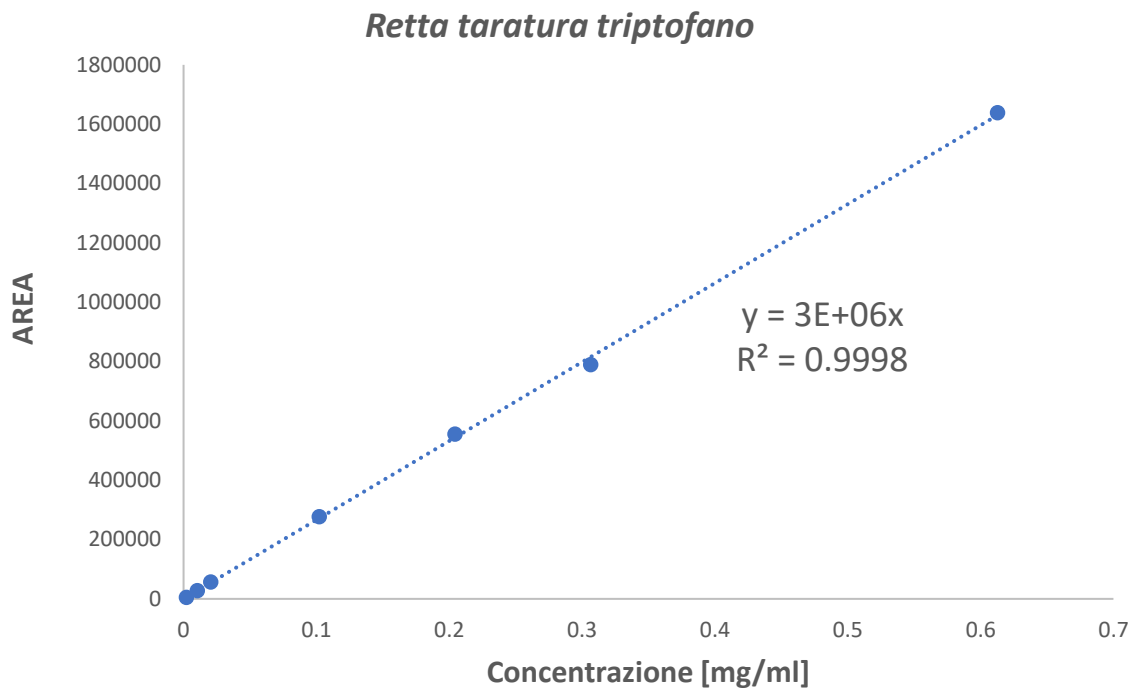
**Figura 8.2:** Retta di taratura treonina.



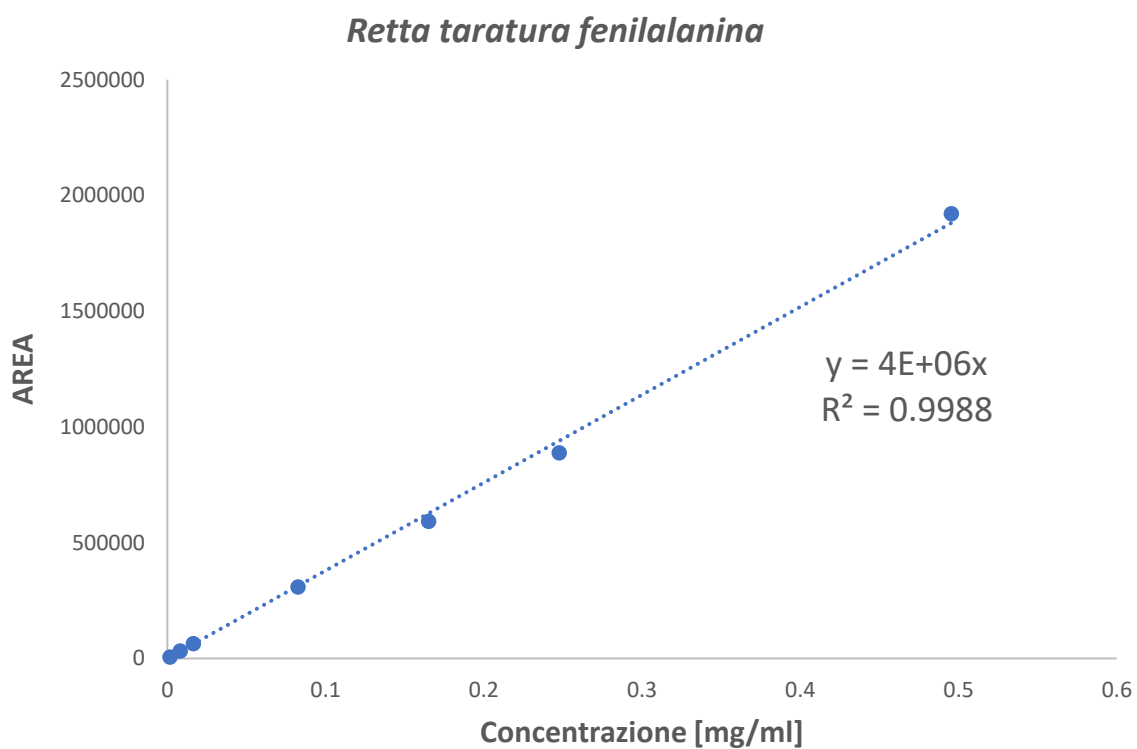
**Figura 8.3:** Retta di taratura valina.



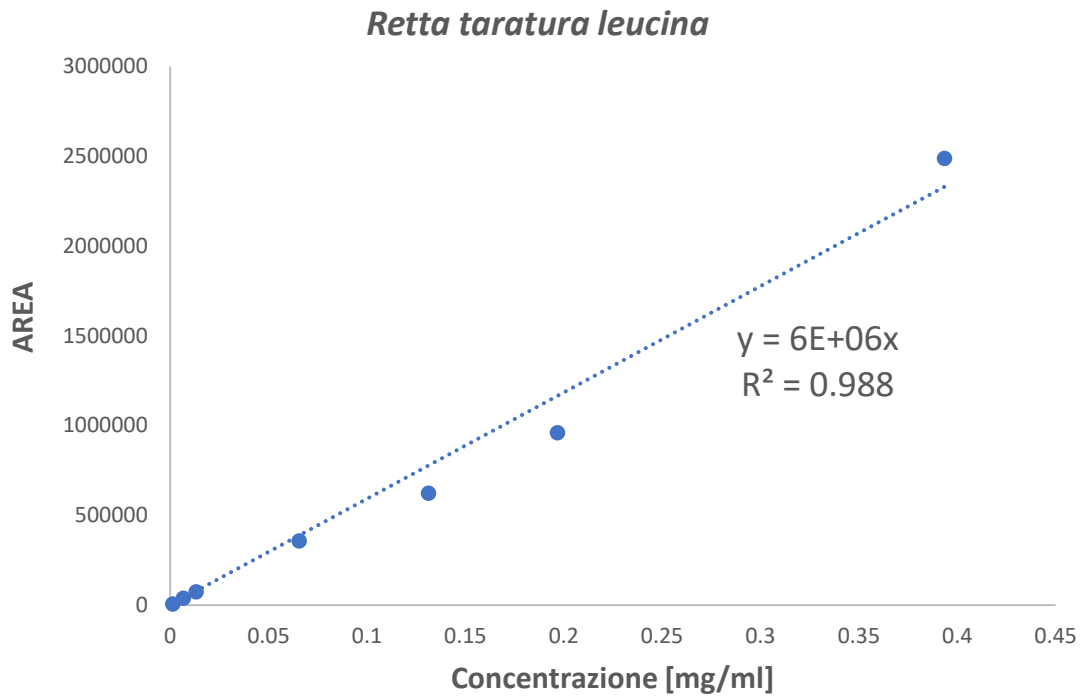
**Figura 8.4:** Retta di taratura metionina.



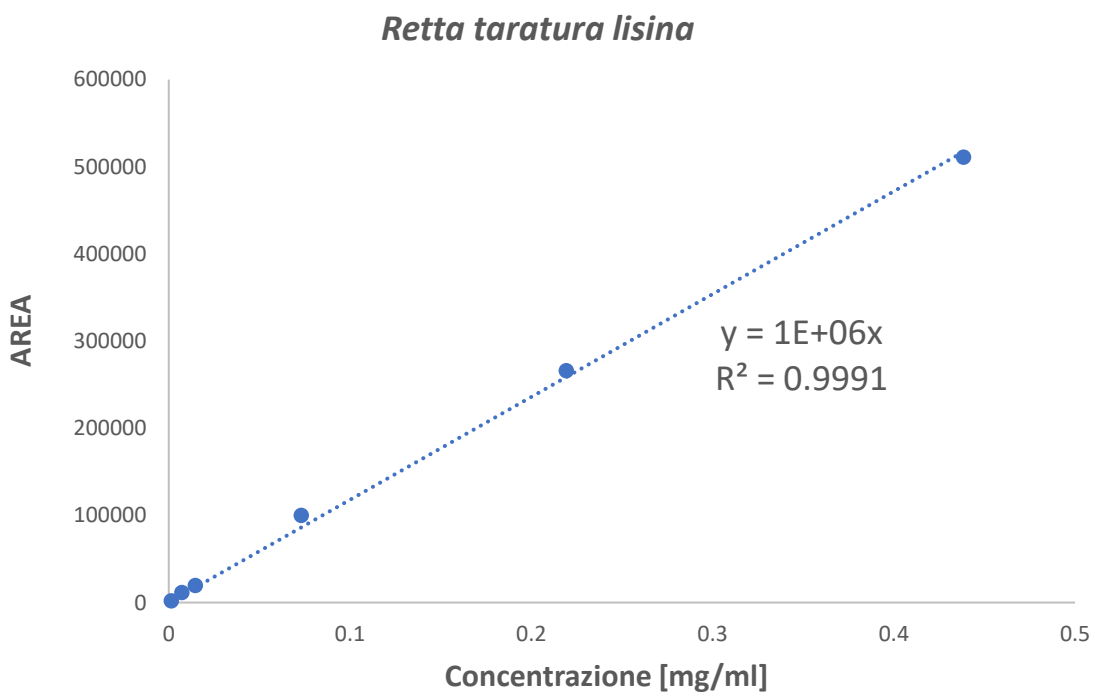
**Figura 8.5:** Retta di taratura triptofano.



**Figura 8.6:** Retta di taratura fenilalanina.

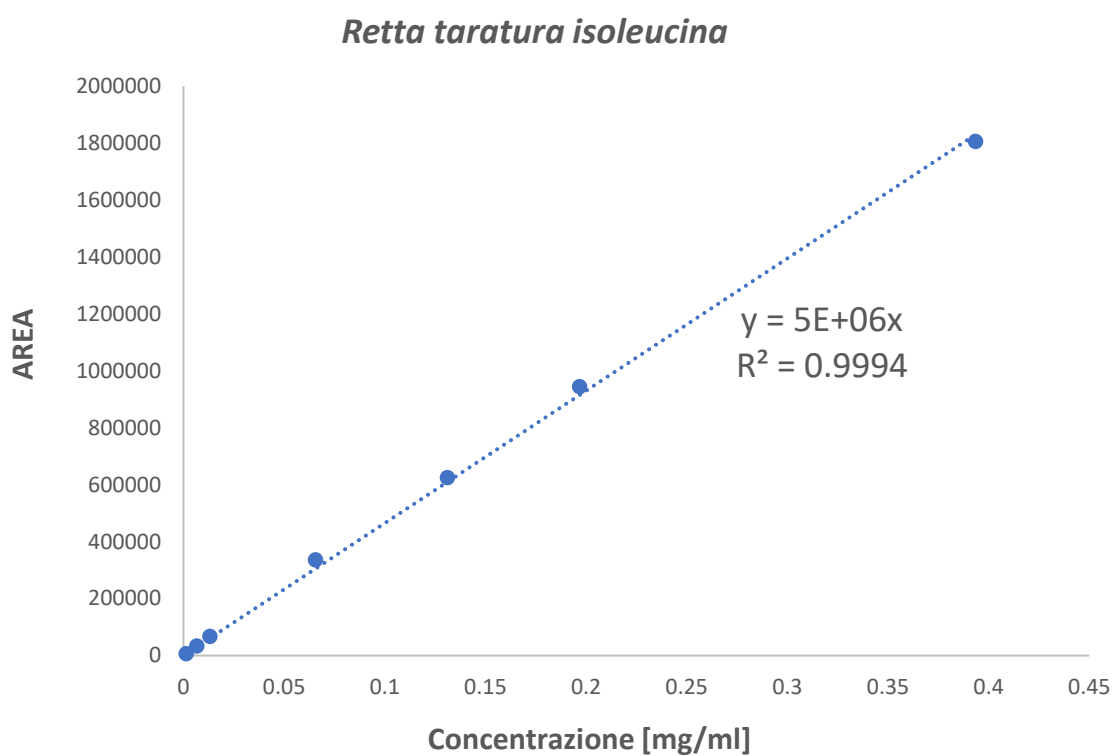


**Figura 8.7:** Retta di taratura leucina.



**Figura 8.8:** Retta di taratura lisina.





**Figura 8.9:** Retta di taratura isoleucina.



## *Ringraziamenti*

In conclusione di questo elaborato, desidero ringraziare tutte le persone che hanno contribuito alla stesura dello stesso.

Ringrazio la Prof.ssa Tonia Tommasi e Giacomo Proietti Tocca per avermi guidato in questi mesi di lavoro con la loro gentile disponibilità, permettendomi di conoscere ed approfondire un argomento originale e stimolante.

Ringrazio infinitamente i miei genitori e mio fratello, per avermi sempre sostenuta nel mio percorso universitario, soprattutto nei momenti di sconforto: il vostro supporto è stato fondamentale.

Un ringraziamento particolare, infine, è rivolto ad Elisa, Lorena e Michela, le migliori compagne di viaggio che potessi incontrare in questo percorso.