



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

LA FERMENTAZIONE DI BIOMASSA DI MICROALGHE  
PER LA PRODUZIONE DI ALIMENTI INNOVATIVI  
FUNZIONALI

MICROALGAE BIOMASS FERMENTATION AS SOURCE  
OF INNOVATIVE FUNCTIONAL FOODS

TIPO TESI: Compilativa

Studente:

EDOARDO DINO BASSO

*Edoardo Dino Basso*

Relatore:

PROF.SSA CRISTIANA GAROFALO

*Cristiana Garofalo*

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

# INDICE

ELENCO DELLE TABELLE.....	3
ELENCO DELLE FIGURE.....	4
INTRODUZIONE.....	5
CAPITOLO 1 LA FERMENTAZIONE ED I SUOI POTENZIALI UTILIZZI PER LA PRODUZIONE DI ALIMENTI INNOVATIVI A BASE DI MICROALGHE.....	9
CAPITOLO 2 AGGIUNTA DI BIOMASSA DI MICROALGHE E DEI SUOI DERIVATI NELLO YOGURT.....	14
2.1 Cambiamenti nella composizione fisico-chimica.....	14
2.2 Cambiamenti nei parametri del colore.....	18
2.3 Effetto sulle proprietà antiossidanti.....	19
2.4 Cambiamenti nella crescita delle colture starter e probiotiche.....	19
2.5 Effetti su sineresi, texture e viscosità.....	20
2.6 Effetti sulle proprietà sensoriali.....	21
CAPITOLO 3 UTILIZZO DI BIOMASSA DI MICROALGHE NEI FORMAGGI.....	22
3.1 Cambiamenti nella composizione fisico-chimica.....	22
3.2 Cambiamenti nei parametri del colore.....	26
3.3 Effetto sulle proprietà strutturali.....	26
3.4 Effetto sull'attività antiossidante.....	27
3.5 Cambiamenti nelle proprietà sensoriali.....	27
CAPITOLO 4 ALTRI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI.....	28
CAPITOLO 5 LEGISLAZIONE RIGUARDO L'USO DI BIOMASSA DI MICROALGHE O DERIVATI NEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI.....	29
CONCLUSIONI.....	33
RINGRAZIAMENTI.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	35

## ELENCO DELLE TABELLE

<i>Tabella 1</i>	<i>Composizione fisico-chimica delle specie di microalghe più studiate.....</i>	<i>6</i>
<i>Tabella 2</i>	<i>Studi sull'aggiunta di biomassa di microalghe e derivati nello yogurt. BFP: prima del processo di fermentazione; AFP: dopo il processo di fermentazione.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabella 3</i>	<i>Studi sull'utilizzo di biomassa di microalghe nei formaggi.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabella 4</i>	<i>Microalghe o derivati approvati per l'aggiunta nel latte e nei prodotti lattiero-caseari.....</i>	<i>30</i>

## ELENCO DELLE FIGURE

*Figura 1 La via omofermentativa ed eterofermentativa della fermentazione lattica.....10*

*Figura 2 La fermentazione alcolica.....12*

## INTRODUZIONE

Le microalghe sono microrganismi fotosintetici procarioti o eucarioti, capaci di crescere velocemente e di vivere in condizioni avverse ad altre specie. Esse sono una notevole fonte di composti bioattivi e altri prodotti. Queste caratteristiche hanno generato un interesse per il loro utilizzo. In letteratura sono state recensite circa 10 milioni di specie di microalghe, tuttavia fino ad oggi solo 50 (soprattutto dei generi *Arthrospira*, *Chlorella*, *Porphyry*, *Nannochloropsis*, *Haematococcaceae* e *Dunaliella*) sono state analizzate in dettaglio, in virtù del loro possibile uso biotecnologico come mostrato nella *Tabella 1*. La composizione nutrizionale delle microalghe è variabile sia all'interno delle specie stessa sia tra specie diverse in funzione del mezzo di crescita, del regime di temperatura e della disponibilità di luce. In ambito alimentare le microalghe sostituiscono macronutrienti di origine animale, ovvero proteine, acidi grassi essenziali e vitamine nello sviluppo di alimenti per vegetariani e vegani. Le microalghe sono impiegate per arricchire nutrizionalmente diversi prodotti, come biscotti, barrette nutrizionali, succhi, pasta, pane e latticini (Hernández et al., 2022).

Tabella 1 Composizione fisico-chimica delle specie di microalghe più studiate

Legenda: nr = dato non riportato.

Composizione fisico-chimica	Specie							
	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Auxenochlorella protothecoide</i>	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Dunaliella bardawil</i>	<i>Tetraselmis chuii</i>	
Proteine (% sostanza secca)	12-44	18-50	50-70	6-43	41-47	29-31	11-46	
Lipidi (% sostanza secca)	22-46	10-17	8-9,3	7-59	13-23	10-19	0,3-23	
Carboidrati (% sostanza secca)	24-39	15-31	13-48	15-35	34-43	11-12	30-54	
			<i>Pigmenti</i>					
Luteina (mg/kg)	0,2-5	nr	nr	nr	nr	4,2-6,7	624	
Clorofilla (mg/L)	6-18	0,3-2,3	5-14	0,1-4	1-5,3	7,9-9,1	353-400	
Ficocianina (mg/mL)	nr	nr	0,5-2,3	nr	nr	nr	nr	
Beta-carotene (mg/g)	nr	0,1-2,9	nr	0,1-1,1	0,1-52	0,8-1,5	0,1-1	
			<i>Vitamine (mg/kg)</i>					
B2	20-34	25-62	34-81	nr	nr	nr	5,3	
B3	0,2-0,3	51-70	0,1-55	nr	nr	nr	80	
B9	0,7-1	17-26	2,6-7,9	nr	nr	nr	200	
B12	0,3-2,4	0,9-1,7	1,6-3,2	nr	nr	0,42	78-195	
E	nr	nr	nr	nr	0,2-1,6	1,5-2	0,2	

C	nr	nr	nr	nr	0,9-1,3	1,8-2,2	0,8
<i>Acidi grassi (% acidi grassi totali)</i>							
<i>C16:0 (palmitico)</i>	20-30	13-41	43-57	11-25	14-16	15-17	19-36
<i>C18:3 n-3 (alfa-linolenico)</i>	22-24	0,9-3	1,3-23	2,4-30	0,1-0,3	22-31	22-28
<i>C18:3 (linolenico)</i>	26-28	0,3-7,4	14-19	22-35	nr	3,2-3,7	nr
<i>C16:2 (esadecadecenoico)</i>	12-23	0,1-2	2,2-6	0,4-3,5	1-2,5	12-14	1,8-5
<i>C18:1 (oleico)</i>	29-33	1,6-7,3	1-19	7,6-50	3,7-6,4	5,3-8,9	12,5-20

La biomassa microalgale è utile per la produzione di mangimi ad alto contenuto proteico e ricchi in carboidrati che migliorano la risposta immunitaria e la fertilità negli animali. In campo medico le microalghe rappresentano una fonte di composti benefici per la salute, in quanto possiedono proprietà antipertensive ed antinfiammatorie. Anche in ambiti molto diversi come la produzione di bioplastica e di biocarburante è possibile utilizzare microalghe, grazie all'alto contenuto di lipidi e proteine. Attualmente le industrie alimentari stanno esplorando la potenzialità di nuovi ingredienti, di cui alcuni indicati come funzionali o nutraceutici, per ridurre il rischio di malattie o migliorare la salute del consumatore. Data l'alta concentrazione di composti bioattivi, le microalghe sono riconosciute come potenziali ingredienti per la produzione di cibi innovativi. Inoltre, i latticini vengono considerati come un'ottima fonte di nutrienti e sono consumati dalla gran parte delle persone. Nonostante i prodotti lattiero-caseari abbiano un ottimo profilo nutrizionale, i consumatori odierni chiedono al mercato prodotti sostenibili anche di origine animale e con effetti benefici sulla salute. I prodotti lattiero-caseari a base di microalghe ottenuti in seguito a fermentazione con microrganismi quali batteri lattici e lieviti mostrano interessanti proprietà e benefici per la salute umana. Ad esempio, è stato dimostrato che il consumo di tali alimenti rafforza ossa e denti, riduce l'ipertensione e le malattie cardiovascolari, promuove la salute gastrointestinale e stimola il sistema immunitario (Hernández et al., 2022).

# Capitolo 1

## LA FERMENTAZIONE ED I SUOI POTENZIALI UTILIZZI PER LA PRODUZIONE DI ALIMENTI INNOVATIVI A BASE DI MICROALGHE

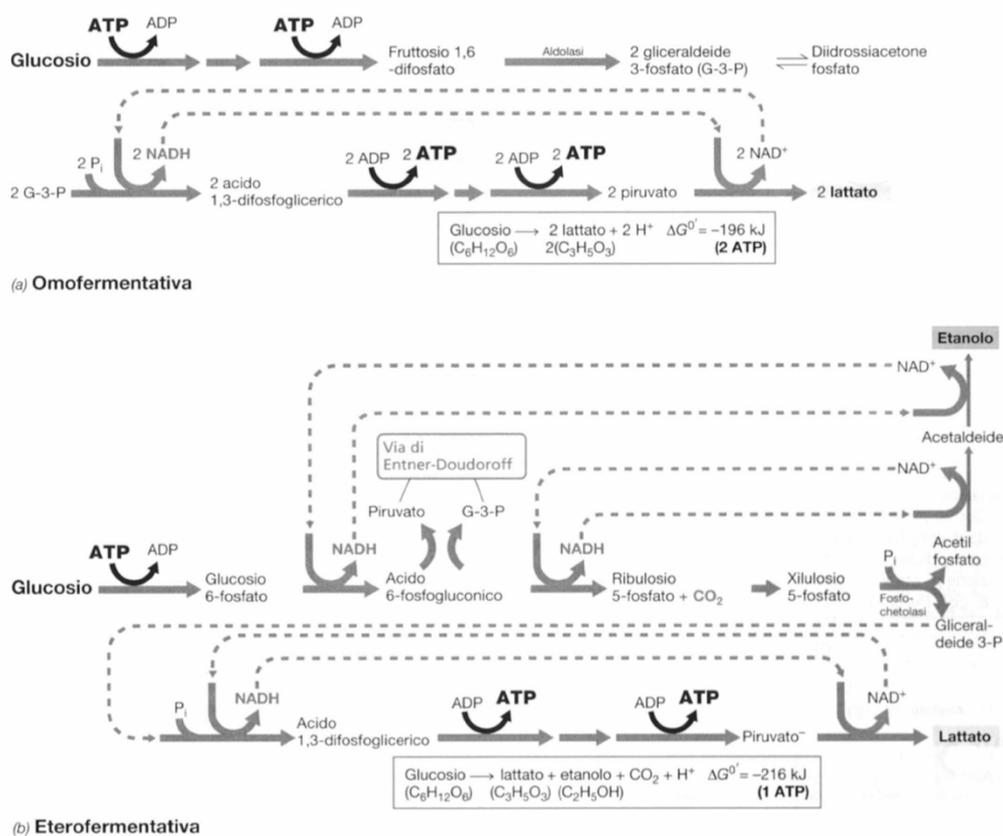
Il termine fermentazione deriva dal latino, *fevere* (che significa bollire). La fermentazione è uno dei metodi più importanti per la trasformazione di alimenti. Questa via metabolica fu studiata per la prima volta da Louis Pasteur che la descrisse come “*la vie sans l’air*”, cioè “la vita senza aria”. Durante la fermentazione avviene la degradazione dei composti organici ad opera di microrganismi in anaerobiosi (assenza di ossigeno) e aerobiosi (presenza di ossigeno). Essa determina la biosintesi di ATP e la produzione di importanti prodotti commerciali. Nel processo fermentativo i carboidrati e altri substrati organici fungono da donatori di elettroni e si ottengono uno o più prodotti finali in funzione del tipo di microrganismo che lo compie e della tipologia di fermentazione. I prodotti primari sono: acidi, alcoli e gas. Questo processo metabolico è influenzato dalla concentrazione, dall’età e dallo stato dei microbi attivi e dal contenuto di zuccheri fermentescibili, dal pH, dalla temperatura e pressione, dalla salinità e dalla miscelazione fluida del mezzo fermentato. La fermentazione microbica industriale è suddivisa in quattro categorie in base ai seguenti criteri: i) la generazione di biomassa, ii) la produzione di metaboliti primari (etanolo, acido lattico...), iii) la produzione di metaboliti secondari (sintesi di enzimi, vitamine...) e, iv) la trasformazione o conversione del substrato in prodotti ad alto valore aggiunto.

I due tipi di fermentazione più comuni sono quella lattica e alcolica.

La fermentazione lattica è svolta da batteri lattici del genere *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. L’acido lattico è il principale metabolita prodotto al termine di questa fermentazione ed è presente nella configurazione D o L (in base alla deviazione di un fascio di luce verso destra o sinistra) o come una miscela delle due, presentando due distinti enantiomeri chirali. Questa fermentazione può presentare come prodotto finale solo l’acido lattico (specie omofermentative) o acido lattico con etanolo e anidride carbonica (specie eterofermentative). La via omofermentativa consiste inizialmente nella glicolisi, processo in cui il glucosio (zucchero esoso) viene trasformato in piruvato per poi continuare con il piruvato che si comporta come accettore di elettroni per ossidare il NADH

a  $\text{NAD}^+$  e si trasforma in lattato (due molecole di lattato da ogni glucosio ossidato). I batteri eterofermentativi trasformano l'esoso in lattato, anidride carbonica, acetato ed etanolo attraverso la via del pentoso fosfato. In seguito alla fosforilazione del glucosio in glucosio 6-fosfato si verificano due reazioni ossidative: la prima porta al gluconato 6-fosfato, mentre la seconda forma ribulosio 5-fosfato. Il ribulosio 5-fosfato diventa xilulosio 5-fosfato, successivamente trasformato in acetil fosfato o gliceraldeide 3-fosfato (G3P), metabolizzata in acido lattico. A seconda delle condizioni ambientali il G3P può essere ridotto ad etanale e poi ad etanolo o diventare acetato (Figura 1.)

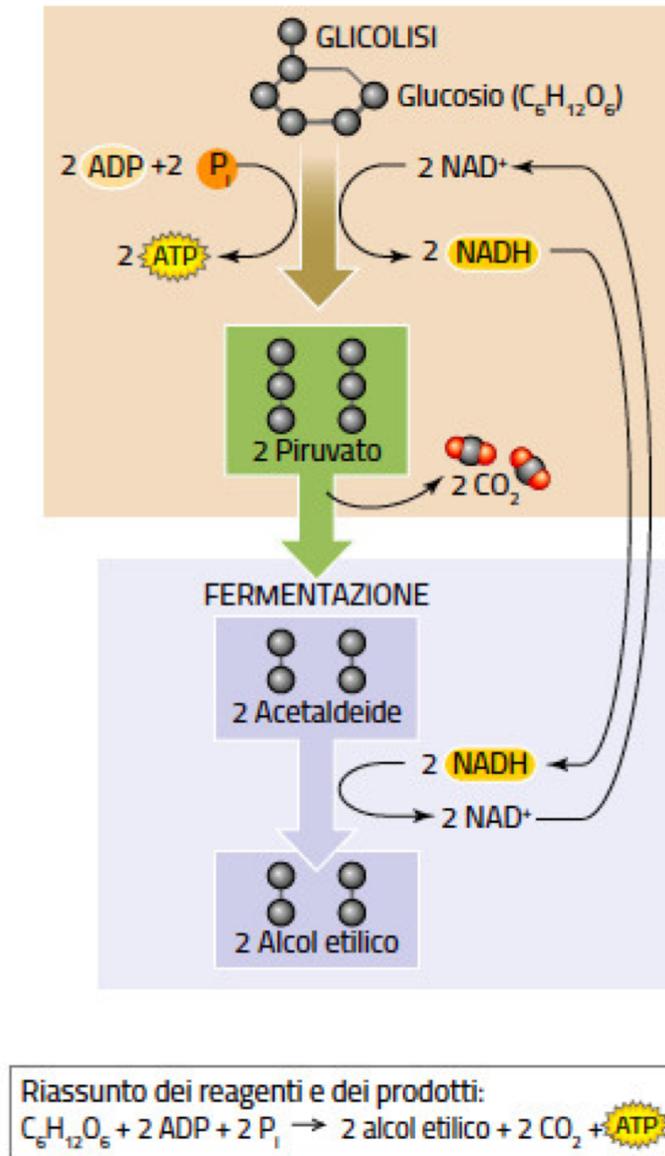
Figura 1 La via omofermentativa ed eterofermentativa della fermentazione lattica (da Madigan, et al., 2020, Brock, Biologia dei microrganismi 14<sup>a</sup> edizione).



I due tipi di fermentazione lattica descritti precedentemente servono a trasformare e conservare prodotti alimentari come il formaggio e lo yogurt. I batteri lattici possono idrolizzare le pareti cellulari delle piante e dei cianobatteri, scomponendo i polisaccaridi, lipidi e proteine in molecole più piccole con maggiore attività antiossidante, antinfiammatoria e immunomodulante. Il batterio lattico più utilizzato nella fermentazione di microalghe è *Lactiplantibacillus plantarum*. La fermentazione di *Arthrospira platensis* (commercialmente Chiamata Spirulina) con questo batterio ha migliorato il profilo bioattivo della microalga, incrementando il contenuto fenolico totale, il contenuto di ficocianina e potenziando l'attività antiossidante, oltre al rilascio di amminoacidi liberi e peptidi bioattivi (De Marco Castro et al., 2019). Inoltre, *A. platensis* è in grado di promuovere la crescita di *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus casei*, *Lactobacillus* sp. JL2, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, e *Streptococcus thermophilus*. A seguito di esperimenti effettuati in laboratorio utilizzando una concentrazione di 10 mg/ml di *A. platensis*, si è osservato un potenziamento della crescita di *Lc. casei*, *L. acidophilus* e *S. thermophilus* rispettivamente del 145,90, 171,67 e 185,84% (Bhowmik et al., 2009).

La fermentazione alcolica serve a trasformare e stabilizzare substrati ricchi di zuccheri. Questa fermentazione è attivata principalmente dai lieviti, tuttavia alcuni funghi ed *Escherichia coli* sono anche in grado di produrre alcol. Tra le specie di lieviti la più conosciuta è *Saccharomyces cerevisiae*. I microrganismi metabolizzano gli zuccheri in anidride carbonica ed etanolo. Inizialmente il lievito produce il piruvato mediante la glicolisi, ottenendo ATP, NADH e altri precursori biosintetici come il 3-fosfoglicerato. In seguito il piruvato viene decarbossilato ad acetaldeide, ridotta ad alcol (Figura 2).

Figura 2 La fermentazione alcolica (Sadava, et al. La nuova biologia.blu, 2ª edizione, 2020).



Questa fermentazione si utilizza principalmente per la produzione di biocarburanti e combustibili. Le alghe infatti devono rilasciare i carboidrati per produrre bioetanolo (un biocarburante).

I pretrattamenti utilizzati includono l'idrolisi acida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> combinata a pressione, differenti concentrazioni di HCl, acido fosforico H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, idrolisi alcalina con NaOH, variazioni di pH e ultrasuoni combinati con trattamento termico. Tra le alghe utilizzate per la produzione di bioetanolo ricordiamo *Chlorella vulgaris* e Spirulina.

E' stata studiata l'influenza della fermentazione di microalghe sulla sintesi di composti bioattivi con capacità antiossidante e antinfiammatoria. *Pavlova lutheri* è stata fermentata con *Hansenula polymorpha*, *Levilactobacillus brevis* e *Candida rugopelliculosa*, mentre *Arthrospira platensis* con *L. acidophilus*, *Lc. casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis* e *B. longum* per studiarne la capacità antiossidante (Pèrez-Alva et al., 2022). Nel caso di *P. lutheri* è stato eseguito un pretrattamento con cellulasi, scomponendo i componenti della parte cellulare. La capacità antiossidante assume valori diversi in base al test utilizzato per la determinazione. Uno studio ha dimostrato che la capacità antiossidante di *A. plantesis*, fermentata con *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *Lc. casei*, *B. infantis*, *B. longum* e *Lc. lactis* era massima dopo 21 h di fermentazione rispetto al campione di controllo non fermentato. Anche il contenuto fenolico delle microalghe fermentate era maggiore (33,64 mg/g GAE, acido gallico equivalente) rispetto al controllo (19,47 mg/g GAE, acido gallico equivalente). I dati ottenuti sono stati attribuiti ad un aumento della ficocianobilina e al rilascio di composti fenolici ad esempio l'acido gallico. Nel caso di *P. lutheri*, fermentata con *C. rugopelliculosa*, l'attività antiossidante era dose-dipendente (0,01-1000 µg/ml di microalga fermentata). Questa capacità antiossidante era determinata soprattutto dal rilascio di peptidi bioattivi e amminoacidi (arginina, glicina e prolina), che fungono da donatori di elettroni e reagiscono con i radicali ossidrilici trasformandoli in composti più stabili. Fermentando *P. lutheri* con *H. polymorpha* l'attività di inibizione della perossidazione lipidica presentava valori più elevati dopo 12 giorni di fermentazione. La fermentazione incide anche sull'attività antinfiammatoria delle microalghe, attribuita soprattutto al loro contenuto di polisaccaridi. I batteri lattici *L. brevis*, *L. acidophilus*, *Lc. casei*, *Lc. lactis*, *B. bifidum*, *B. infantis* e *B. longum* e i batteri gram-positivi sporigeni *B. subtilis* sono stati usati per migliorare l'attività antinfiammatoria delle microalghe. In dettaglio, l'ossido nitrico NO, sintetizzato da cellule coinvolte nell'immunità e nell'infiammazione, danneggia i tessuti target nel processo infiammatorio. A tal proposito è stato studiato l'effetto soppressivo delle microalghe fermentate sulla sintesi di NO, usando il modello cellulare RAW 264.7 stimolato da liposaccaridi (LPS). Si è osservato che la produzione di NO era inibita dalla concentrazione di microalghe fermentate pari a 5 mg/ml e concentrazioni tra 0,63 e 2,50 mg/ml ne diminuivano la produzione del 40-50% (Liu et al., 2011).

## Capitolo 2

### AGGIUNTA DI BIOMASSA DI MICROALGHE E DEI SUOI DERIVATI NELLO YOGURT

I lattici fermentati come lo yogurt sono molto richiesti dal consumatore. In letteratura sono presenti studi sull'incorporazione di matrici ricche di composti nutraceutici, come biomasse algali o derivati, aggiunti al latte prima della fermentazione o al prodotto finale dopo la fermentazione (Hernández et al., 2022). In base alla scelta effettuata si hanno cambiamenti nelle caratteristiche fisico-chimiche, sensoriali o meccaniche del prodotto (*Tabella 2*).

#### 2.1 Cambiamenti nella composizione fisico-chimica

Nella formulazione dello yogurt è stata studiata l'aggiunta di biomassa di *A. platensis* o dei suoi derivati che ha determinato un aumento del contenuto proteico di circa il 70%. Nello studio condotto da Atallah et al. (2020) i valori proteici erano del 5,4% per il campione di controllo e del 6,2% per lo yogurt fortificato con l'aggiunta dell'1% di *A. platensis* prima della fermentazione. Valori simili sono stati riscontrati da Silva et al. (2019), nonostante il cianobatterio sia stato aggiunto dopo il processo fermentativo. Non vi sono state differenze tra i campioni di controllo (campioni senza l'aggiunta di microalghe) e quelli di yogurt fortificato in termini di contenuto di grassi e carboidrati.

Tabella 2 Studi sull'aggiunta di biomassa di microalghe e derivati nello yogurt.

Legenda: BFP: aggiunta prima del processo di fermentazione, AFP: aggiunta dopo il processo di fermentazione, p/v= peso/volume, p/p=peso/peso.

Microalghe o derivati	Tasso di aggiunta	Caratteristiche fisico-chimiche, sensoriali, strutturali o funzionali	Riferimenti
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,25; 0,50 e 1% (p/v) BFP	Rispetto al controllo: l'acidità finale (°D) e il potenziale redox finale (mv) erano superiori; i valori di pH e acido acetico (%) erano uguali; la consistenza e la sensazione in bocca, l'aspetto e la consistenza strumentale erano inferiori.	Beheshtipour et al. (2012)
<i>Isochrysis galvana</i>	2% (p/p) AFP	Rispetto al controllo: le percentuali di proteine e ceneri erano superiori; il contenuto lipidico era uguale; i livelli di acidi grassi omega 3 erano superiori.	Matos et al. (2021)
<i>Pavlova lutheri</i>	0,25 e 0,5% (p/v) AFP	Rispetto al controllo: i contenuti di umidità, carboidrati, proteine e grassi erano uguali; i valori di pH durante la conservazione (28 giorni) erano simili. Il tasso di aggiunta nei trattamenti era correlato negativamente con il colore, il gradimento di sapore, il gradimento della consistenza e l'accettabilità generale.	Robertson et al. (2016)
<i>Ficocianina da Arthrospira plantensis</i>	2, 4 e 8% (p/p) BFP	Rispetto al controllo: i trattamenti hanno mostrati valori di pH superiori durante 21 giorni di conservazione, mentre gli yogurt hanno mostrato una viscosità inferiore. Il trattamento con il 4% di ficocianina è stato il più gradito dai consumatori.	Mohammadi et al. (2019)
<i>Arthrospira plantensis</i>	0,25, 0,50, 0,75 e 1% (p/v) BFP	Rispetto al controllo: il contenuto di solidi totali, proteine, ceneri e grassi era superiore; i valori di pH dei trattamenti erano inferiori; i campioni fortificati mostravano una compattezza inferiore. Gli yogurt aventi il 2% <i>A. plantensis</i> erano i più accettabili per i consumatori.	Barkallah et al. (2017)

<i>Arthrospira plantensis</i>	1% (p/p) AFP	Rispetto al controllo: i livelli di umidità, grasso, proteine e lattosio erano superiori, così come i valori di pH.	Silva et al. (2019)
<i>Arthrospira plantensis</i>	0,13, 0,25, 0,38 e 0,5% (p/v) BFP	Rispetto al controllo: i livelli di acidità nello yogurt fortificati erano maggiori durante 16 giorni di conservazione. Il gradimento complessivo è diminuito all'aumentare della quantità di <i>A. platensis</i> . La capacità antiossidante si è ridotta nella conservazione. Il contenuto di ceneri, solidi totali, grassi e proteine è incrementato rispetto al controllo.	Alizadeh et al. (2020)
<i>Arthrospira plantensis</i>	1% (p/p) BFP	Non ci sono variazioni rilevanti nei valori di acidità e pH. Il contenuto fenolico totale e l'attività antiossidante sono aumentati nei trattamenti con <i>A. platensis</i> . I valori di viscosità apparente erano maggiori nei campioni rispetto al controllo.	Atallah et al. (2020)
<i>Arthrospira platensis</i>	0,1, 0,3 e 0,5% (p/v) BFP	Rispetto al controllo: i livelli di contenuto solido, proteine, grassi, ceneri, carboidrati e acidità negli yogurt integrati erano superiori; i valori di pH si sono ridotti, mentre quelli di durezza e viscosità dei campioni fortificati sono aumentati.	Bchir et al. (2019)

Lo studio di Mohammadi et al. (2019) ha dimostrato che la ficocianina, pigmento estratto da *Spirulina*, può essere impiegato come ingrediente funzionale grazie alle sue proprietà antitumorali, antinfiammatorie, antiossidanti e nefroprotettive. In questo studio è stato osservato che, al crescere della concentrazione di ficocianina (2, 4 e 8%), i valori di pH sono aumentati dal campione di controllo (4,4) a quelli di yogurt fortificato (4,74, 4,80 e 4,92). L'ipotesi è che questo incremento possa dipendere dal pH della ficocianina (6,55).

## 2.2 Cambiamenti nei parametri del colore

Il colore è associato all'accettabilità dello yogurt. In alcuni studi è stato valutato l'effetto dell'aggiunta di microalghe sul colore dei prodotti finali mediante la scala CIElab (L\* grado di luminosità; a\* grado di rosso e verde; b\* grado di giallo e blu). Barkalla et al. (2017) hanno valutato i parametri di colore degli yogurt fortificati con *A. plantensis* e hanno constatato che i campioni arricchiti con lo 0,25% di polvere algale, presentavano i valori più bassi di a\* e b\*, il che indica che il colore dei campioni è passato dal giallo al verdastro. Questo dipende dalla concentrazione elevata di clorofilla nel cianobatterio. Un andamento simile è stato ottenuto da Robertson e al. (2016) nei campioni di yogurt fortificato con lo 0,25% e 0,5% di *P. lutheri* dopo 28 giorni di conservazione. I fattori quali acidità e pH possono anche influenzare il colore dello yogurt. La ficocianina presente in *A. plantensis* può essere utilizzata come pigmento negli alimenti a pH superiore a 4,0, se non esposti a luce e calore in quanto i pigmenti presenti nella microalga sono instabili. I valori di L\* a\* e b\*, registrati da Mohammadi et al. (2019) negli yogurt a pH superiore a 4,0 contenenti il 2%, 4% e 8% di ficocianina, non mostravano differenze sostanziali durante i 28 giorni di conservazione. Alizadeh et al. (2020) hanno studiato i cambiamenti di colore negli yogurt con lo 0,25% e lo 0,5% di *A. plantensis*, aggiungendo la gomma Zedo (arabinogalattano, polisaccaride dell'*Amigdalus scoparia*). Essi hanno dimostrato che la biomassa algale era stabilizzata dall'interazione tra le proteine del latte e il polisaccaride anionico. I batteri lattici nel latte causano l'acidificazione del mezzo, il cui valore di pH assumeva valori inferiori al punto isoelettrico (valore di pH al quale la proteina presenta la carica elettrica netta nulla), andando a favorire l'interazione con la gomma.

### 2.3 Effetto sulle proprietà antiossidanti

L'aggiunta di biomassa microalgale ai prodotti ha consentito di incorporare anche molecole antiossidanti come il beta-carotene, luteina e astaxantina. Lo yogurt possiede anche un'importante capacità antiossidante, per la presenza di zolfo, amminoacidi, carotenoidi, zinco, selenio e alcuni enzimi prodotti nella fermentazione. Alcuni studi hanno messo in evidenza che fortificando lo yogurt con biomassa microalgale, questo riportava una maggiore capacità antiossidante. Silva et al. (2019) hanno osservato che la capacità antiossidante aumentava del 150% negli yogurt fortificati con l'1% di *A. platensis*, rispetto ai campioni di controllo.

### 2.4 *Booster* nella crescita delle colture starter e probiotiche

Le microalghe hanno la capacità di sintetizzare nutrienti per la crescita e la vitalità di batteri lattici e dei batteri probiotici. Le sostanze nutritive fornite sono esopolisaccaridi, adenina, ipoxantina, amminoacidi liberi, minerali e vitamine. Inoltre, l'aggiunta di microalghe nello yogurt incide sulla capacità tampone del mezzo (misura della capacità di una soluzione tampone di opporsi alla variazione di pH dopo l'aggiunta di una certa quantità di base o acido forte), che promuove la vitalità dei microrganismi probiotici nel processo di fermentazione. In particolare Beheshtipour e al. (2012) hanno studiato l'incorporazione di *C. vulgaris* e *A. platensis* in yogurt. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la fortificazione di yogurt con *A. platensis* in concentrazione pari a 0,25%, 0,50% e 1,0%, determinava una maggiore capacità tampone rispetto all'aggiunta di *C. vulgaris* alla stessa concentrazione. Questa differenza tra i campioni con *C. vulgaris* e *A. platensis* era dovuta alla diversa quantità di nutrienti forniti dalle microalghe.

## 2.5 Effetti su sineresi, *texture* e viscosità

La sineresi è una proprietà correlata ai cambiamenti nella rete caseinica del latte per via della acidificazione durante la fermentazione. L'aggiunta di biomassa microalgale può ridurre il tasso di sineresi nello yogurt, in quanto *A. platensis* contiene un'elevata concentrazione di carboidrati e proteine che interferisce con la formazione del gel di caseine e la sineresi diminuisce all'aumentare di carboidrati e proteine. L'aggiunta delle microalghe influisce di conseguenza anche sulla *texture* o consistenza dello yogurt. Bchir et al. (2019) hanno effettuato uno studio in cui è stata aggiunta *A. platensis* a concentrazione superiore dello 0,3%, che ha determinato un aumento della consistenza del gel con risultati superiori a 0,67N, mentre nel campione di controllo era pari a 0,60N. E' stato verificato un rafforzamento della rete tridimensionale del gel. L'ipotesi è che l'aumento della *texture* possa dipendere dall'acidificazione causata dai batteri lattici che ha rinforzato la rete gelificante assorbendo acqua grazie all'alto contenuto proteico delle microalghe. All'opposto, lo studio di Barkallah et al. (2017) ha dimostrato che, l'aumento della concentrazione di *A. platensis*, determina una minore stabilità del reticolo causata dalla rottura della rete tridimensionale. La viscosità dello yogurt dipende anche dalle specie e dalla concentrazione delle colture starter utilizzate, dalla manipolazione e aggiunta di stabilizzanti e dalla conservazione. La viscosità apparente dipende dal livello e dal tipo di microalga aggiunta. Un incremento di microalghe determina un aumento della viscosità apparente. Nell'esperimento di Bchir et al. (2019) la viscosità apparente era pari a 903 mPa.s alla velocità di taglio a 200 rpm fortificando i campioni con *A. platensis* allo 0,5%, mentre in quelli di controllo era pari a 700 mPa.s. In conclusione, negli yogurt fortificati con microalghe c'era un maggiore contenuto proteico che aumenta la viscosità, incrementando il grado di strutturazione del sistema.

## 2.6 Effetto sulle proprietà sensoriali

L'aggiunta di microalghe e derivati ha determinato un effetto anche sulle caratteristiche sensoriali dello yogurt. *P. lutheri*, aggiunta allo 0,25% e 0,5% (p/v), ha influenzato le proprietà colorimetriche dello yogurt, perché contiene carotenoidi, clorofilla, beta-caroteni e fucoxantina. Gli studi di Bchir et al. (2019) hanno riportato un colore verdastro e la sedimentazione della microalga, utilizzando *A. platensis* a concentrazione 0,5% (p/p). Questo yogurt ha portato ad un punteggio più basso nella valutazione degli attributi sensoriali. Attalah et al. (2020) hanno osservato un punteggio più basso per sapore, corpo e consistenza, aspetto e accettabilità totale (integrando lo yogurt con lo 0,1% di *A. platensis*, a differenza degli yogurt fortificati con proteine del siero di latte e caseinato di sodio. L'aggiunta nello yogurt di ficocianina (un composto estratto dalle microalghe e vitale per le stesse) ha invece aumentato il livello di accettabilità per quanto riguarda la consistenza dello yogurt rispetto il campione di controllo (Hernández et al., 2022). In conclusione, per far sì che i prodotti caseari arricchiti con microalghe risultino accettabili, si dovranno mettere in atto strategie per ridurre al minimo il sapore e l'aroma di erbaceo e umami tipico delle microalghe.

## Capitolo 3

### UTILIZZO DI BIOMASSA DI MICROALGHE NEI FORMAGGI

Il formaggio è un prodotto caseario molto consumato nel mondo, perché ha tanti aromi derivanti dalla trasformazione delle proteine del latte, carboidrati e grassi (*Tabella 3*).

#### 3.1 Cambiamenti nella composizione fisico-chimica

Mohamed et al. (2013) hanno ottenuto un incremento dei valori proteici tra il 14,38 e il 15,70% e una riduzione dei valori di pH da 5,42 a 5,39 in campioni di formaggio fortificati con *C. vulgaris* all'1, 2 e 3%, rispetto al controllo (13,56% proteine, 5,80 pH). La coagulazione acida del formaggio aggiunto della biomassa algale e il suo contenuto proteico più elevato hanno determinato un calo del pH e un aumento del contenuto proteico. Golmakani et al. (2019) hanno osservato che i valori di pH di formaggio Feta fortificato con 0,5, 1 e 1,5% di *A. platensis* erano 4,81, 4,82 e 4,86 dopo 15 giorni di conservazione, mentre quello del controllo era pari a 4,6. Il fenomeno è stato spiegato con il fatto che *A. platensis* possiede una capacità tampone dovuta a proteine, peptidi e amminoacidi, che causa un aumento di pH. L'aggiunta di *C. vulgaris* al 3% ha determinato anche una diminuzione del tasso di separazione dei lipidi in campioni di formaggio fuso (17%), rispetto al campione di controllo (25%).

Tabella 3 Studi sull'aggiunta di biomassa di microalghe nei formaggi.

Legenda: p/p=peso/peso.

Microalghe	% di aggiunta	Caratteristiche fisico-chimiche, sensoriali, reologiche, strutturali o funzionali	Riferimenti
<i>Chlorella vulgaris</i>	1, 2 e 3% (p/p)	Non c'erano differenze rilevanti tra il controllo e l'analogo del formaggio arricchito col 3% di <i>C. vulgaris</i> in tutti i componenti chimici (contenuto di umidità, grassi, carboidrati e sale). Le proteine e i carboidrati hanno favorito l'aumento della compattezza e la diminuzione degli indici di separazione del formaggio.	Mohamed et al. (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	2, 4 e 8% (p/p)	L'aggiunta di microalga ha determinato un aumento del pH e del grado di fusione prima e dopo la conservazione rispetto al campione di controllo.	Tohamy et al. (2018)
<i>Arthrospira platensis</i>	0,5, 1 e 1,5% (p/p)	L'aumento della concentrazione della microalga ha determinato una riduzione dell'umidità e un aumento del contenuto di proteine e grassi nei formaggi a pasta molle. I formaggi fortificati con Spirulina mostravano un contenuto di beta-carotene superiore al controllo.	Agustini et al. (2016)
<i>Arthrospira platensis</i>	0,25, 0,5 e 1%	I campioni incorporati con <i>A. platensis</i> presentavano un maggiore quantità di proteine e grassi rispetto al controllo, mentre il pH dei campioni fortificati è diminuito leggermente. I formaggi con 0,25% e 0,5% della microalga erano più preferiti dal consumatore.	Bosnea et al. (2020)
<i>Arthrospira maxima</i>	1, 2 e 3% (p/p)	La capacità antiossidante è migliorata nei campioni integrati durante la conservazione rispetto al controllo. L'accettabilità complessiva ha ottenuto punteggi più alti sia per i campioni trattati sia per il controllo.	Mohamed et al. (2020)
<i>Arthrospira platensis</i>	0,5, 1 e 1,5% (p/p)	Il contenuto di proteine e ceneri dei formaggi arricchiti non ha risentito dell'integrazione con la microalga. I gradi di durezza sono diminuiti rispetto al controllo sia all'inizio sia alla fine della conservazione.	Golmakani et al. (2019)

<i>Arthrospira platensis</i>	0,5, 1 e 1,5% (p/p)	Il contenuto di grassi e proteine dei formaggi integrati con la microalga era maggiore rispetto al controllo, così come il contenuto di composti fenolici e flavonoidi e la capacità antiossidante.	Mohamed et al. (2017)
----------------------------------	---------------------------	---	-----------------------

---

### 3.2 Cambiamenti nei parametri di colore

Nel formaggio esiste una relazione diretta tra il colore e l'accettabilità del consumatore. I cambiamenti di colore del formaggio possono influire sulle caratteristiche sensoriali dello stesso. La colorazione viene alterata dall'incorporazione di biomassa microalgale, contenente molti pigmenti. Nello studio di Mohamed (2017) è risultato che i parametri di colore L\* (misura della luminosità) a\* e b\* (questi due parametri sono gamme di colori che vanno rispettivamente dal verde al rosso e dal blu al giallo) del formaggio Kareish (prodotto tipico egiziano) cambiavano aumentando la concentrazione di Spirulina che era usata in grani e, come atteso, i campioni arricchiti con 1,5% di Spirulina mostravano un colore verdastro per la presenza di clorofilla e ficocianina contenute nella microalga.

### 3.3 Effetto sulle proprietà strutturali

La consistenza del formaggio è condizionata dalla presenza di microalghe. Arricchendo analoghi del formaggio fuso con *C. vulgaris*, si sono ottenuti valori di durezza più alti. *C. vulgaris* consente un elevato assorbimento di acqua, che agevola la compattezza del prodotto caseario. Fradique et al. (2013) e Khemiri et al. (2020) hanno osservato una situazione simile rispettivamente nella pasta e nel pane. In generale, l'impiego di microalghe per potenziare le proprietà strutturali del formaggio risulta essere una via percorribile.

### 3.4 Effetto sull'attività antiossidante

Gli antiossidanti proteggono le cellule e il DNA dai radicali liberi, che potrebbero causare tumori, malattie coronariche o altre malattie croniche. L'attività antiossidante del formaggio si può migliorare fortificando il prodotto caseario con microalghe. Nello studio effettuato da Tohamy et al. (2018) l'attività antiossidante è aumentata arricchendo i campioni con *C. vulgaris* (4% p/p), ricca di antiossidanti quali luteina, clorofilla e selenio. Inoltre, si ipotizza che le alte temperature possano influenzare l'attività antiossidante nella cottura del formaggio fuso. Mohamed et al. (2020) hanno ottenuto una capacità antiossidante superiore al 57% aggiungendo *A. platensis* negli analoghi del formaggio fuso, contenente ficocianina, tocoferoli e composti fenolici.

### 3.5 Cambiamenti nelle proprietà sensoriali

I parametri sensoriali del formaggio possono influenzare l'accettabilità del consumatore. Il sapore del formaggio può essere anche condizionato dall'aggiunta di microalghe. In seguito ad analisi effettuate incorporando alte concentrazioni di *C. vulgaris* (al 4%) si sono ottenuti formaggi con una consistenza granulare non gradita dal cliente. Bosnea et al. (2020) hanno riportato che, fortificando con 1% di *A. platensis* un campione di formaggio greco, questo acquisiva un sapore amaro. Golmakani et al. (2019) hanno prodotto un formaggio Feta, arricchito con 0,5, 1,0 e 1,5% di *A. platensis*. Il sapore amaro aumentava all'aumentare della concentrazione di Spirulina, sia a causa delle caratteristiche intrinseche di Spirulina, ma anche a causa del processo di proteolisi (accumulo di peptidi che conferiscono il gusto amaro) che aumentava all'aumento del tempo di conservazione. Altri studi hanno proposto l'inclusione di beta-ciclodestrina, la fermentazione e l'estrazione con solventi come possibili soluzioni per ridurre l'amaro (Bao et al., 2018).

## Capitolo 4

### ALTRI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI

L'arricchimento con microalghe ha interessato anche prodotti lattiero-caseari come latte fermentato in polvere, Kefir, bevanda al latticello, Labenah (prodotto del Medio Oriente considerato un prodotto con consistenza intermedia tra formaggio e yogurt). Vlasenko et al. (2021) hanno creato una bevanda fermentata a base di latticello con *A. platensis* all'1,0, 1,5, 2,0 e 2,5% (p/p). I trattamenti effettuati con concentrazioni inferiori al 2% hanno determinato valori di acidità accettabili mentre quelli con concentrazioni superiori al 2% presentavano una acidità eccessiva. La motivazione risiedeva nel fatto che i batteri lattici producono una maggiore quantità di acido lattico durante la fermentazione in presenza di un'abbondante concentrazione di substrato algale.

Martelli et al. (2020) hanno studiato l'effetto di *A. platensis* (aggiunta al 0,25 e 0,5% p/v; peso/volume) in latte in polvere ricostituito e fermentato con *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (10% p/v) e aumentando la concentrazione di Spirulina, i valori di pH diminuivano, rispettivamente a 4,3 e 4,1. Inoltre, è stata analizzata la variazione di due indici reologici: l'indice di flusso (n) e l'indice di consistenza (K). Dopo l'aggiunta di *A. platensis* allo 0,25 e 0,5%, è stata riscontrata una diminuzione dei valori di "K" (2,56 e 1,77 Pa. s<sup>n</sup>) rispetto al campione di controllo; i valori di "n" sono aumentati da 0,366 a 0,439.

Mohamed et al. (2013) hanno prodotto Labenah ad alta qualità proteica arricchendolo con *A. platensis* (0,5% p/p). Infatti, è stato registrato un aumento del contenuto proteico (13,08% p/p) rispetto al controllo (10,60% p/p). Anche Laela et al. (2021) hanno riportato un contenuto proteico del 5,53% p/p nel campione incorporato con *A. platensis* al 2%, rispetto al 4,02% p/p del controllo. Inoltre, riguardo il Labenah è stato osservato che l'acidità aumenta durante la conservazione (Mohamed et al., 2019). In particolare, l'acidità (misurata in percentuale di acido lattico), aumentava da 2,2 % al giorno 0 fino a 2,8% al giorno 27; nello stesso arco temporale nel campione di controllo l'acidità passava dall'1,7% all'1,8%.

## Capitolo 5

### LEGISLAZIONE RIGUARDO L'USO DI BIOMASSA DI MICROALGHE O DERIVATI NEI PRODOTTI LATTIERO- CASEARI

A livello mondiale, l'EFSA (European Food Security Authority), la Food Safety and Standards Authority of India (FSSAI) e l'Australia New Zeland Food Authority (ANZFA) sono enti preposti a regolare la fortificazione di prodotti alimentari. La commercializzazione di prodotti fortificati deve rispettare una serie di requisiti normativi restrittivi. Il regolamento (CE) 1924/2006 ha stabilito che aggiungendo microalghe a prodotti lattiero-caseari, essi possano avere un alto contenuto proteico ed essere una fonte proteica. Negli Stati Uniti d'America le microalghe possono essere integrate negli alimenti perché identificate come GRAS (Generally Recognized as Safe). Questo status determinato dalla FDA (Food and Drug Administration) deriva da una serie di procedure scientifiche che mirano a dimostrare la sicurezza dell'ingrediente nel prodotto alimentare. *E. gracilis* (GNR 697), *A. platensis* (GNR 417) e *C. protothecoides* (GNR 519) possono essere aggiunte nel latte e nei prodotti lattiero-caseari, a concentrazioni diverse secondo la Tabella 4. In generale, le norme attualmente vigenti prevedono un basso valore dei livelli massimi di incorporazione, i quali non superano i 2g/100g di sostanza.

Tabella 4 Microalghe o derivati approvati per l'aggiunta nel latte e nei prodotti lattiero-caseari.

Legenda: DHA= acido docosaesaenoico o acido cervonico, acido grasso omega-3.

Autorità alimentare	Microalghe o derivati	Categoria alimentare	Livelli massimi o massima assunzione giornaliera	Etichettatura specifica aggiuntiva e requisiti	Riferimenti
EFSA (UE)	<i>Arthrospira platensis</i>	Latte e latticini	Illimitato	-	EC 258/97
	<i>Chlorella Luteoviridis</i>	Latte e latticini	Illimitato	-	EC 258/97
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Latte e latticini	Illimitato	-	EC 258/97
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Latte e latticini	Illimitato	-	EC 258/97
	<i>Euglena gracilis</i>	Yogurt e bevande allo yogurt	0,15g/100g	L'etichettatura deve contenere la dicitura "biomassa essiccata di <i>Euglena gracilis</i> "	EC 2017/2470
	<i>Schizochytrium</i> sp. olio ricco di DHA e EPA	Prodotti lattiero-caseari escluse bevande a base di latte	0,6g/100g per il formaggio; 0,2g/100g per i prodotti lattiero-caseari (incluso latte, fromage)	L'etichettatura deve contenere la dicitura "olio della microalga <i>Schizochytrium</i> sp."	EC 2017/2470

		frais e prodotti a base di yogurt)			
FDA (USA)	<i>Ulkenia sp.</i> olio algale ricco di DHA	Bevande a base di latte	0,06g/100ml di DHA	L'etichettatura deve contenere la dicitura "olio della microalga <i>Ulkenia sp.</i> "	EC 2017/2470
	<i>Dunaliella bardawil</i>	Formaggio magro, formaggio spalmabile e ricotta	0,01g/100g		GNR 276
	<i>Arthrospira platensis</i>	Latte e latticini	3 g per porzione, 0,208g/100g per prebiotico e bevande allo yogurt	-	GNR 417
	<i>Euglena gracilis</i>	Latte e latticini	0,222g/100g per yogurt e latte	-	GNR 697
	<i>Chlorella protothecoides</i>	Latte e latticini	1,35g/100g per yogurt e formaggio	-	GNR 519
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Latte	1,5g/100g	-	GNR 396

	<i>Prototheca moriformis</i> grasso strutturante	Latte e latticini	20g/100g per il burro; 2g/100g per i prodotti lattiero-caseari	-	GNR 673
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Latte e latticini	4g giornalieri	-	FSSAI
	<i>Arthrospira platensis</i>	Latte e latticini	3g giornalieri	-	FSSAI
FSSAI (India)	Ficocianina da <i>Arthrospira platensis</i> essiccata in polvere	Latte e latticini	50g giornalieri	-	FSSAI
	Polvere di Astaxantina da <i>Haematococcus pluvalis</i>	Latte e latticini	4mg giornalieri	-	FSSAI
ANZFA (Australia e Nuova Zelanda)	<i>Schizochytrium</i> <i>sp.</i>	Latticini	0,075g/100g	-	A428
	<i>Schizochytrium</i> <i>sp.</i> olio ricco di DHA	Latticini	260mg di DHA al giorno in Australia; 280mg di DHA al giorno in Nuova Zelanda	-	A428

## CONCLUSIONI

Le microalghe sono attualmente considerate fonte di polisaccaridi e polipeptidi biologicamente attivi che possiedono proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antimicrobiche e anticoagulanti. In alcuni casi i pretrattamenti o la combinazione di essi determinano un maggiore rilascio di composti bioattivi. L'aggiunta di microalghe migliora le proprietà chimico-fisiche (es: contenuto proteico e pH) dei prodotti lattiero-caseari e l'incremento nella loro concentrazione è causa della diminuzione della sineresi nello yogurt. Per quanto riguarda il formaggio, arricchendolo con biomassa microalgale caratterizzata da una grande quantità di fenoli e carotenoidi, esso ha riportato una maggiore capacità antiossidante. In alcuni studi presenti in letteratura l'incorporazione ha peggiorato le caratteristiche sensoriali dei prodotti lattiero-caseari analizzati. Attualmente esistono aziende che trattano le microalghe e si sono occupate di studiare la vitalità, la crescita e i metaboliti secondari prodotti dai batteri lattici durante la fermentazione di microalghe verificando che tali processi influenzano il sapore dei prodotti e il loro deterioramento in fase di maturazione e conservazione. In conclusione, la fortificazione di prodotti con le microalghe sta diventando un obiettivo concreto e realmente perseguibile nella realizzazione di cibi più sostenibili e sani.

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio i miei genitori Francesca per essere stata la mia roccia anche se non l'ho mai ringraziata abbastanza e Gianfranco, i quali mi hanno permesso di raggiungere questo importante traguardo della mia vita, sperando che sia un punto d'inizio.

Ringrazio mia nonna Giuliana, che c'è sempre stata nei momenti brutti e nei momenti belli.

Ringrazio mia zia Giovanna per avermi insegnato tante cose nella vita, anche se a volte sono stato testardo.

Ringrazio tutti i membri della comunità capi del Gioia 1 e del Corridonia 1, per avermi trasmesso tanto e fatto diventare quell'uomo della partenza, che ora sono; soprattutto ringrazio il mio staff Marco, Sofia, Sara, Valentino ed Elena per avermi supportato in ogni momento trascorso finora insieme.

Ringrazio mio cugino Francesco per essere stato la mia spalla destra sempre e Edoardo per essere stato un mio grande sostenitore, e ringrazio Matteo, Edoardo, Niccolo, Andrea, Jacopo, Michele, Thomas, Cristian, Yousef, Mattia, Giorgia ed Andrea.

Ringrazio tutti i membri della "Quer" Bobo, Alice Virgulti, Alice Cascini, Francesca, Maicol, Paolo, Chiara, Valeria, Nicole, Ruben, Antonio, Davide Di Remigio, Giuseppe, Alessandro, Davide Di Francesco, Milena, Sofia, Carmen, Rem. In particolare ringrazio Bobo, Maicol e Paolo per essere stati noi quattro un quartetto fenomenale e che siamo andati oltre tutto e tutti; Alice V., Alice C., e Francesca per essermi state vicine ognuna a modo loro e per avermi dato ed insegnato tanto.

Ringrazio la professoressa Cristiana Garofalo per la sua disponibilità e per avermi aiutato egregiamente alla stesura della tesi.

## BIBLIOGRAFIA

Agustini, T.W., Ma'ruf, W.F., Widayat, A., Suzery, M., Hadiyanto, L., Benjakul, S. Application of *Spirulina platensis* on ice cream and soft cheese with respect to their nutritional and sensory perspectives. *J. Teknol.* 2016, 78, pp.245–251.

Alizadeh Khaledabad, M., Ghasempour, Z., Kia, E.M., Bari, M.R., Zarrin, R. Probiotic yoghurt functionalised with microalgae and Zedo gum: Chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics. *Int. J. Dairy Technol.* 2020 73, pp.67–75.

Atallah, A., Morsy, O., & Dalia, G. Characterization of functional low-fat yogurt enriched whit whey protein concentrate, Caseinate and *Spirulina*. *Int. J. Food Prop.* 2020, 23, pp.78-91.

Australia New Zealand Food Authority (ANZFA). Application 428: DHA-rich Marine Micro-Algae (*Schizochytrium* sp.) and DHA-rich oil derived from *Schizochytrium* sp. as Novel Food Ingredients.

Bao, J., Zhang, X., Zheng, J.H., Ren, D.F., Lu, J. Mixed fermentation of *Spirulina platensis* with *Lactiplantibacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* by random-centroid optimization. *Food Chem.* 2018, 264, pp.64-72.

Barkallah, M., Dammak, M., Louati, I., Hentati, F., Hadrich, B., Mechichi, T. Effect of *Spirulina platensis* fortification on physico-chemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. *LWT* 2017, 84, pp.323–330.

Bchir, B., Felfoul, I., Bouaziz, M.A., Gharred, T., Yaich, H., Noumi, E. Investigation of physicochemical, nutritional, textural, and sensory properties of yoghurt fortified with fresh and dried *Spirulina (Arthrospira platensis)*. *Int. Food Res. J.* 2019, 26, pp.65–76.

Beheshtipour, H., Mortazavian, A.M., Haratian, P., Khosravi-Darani, K. Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. *Eur. Food Res. Technol.* 2012, 235, pp.719–728.

Bhowmik, D., Dubey, J., Mehra, S. Probiotic efficiency of *Spirulina platensis* stimulating growth of lactic acid bacteria, *WJDFS* 4. 2009, pp.160-163.

Bosnea, L., Terpou, A., Pappa, E., Kondyli, E., Mataragas, M., Markou, G. Incorporation of *Spirulina platensis* on traditional greek soft cheese with respect to its nutritional and sensory perspectives. *Proceedings 2020*, 70, 99.

De M. Castro, E., Shannon, E., Abu-Ghannam, N. Effect of fermentation on enhancing the nutraceutical properties of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*), *Fermentation* 5 (2019) 28.

European Food Safety Authority (EFSA). Commission Implementing Regulation (EU) 2017/2470 of 20 December 2017 establishing the Union list of novel foods in accordance with Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council on novel foods. *Off. J. Eur. Union* 2017, 60, pp.72-201.

European Food Safety Authority (EFSA). Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Off. J. Eur. Union* 2006, 49, pp.9-25.

European Food Safety Authority (EFSA). Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. *Off. J. Eur. Union* 1997, 43, pp.1-6.

Food Safety and Standards Authority of India (FSSAI). Food Safety and Standards (Health Supplements, Nutraceuticals, Food for Special Medical Purpose, Functional Food, and Novel Food). Regulations. 2016.

Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Raymundo, A. *Isochrysis galbana* and *Diacronema vlkianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. *LWT-Food Sci. Technol.* 2013, 50, pp.312–319.

- Golmakani, M.T., Soleimani-Zad, S., Alavi, N., Nazari, E., Eskandari, M.H. Effect of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) powder on probiotic bacteriologically acidified feta-type cheese. *J. Appl. Phycol.* 2019, 31, pp.1085–1094.
- Hernández, H., Nunes, M.C., Prista, C., & Raymundo, A., 2022, 11, 755. Innovative and healthier dairy products through the addition of microalgae.
- Khemiri, S., Khelifi, N., Nunes, M.C., Ferreira, A.; Gouveia, L.; Smaali, I. Microalgae biomass as an additional ingredient of gluten-free bread: Dough rheology, texture quality and nutritional properties. *Algal Res.* 2020, 50, 101998.
- Laela, N., Mohamad, A., Fulyani, F. The effect of kefir-*spirulina* on glycemic status and antioxidant activity in hyperglycemia rates. *Slovak J. Food Sci.* 2021, 15, pp.101-110.
- Liu, J.G., Hou, C.W., Lee, S.Y., Chuang, Y., Lin, C.C. Antioxidant effects and UVB protective activity of *Arthrospira platensis* products fermented with lactic acid bacteria, *Process Biochem.* 46, 2011, pp.1405-1410.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, H.D., Stahl, D.A. Brock, *Biologia dei microrganismi*, 14<sup>a</sup> edizione 2016.
- Martelli, F., Alinovi, M., Bernini, V., Gatti, M., Bancalari, E. *Arthrospira platensis* as nature fermentation booster for milk and soy fermented beverage. *Foods* 2020, 9, 350.
- Matos, J., Afonso, C., Cardoso, C., Serralheiro, M.L., Bandarra, N.M. Yogurt enriched with *Isochrysis galbana*: An innovative functional food. *Foods* 2021, 10, 1458.
- Mohamed, A.G., Abd El-Salam, B.A.E.Y., Gafour, W.A.E.M. Quality characteristics of processed cheese fortified with *Spirulina* powder. *Pak. J. Biol. Sci.* 2020, 23, pp.533–541.
- Mohamed, A.G., Abo-El-Khair, B.E., Shalaby, S.M. Quality of novel healthy processed cheese analogue enhanced with marine microalgae *Chlorella vulgaris* biomass. *World Appl. Sci. J.* 2013, 23, pp.914–925.

Mohamed, A.; Darwish, I. Physicochemical properties, bioactive compounds and antioxidant activity of Kareish cheese fortified with *Spirulina platensis*. *World J. Dairy Food Sci.* 2017, 12, pp.71–78.

Mohamed, H., Sayed, E., Mohamed, Z., Gaber, A. Applicability of using edible algae (*Spirulina platensis*) to prepare high protein quality Labenah. *J. Biol. Sci.* 2019, 19, pp.143-147

Mohammadi-Gouraji, E., Soleimani-Zad, S., Ghiaci, M. Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage. *LWT* 2019, 102, pp.230–236.

Pérez-Alva, A., MacIntosh, A.J., Baigts-Allende, D.K., García-Torres, R. & Ramírez-Rodríguez, M.M., 2022, 64, 102684. Fermentation of algae to enhance their bioactive activity.

Robertson, R.C., Gracia Mateo, M.R., O’Grady, M.N., Guihéneuf, F., Stengel, D.B., Ross, R.P. An assessment of the techno- functional and sensory properties of yoghurt fortified with a lipid extract from the microalga *Pavlova lutheri*. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2016, 37, pp.237–246.

Sadava, D., Hillis, D.M., Heller, H.C., Hacker, S. La nuova biologia.blu, 2<sup>a</sup> edizione, 2020.

Silva, S.C., Fernandes, I.P., Barros, L., Fernandes, Â., Alves, J.M., Calhelha, R.C. Spray-dried *Spirulina platensis* as an effective ingredient to improve yogurt formulations: Testing different encapsulating solutions. *J. Funct. Foods.* 2019, 60, 103427.

Tohamy, M.M., Ali, M.A., Shaaban, H.A.G., Mohamad, A.G., Hasanain, A.M. Production of functional spreadable processed cheese using *Chlorella vulgaris*. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2018, 17, pp.347–358.

United States Food and Drug Administration (FDA). GRAS Notices. 2022.

Vlasenko, I., Bandura, V., Semko, T., Fialkovska, L., Ivanishceva, O., Palamarchuk, V.  
Innovative approaches to the development of a new sour milk product. *Slovak J. Food Sci.*  
2021, 15, pp.970-981