

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



Scuola Politecnica e delle Scienze di Base

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Dipartimento di Ingegneria Civile, Edile e Ambientale

Tesi di Laurea Sperimentale in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio

Produzione di idrogeno in *Thermotoga* *neapolitana* utilizzando substrati complessi

Relatore

Prof. Francesco Pirozzi

Correlatori

Giuliana D'Ippolito

Antonio Panico

Candidata

Alessandra Galizia

M67/209

Tendenza a livello mondiale ad incrementare l'uso delle fonti di energia rinnovabili

Energia idroelettrica



Energia geotermica



ENERGIA RINNOVABILE

energia generata da fonti che per le loro caratteristiche intrinseche si rigenerano e non sono esauribili nella scala dei tempi "umani"

Energia solare



Energia marina



Energia da biomassa

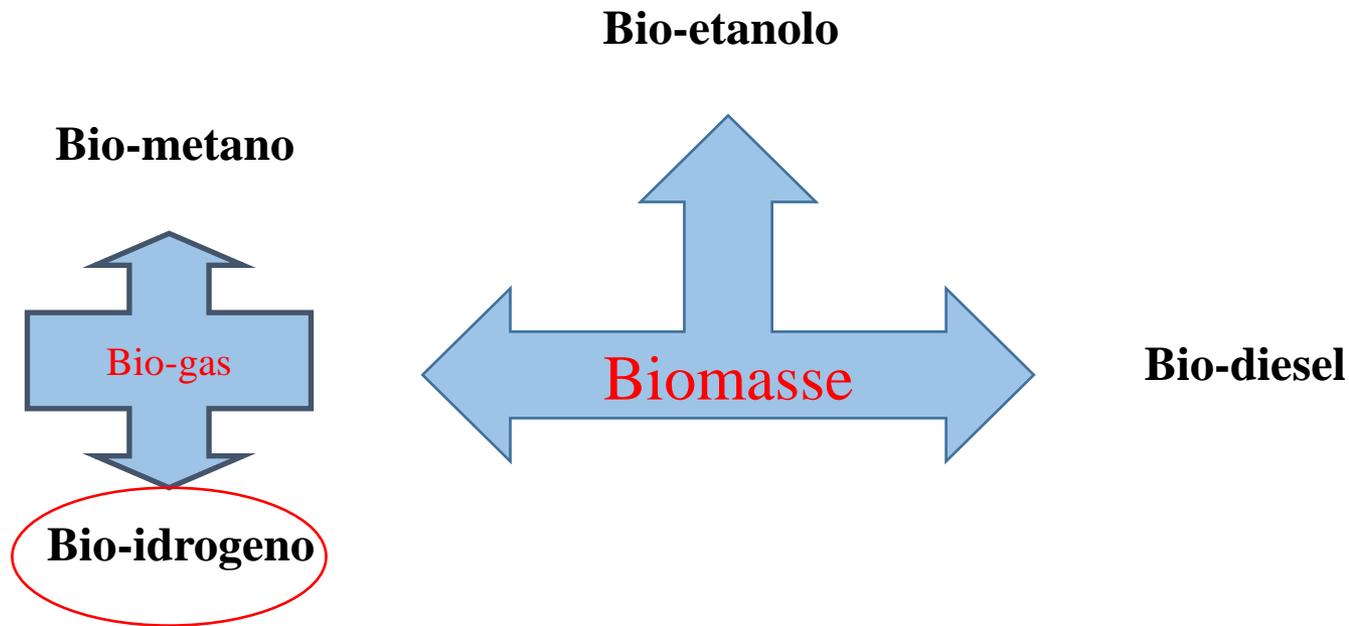


Energia eolica

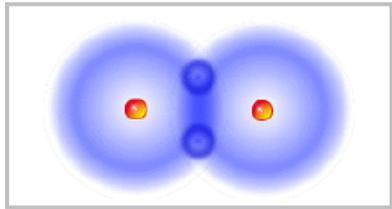


Biocombustibili

Sostanze idonee ad essere utilizzate nei processi di combustione come analoghi del gasolio (che invece deriva dal petrolio), ma derivanti da fonti rinnovabili



IDROGENO MOLECOLARE

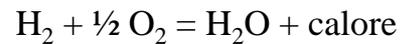


In condizioni normali di temperatura e pressione, due atomi di idrogeno si legano per formare una molecola di gas (H_2)

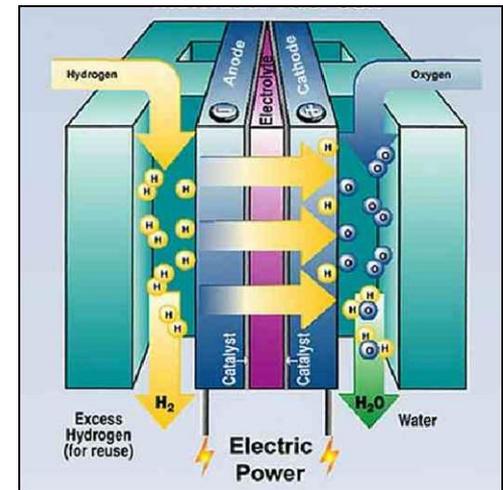
Biocombustibile del futuro

- Elevato contenuto energetico per unità di peso

- Combustione:

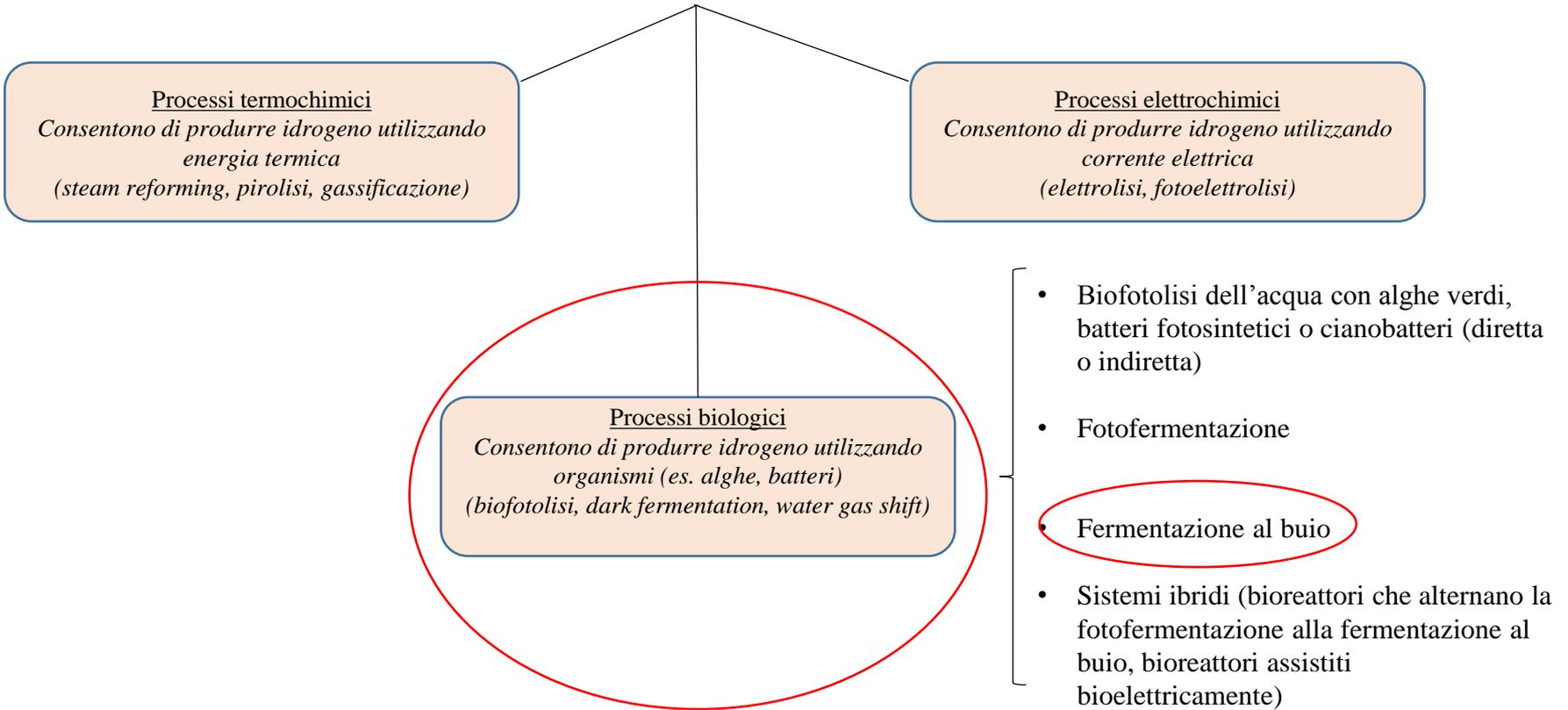


Cella a combustibile, specifica per l'idrogeno



L'idrogeno è un VETTORE ENERGETICO

PRODUZIONE DI IDROGENO



FERMENTAZIONE AL BUIO (batteri fermentativi)



• Mesofili (20-40°C)

• Termofili (50°C-80°C)

• Ipertermofili (>80°C)

Vantaggi

- Alte rese
- Meno sensibili alle contaminazioni esterne
- Facilmente inattivati e riattivati dopo conservazione a 4°C
- Riduzione della viscosità
- Efficienza di miscelazione
- Accelerazione della velocità di reazione

Sostanze che possono essere fermentate

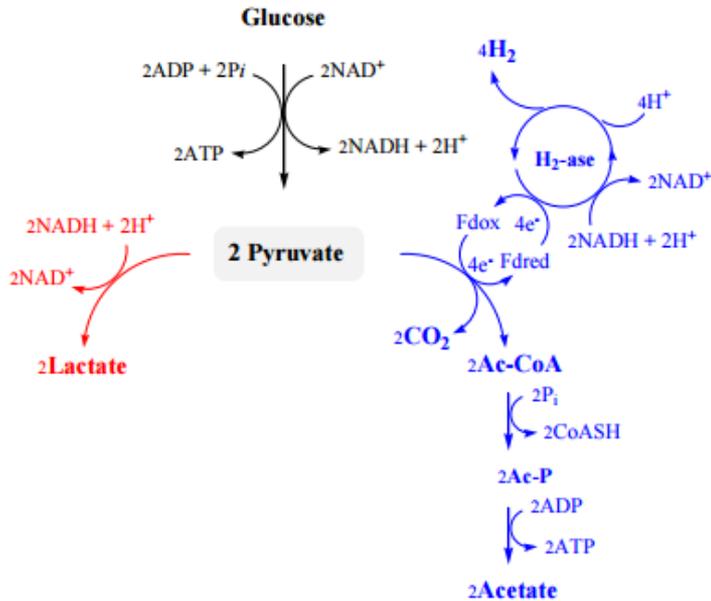
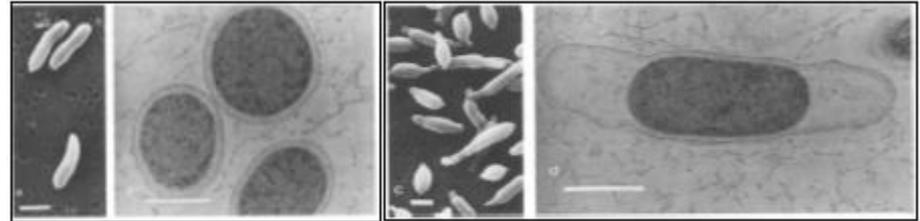
- Monosaccaridi
- Disaccaridi
- Polisaccaridi

Prodotti di scarto
Rifiuti organici

Thermotoga neapolitana come microrganismo modello



CNR
Istituto di Chimica Biomolecolare (ICB)
Via Campi Flegrei 34, 80078, Pozzuoli (Na)



- ✓ isolati da sistemi idrotermali
- ✓ batteri termofili anaerobi
- ✓ forma bastoncellare, Gram-negativi, non sporulanti
- ✓ struttura esterna, chiamata “toga”

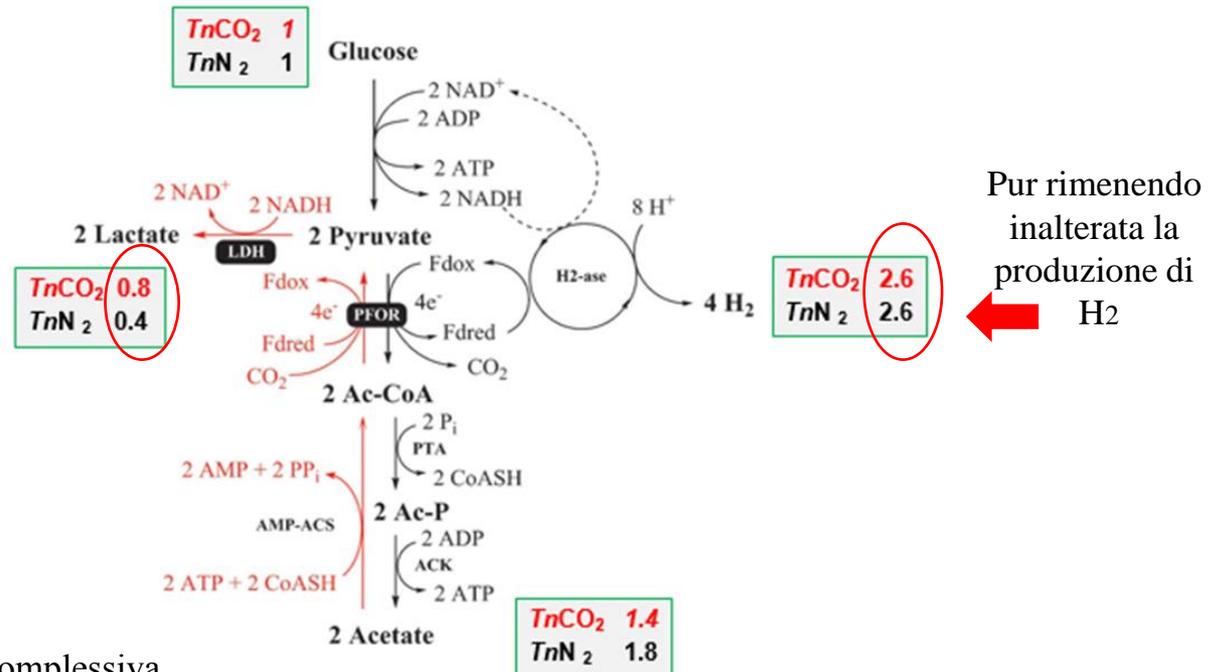
E' stato scelto per:

- la sua robustezza
- l'adattabilità a varie condizioni
- la capacità di utilizzare differenti fonti primarie di carbonio

Capnophilic Lactic Fermentation (CLF)

Sorprendente assimilazione di CO₂

attraverso l'accoppiamento con
l'acetyl-CoA
concomitante formazione di
ACIDO LATTICO →



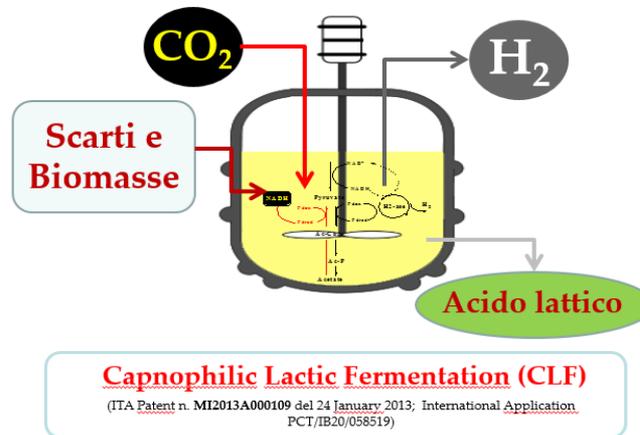
Vi è, inoltre, un'accelerazione complessiva
della fermentazione

Capnophilic Lactic Fermentation (CLF)

(ITA Patent n. MI2013A000109 del 24 January 2013; International Application PCT/IB20/058519)

Scopo della tesi

Studiare il processo CLF in *Thermotoga neapolitana* utilizzando substrati complessi per produrre IDROGENO e prodotti ad alto valore aggiunto, come l'ACIDO LATTICO



Sono stati inizialmente utilizzati:

- AMIDO DI PATATA
- AMIDO DI GRANO
- GLICOGENO

Per poi studiare la sintesi fermentativa con PANE RAFFERMO, tal quale, come substrato di crescita

ESPERIMENTI ESEGUITI

Terreno di coltura complesso per *Thermotoga neapolitana*

Componente	g/L
NaCl	10
KCl	0.1
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0.2
NH ₄ Cl	1
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.1
K ₂ HPO ₄	0.3
KH ₂ PO ₄	0.3
Cisteina	0.5
Yeast extract	2
Glucosio	5
Tryptone	2
Trace element solution	10 mL/L
Vitamin solution	10 mL/L
Resazurina 0.2%	0.5 mL/L
H ₂ O distillata	1 L



- Prove in condizioni statiche



- Crescite in condizioni dinamiche

Autoclave- 121°C per 5 minuti

Inoculo (6% v/v), previo lavaggio con una soluzione di NaCl 10 g/L

Sparging di CO₂

Correzione pH – NaOH 1 M

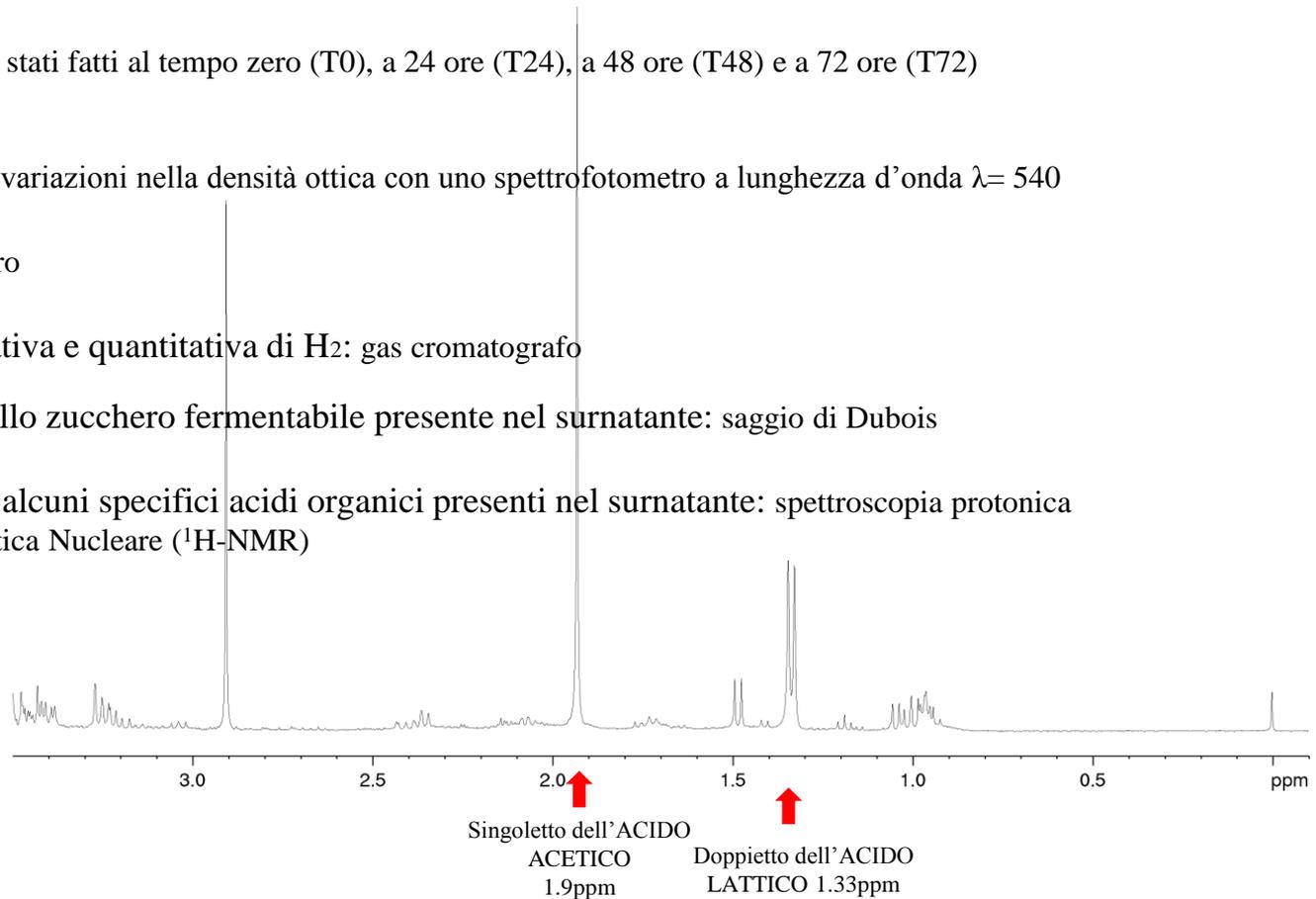


- Prove in fermentatore

Parametri controllati durante la crescita batterica

Tutti i prelievi sono stati fatti al tempo zero (T0), a 24 ore (T24), a 48 ore (T48) e a 72 ore (T72)

- Crescita batterica: variazioni nella densità ottica con uno spettrofotometro a lunghezza d'onda $\lambda = 540$
- Lettura pH: pHmetro
- Produzione qualitativa e quantitativa di H_2 : gas cromatografo
- Concentrazione dello zucchero fermentabile presente nel surnatante: saggio di Dubois
- Concentrazione di alcuni specifici acidi organici presenti nel surnatante: spettroscopia protonica di Risonanza Magnetica Nucleare (1H -NMR)



Prove in condizioni statiche: bottiglie da 120 mL

Sono stati aggiunti, come fonte primaria di carbonio, 4 substrati di crescita

In stufa ad 80°C

Le bottiglie, in triplicato, sono state così preparate:

- 30 mL di terreno complesso + 5 g/L di glucosio
- 30 mL di terreno complesso + 5 g/L di amido di patata
- 30 mL di terreno complesso + 5 g/L di amido di grano
- 30 mL di terreno complesso + 5 g/L di glicogeno

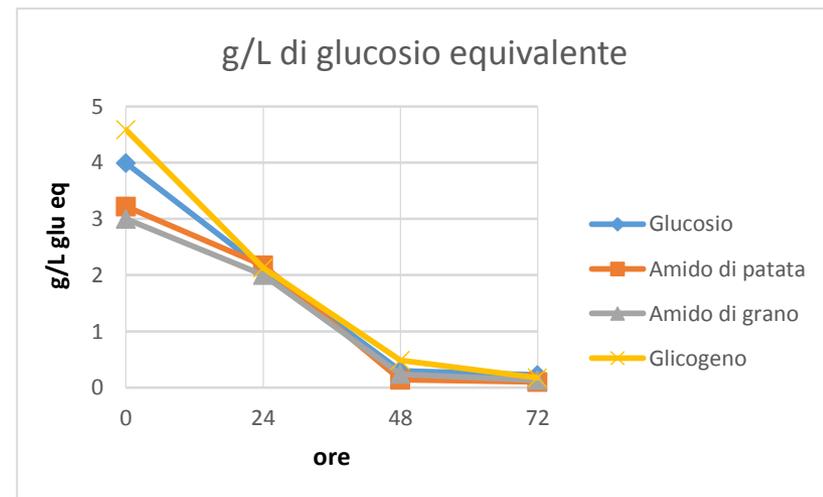
Rapporto
'volume spazio di testa/volume
coltura'=3



RISULTATI OTTENUTI A T48h

I risultati ottenuti dimostrano un buon andamento complessivo della fermentazione

Substrati complessi	Tasso-produzione H ₂ [mL/L/h]	Resa [moli di H ₂ /moli di glucosio eq.]	Acido lattico [moli di AL/moli di glucosio eq.]	Acido acetico [moli di AA/moli di glucosio eq.]
Glucosio	27.06 (± 4.1)	2.8 (± 0.4)	0.67 (± 0.06)	1.49 (± 0.06)
Amido di patata	24.99 (± 0.7)	3.1 (± 0.06)	0.61 (± 0.1)	1.64 (± 0.07)
Amido di grano	19.22 (± 0.4)	2.6 (± 0.08)	0.43 (± 0.1)	1.75 (± 0.2)
Glicogeno	23.39 (± 2.7)	2.2 (± 0.3)	0.21 (± 0.06)	1.02 (± 0.03)



Crescite in condizioni dinamiche: bottiglie da 300 mL

Avevamo a che fare con substrati scarsamente solubili

Aggiunta dell'agitazione

Sistema dry bath: 80°C e 200 rpm

Le bottiglie, in triplicato, sono state così preparate:

- 100 mL di terreno complesso + 5 g/L di glucosio
- 100 mL di terreno complesso + 5 g/L di amido di patata
- 100 mL di terreno complesso + 5 g/L di amido di grano
- 100 mL di terreno complesso + 5 g/L di glicogeno

Rapporto
'volume spazio di testa/volume
coltura'=2



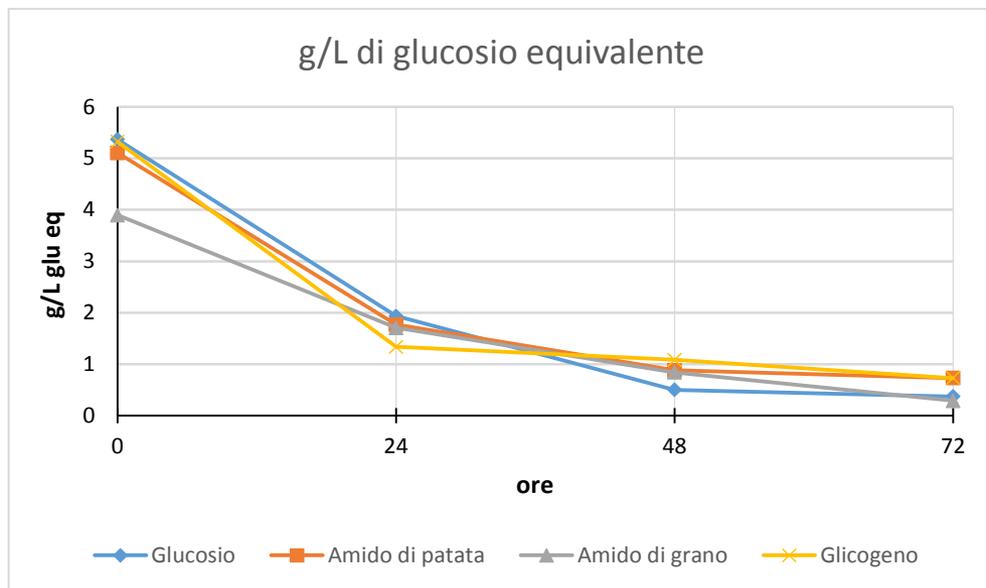
RISULTATI OTTENUTI A T24h

Substrati complessi	Tasso- produzione H ₂ [mL/L/h]	Resa [moli di H ₂ /moli di glucosio eq.]	Acido lattico [moli di AL/moli di glucosio eq.]	Acido acetico [moli di AA/moli di glucosio eq.]
Glucosio	24 (± 7.6)	1.2 (± 0.4)	0.89 (± 0.08)	1.30 (± 0.005)
Amido di patata	12.6 (± 1)	0.7 (± 0.06)	<u>1.52 (± 0.06)</u>	1.37 (± 0.06)
Amido di grano	27.6 (± 2.8)	1.5 (± 0.24)	1.11 (± 0.09)	1.26 (± 0.12)
Glicogeno	11.5 (± 0.2)	0.5 (± 0.003)	<u>1.20 (± 0.06)</u>	0.91 (± 0.06)

RISULTATI OTTENUTI A T48h

Substrati complessi	Tasso- produzione H ₂ [mL/L/h]	Resa [moli di H ₂ /moli di glucosio eq.]	Acido lattico [moli di AL/moli di glucosio eq.]	Acido acetico [moli di AA/moli di glucosio eq.]
Glucosio	21.2 (± 3.4)	1.5 (± 0.26)	0.90 (± 0.02)	1.30 (± 0.04)
Amido di patata	11 (± 3.19)	0.9 (± 0.26)	<u>1.55 (± 0.01)</u>	1.39 (± 0.29)
Amido di grano	16.1 (± 2.5)	1.2 (± 0.27)	1.20 (± 0.03)	1.26 (± 0.1)
Glicogeno	5.8 (± 0.09)	0.5 (± 0.004)	<u>1.30 (± 0.05)</u>	0.95 (± 0.1)

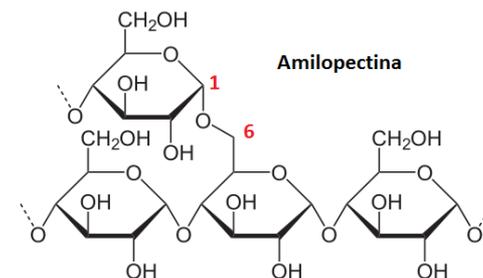
Consumo dei substrati nel tempo



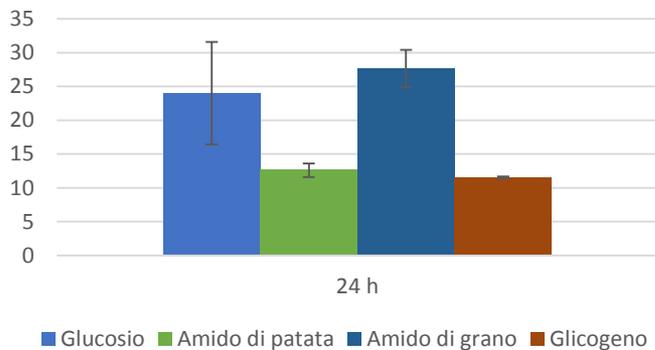
Maggiore produzione di acido lattico con

- Amido di patata
- Glicogeno

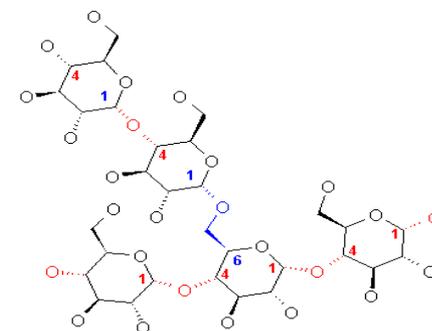
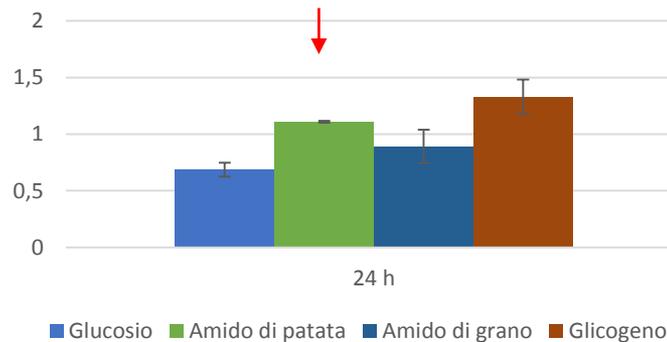
Amido	AMILOSIO (%)	AMILOPECTINA (%)
Frumento	28	72
Patata	21	79



tasso di produzione di H₂- mL/L/h

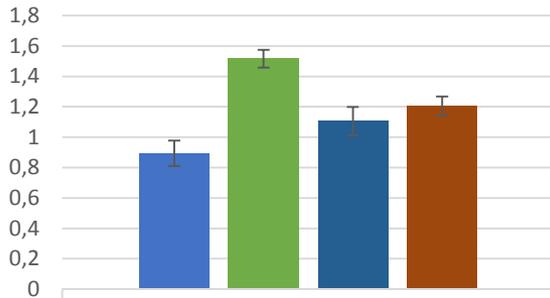


LA/AA (mM)



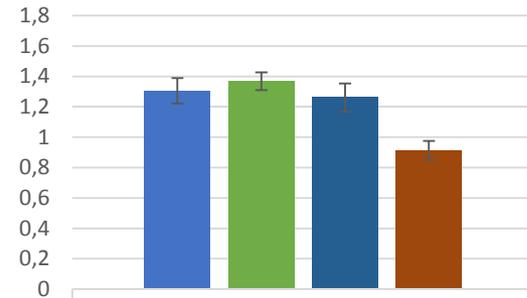
Produzione di acido lattico e acetico espressa in termini di resa

resa- mol AL / mol glu eq.



	24 h
■ Glucosio	0,894479732
■ Amido di patata	1,516053036
■ Amido di grano	1,105345409
■ Glicogeno	1,204691285

resa- mol AA / mol glu eq.



	24 h
■ Glucosio	1,304904072
■ Amido di patata	1,368396445
■ Amido di grano	1,261104315
■ Glicogeno	0,913459799



Pane raffermo tal quale come substrato di crescita

Idrolisi acida con H_2SO_4  0.5 grammi di glucosio equivalente/grammo di pane

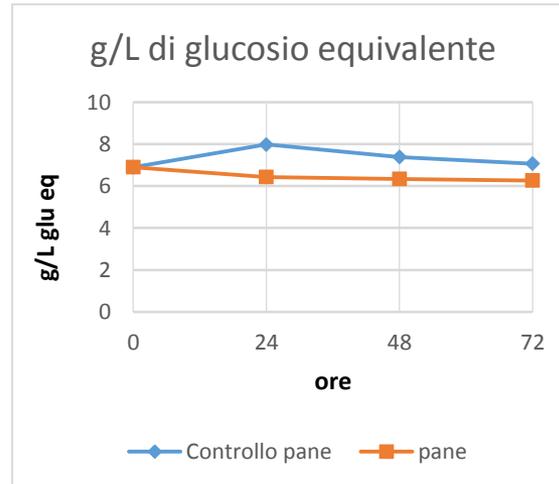
Inizialmente la fermentazione è stata condotta in bottiglie da 300 mL
sistema dry bath: 80°C e 200 rpm

- 100 mL di terreno complesso + 10 g/L di pane (triplicato)
- 100 mL di terreno complesso + 5 g/L di glucosio (controllo-triplicato)

RISULTATI PRELIMINARI ottenuti nei reattori da 300 mL

Risultati a T24

Substrati di crescita	Produzione- H_2 [mL/L]	Tasso [mL/L/h]	Acido lattico [mM]	Acido acetico [mM]
Glucosio	57.6 (\pm 18.2)	24 (\pm 7.6)	17.1 (\pm 2)	24.9 (\pm 0.6)
Pane	57.4 (\pm 28.9)	23.9 (\pm 12)	7.6 (\pm 6.9)	22.7 (\pm 6.5)



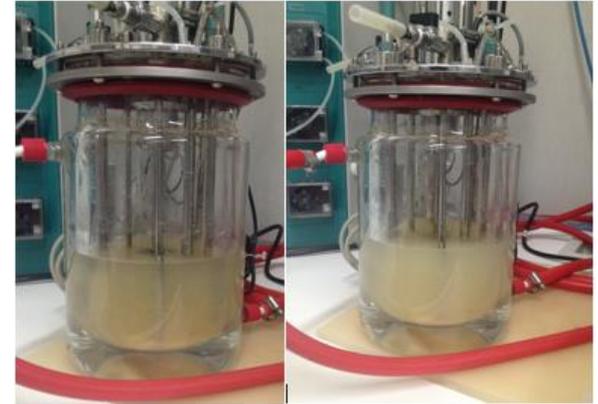
Substrati di crescita	Resa [moli di H_2 /moli di glucosio eq.]
Glucosio	1.2
Pane	2.7

Prove in fermentatore

E' stato poi eseguito lo «scale-up» della fermentazione

Bioreattore in vetro di circa 3 L: 80°C e 60 rpm
1 L di terreno complesso + 10 g/L di pane

Rapporto
'volume spazio di testa/volume
coltura'=2



T0

T24h

Confrontato con un esperimento di controllo in cui è stato utilizzato il glucosio come substrato di crescita

RISULTATI ottenuti in fermentatore

Risultati a T24

Substrati	H ₂ [mL/L]	Tasso [mL/L/h]	Acido lattico [mM]	Acido acetico [mM]
Glucosio	1943.1	80.9	22	30.4
Pane	2137.2	89	5	32.2

Si è avuta una produzione di idrogeno non semplicemente paragonabile, bensì maggiore

Da 10g/L di pane si sono ottenuti circa 2 litri di idrogeno, per litro di soluzione

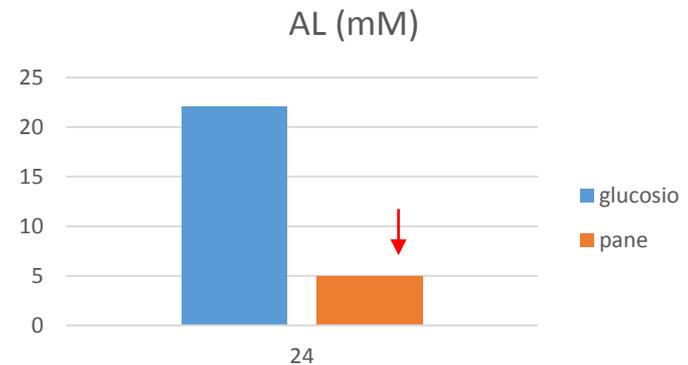
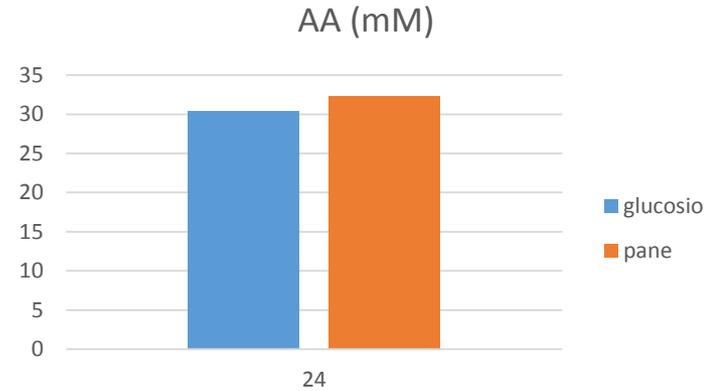
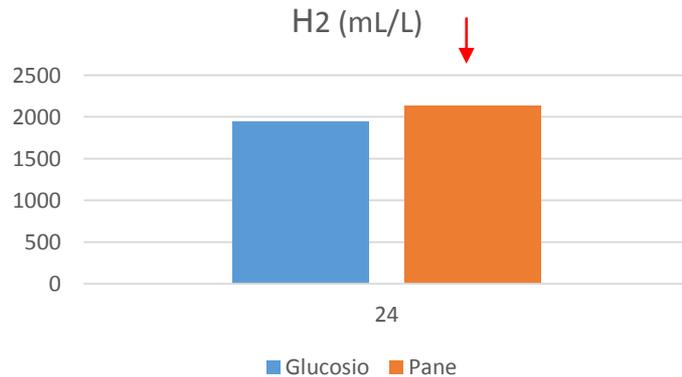
GRAFICI DEI RISULTATI ottenuti in fermentatore

CONFRONTO TRA LE FERMENTAZIONI CONDOTTE CON I DUE SUBSTRATI:

Maggiore produzione di idrogeno con il pane

Valori di acido acetico prodotto, paragonabili

Vengono confermati valori di acido lattico prodotti decisamente bassi, con il pane



Obiettivi raggiunti

Dimostrare la grande potenzialità del batterio *Thermotoga neapolitana* nel degradare substrati complessi, senza nessun PRETRATTAMENTO producendo IDROGENO, ACIDO LATTICO e con il concomitante ASSORBIMENTO DI CO₂

Si è, inoltre, dimostrata la risposta del sistema ad uno scarto alimentare contenente amido di grano

Da 10 g/L di pane, si sono ottenuti ben 2 litri di H₂ per litro di soluzione

13 mila quintali di pane buttati al giorno  **260'000 m³** di H₂ al giorno



Necessità di proseguire lo studio di tale sistema

Obiettivi da raggiungere

- miglioramento delle rese di produzione di H₂
- ottimizzazione del processo dal punto di vista reattoristico: maggiore accessibilità dei substrati ai microrganismi

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



CNR

Istituto di Chimica Biomolecolare (ICB)
Via Campi Flegrei 34, 80078, Pozzuoli (Napoli)



Un doveroso ringraziamento a tutti coloro che hanno permesso e contribuito alla realizzazione di questo lavoro di tesi

**GRAZIE PER LA CORTESE
ATTENZIONE**