

POLITECNICO DI MILANO
Dipartimento di Ingegneria Idraulica, Ambientale,
Infrastrutture viarie, e Rilevamento



**PRODUZIONE IN CONTINUO DI
BIOH₂ DA FERMENTAZIONE AL BUIO
DI SIERO DI LATTE**

Relatore: Prof.ssa Francesca Malpei

Correlatore: dott.ssa Micol Bellucci

Tesi di laurea di:

Paolo Giovanni Zappulla 842410

Anno accademico 2017/2018

Ringraziamenti

Per prima cosa voglio fare i più grandi ringraziamenti a mamma e papà che hanno sostenuto con divina pazienza sulle loro spalle tutto il mio percorso qui al Politecnico e senza i quali questo traguardo non sarebbe stato possibile.

I ringraziamenti successivi vanno a tutti coloro che da anni, senza manco accorgersene, hanno un ruolo fondamentale nella mia quotidianità.

Dario e Fabio, che non finiranno mai di rendermi arbitro delle loro simpatiche battaglie e gli zii che mi hanno cresciuto come un terzo figlio.

Tutti gli amici che ci sono ancora, nonostante le difficoltà delle relazioni a distanza di noi fuorisede: la storica Coop, presente dalla notte dei tempi; mia sorella che dispensa perle di saggezza quotidiane e mi ha insegnato ad apprezzare il cibo gluten free ed Eugenetto per i suoi meravigliosi video in macchina; i miei Villesi preferiti (coach, architetti, baristi..tutti), il pretore e il ministro degli esteri, Mari che mi sopporta ogni giorno, gli amici del puppettu e tutti i portogalli “milanesi” e lontani ma vicini col cuore.

I miei “ciess”, per aver reso l’università una scusa per divertirsi a più non posso e avermi regalato un gruppo di amici meraviglioso.

Doverosi e sentiti ringraziamenti alla prof. Malpei, per avermi concesso questa importante possibilità di formazione, e a Micol per le consultazioni e per tutte le volte che è dovuta andare fino a Brescia per permettermi di portare avanti il mio lavoro.

Non posso infine dimenticarmi dei miei nuovi amici: Glauco e Ruggero, senza i quali probabilmente starei ancora cercando di far ripartire un capriccioso reattore, Laura ed Enrico, che hanno saputo darmi preziosi consigli sul posto di lavoro e insegnarmi che al mondo esistono anche interisti intelligenti e simpatici.

Un ultimo pensiero per zio Lauro, il primo ingegnere a cui posso mai ispirarmi, e per i nonni, Rosetta e quelli che non ci sono più e in particolare per nonno Paolo, perché sarà contento di vedere che oggi non sono vestito di nero, colore che “fa male alla pelle”.

Chiunque non si ritrovi tra queste righe sappia che è solo a causa delle restrizioni formali riscontrate nel redarre questo elaborato, ma nessuno è o verrà dimenticato dal sottoscritto.

Sintesi

Lo scopo di questo lavoro è studiare il processo biologico di dark fermentation per la produzione di bioidrogeno, sfruttando siero di latte proveniente da caseifici non specificati e ottimizzando il processo generale e il suo rendimento.

Il processo biologico è stato svolto all'interno di un reattore completamente miscelato, del volume di circa 10 litri di cui 3 litri occupati dall'inoculo di partenza, alle seguenti condizioni operative: valore di temperatura pari a 36°C, pH pari a 5.5, HRT pari a 9 ore.

I valori di produzione massimi registrati sono pari a:

- Produzione oraria di biogas pari a 1,4 NLbiogas/h
- Produzione oraria di idrogeno pari a 0,75 NLh₂/h
- Resa molare pari a 4molH₂/mol lattosio
- Chiusura dei bilanci di massa sul COD con errore medio inferiore al 10%
- Resa di crescita pari a 0,9 gCOD/gCODrimosso

Lo studio è stato prevalentemente svolto come monitoraggio delle prestazioni del reattore e della quantità di idrogeno contenuta nel biogas prodotto.

L'attività è stata suddivisa in due periodi: una prima fase, in cui l'inoculo di partenza contenuto nel reattore era costituito da siero di latte ed acqua di rete, ed una seconda fase seguente ad un guasto interno al reattore, che ha comportato lo spegnimento del reattore, l'interruzione delle analisi ed un riavvio con un diverso inoculo costituito dalla biomassa organica già formata e antecedente al guasto, alimentata successivamente alla riparazione del reattore.

La seconda fase ha comportato un netto miglioramento delle rese di processo e dei risultati ottenuti.

Indice della tesi

PRODUZIONE IN CONTINUO DI BIOH₂ DA FERMENTAZIONE AL BUIO DI SIERO DI LATTE	I
RINGRAZIAMENTI	I
SINTESI.....	III
INDICE DELLA TESI.....	V
INDICE DELLE FIGURE.....	VII
INDICE DELLE TABELLE.....	IX
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	1
1.1 OBIETTIVI	2
CAPITOLO 2 STATO DELL'ARTE.....	3
2.1 SIERO DI LATTE	3
2.2 DIGESTIONE ANAEROBICA.....	5
2.3 FERMENTAZIONE AL BUIO	7
2.4 VIE DI CONSUMO DELL'IDROGENO	11
2.4.1 <i>Metanogenesi</i>	12
2.4.2 <i>Omoacetogenesi</i>	13
2.4.3 <i>Produzione di lattato</i>	14
2.4.4 <i>Acetogenesi e Solventogenesi</i>	15
2.5 PARAMETRI DI PROCESSO	17
2.5.1 <i>pH</i>	17
2.5.2 <i>Temperatura</i>	18
2.5.3 <i>HRT</i>	18
2.5.4 <i>Substrato</i>	19
2.5.5 <i>Nutrienti</i>	20

2.5.6 Pressione parziale H ₂	20
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI.....	23
3.1 ATTIVITÀ SPERIMENTALE	23
3.2 IMPIANTO PILOTA.....	24
3.3 MATRICI LIQUIDE.....	27
3.3.1 Siero di latte.....	27
3.3.2 Alimento.....	28
3.4 METODI E DETERMINAZIONI ANALITICHE	29
3.4.1 COD.....	30
3.4.2 Azoto totale ed ammoniacale.....	31
3.4.3 Solidi sospesi totali e solidi sospesi volatili.....	31
3.4.4 Biogas.....	31
3.5 INDICI DI PRODUZIONE	32
3.6 TASSO DI CRESCITA CELLULARE.....	33
3.7 BILANCI DI MASSA	34
CAPITOLO 4 RISULTATI E DISCUSSIONI	37
4.1 RENDIMENTO DEL PROCESSO	38
4.2 DISCUSSIONI	57
CAPITOLO 5 CONCLUSIONI.....	60
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	65

Indice delle figure

Figura 2-1 – Composizione del siero di latte (Prazeres et al, 2012)	4
Figura 2-2 - Schema del processo di digestione anaerobica	6
Figura 2-3 – Fermentazione al buio (Ghimire et al,2015)	8
Figura 2-4 – Dark fermentation del glucosio (Tapia-Venegas et al,2015)	9
Figura 2-5 – Effetto dell’aggiunta di acido lattico sulla produzione cumulativa di idrogeno (Baghchehsaraee, 2008)	15
Figura 2-6 – Performance di fermentazione in batch per la produzione di bioidrogeno (Valdez – Vazquez et al)	17
Figura 3-1 – Componenti principali dell’impianto pilota	25
Figura 3-2 – Schema funzionale dell’impianto pilota	26
Figura 3-3 – Trattazione del siero grezzo prima di essere utilizzato come permeato concentrato	28
Figura 4-1 – Andamento nel tempo della produzione oraria di biogas e di idrogeno per le due diverse fasi	39
Figura 4-2 – Andamento nel tempo della percentuale di idrogeno contenuta nel biogas per le due diverse fasi	40
Figura 4-3 – Andamento nel tempo del rendimento molare di idrogeno per le due diverse fasi	41
Figura 4-4 – Consumo molare giornaliero di soda per le due fasi	42
Figura 4-5 – Consumo molare di soda per litri in alimento per le due fasi	42
Figura 4-6 – Confronto tra le moli di soda giornalmente consumate ed il rendimento di rimozione di COD nel tempo	43
Figura 4-7 – Andamento nel tempo del rendimento di rimozione del COD per le due diverse fasi	44
Figura 4-8 – Andamento nel tempo della concentrazione di solidi sospesi volatili per le due diverse fasi	45
Figura 4-9 – Andamento nel tempo della resa di crescita cellulare per le due fasi	46
Figura 4-10 – Flocchi di biomassa organica osservati al microscopio	48
Figura 4-11 - Produzione media oraria di biogas per le due fasi	49
Figura 4-12 - Percentuale media di idrogeno contenuta nel biogas per le due fasi	50

Figura 4-13 –Rendimento molare medio per le due fasi	50
Figura 4-14 – Rendimento medio di rimozione COD per le due fasi	51
Figura 4-15 – Resa media di crescita per le due fasi	51
Figura 4-16 – Concentrazione media di SSV per le due fasi	52
Figura 4-17 – Carico medio giornaliero di COD inerente ai bilanci di massa per la fase 1 e la fase 2	53
Figura 4-18 – Bilanci di massa nel tempo per la fase 1	54
Figura 4-19 – Bilanci di massa nel tempo per la fase 2	55
Figura 4-20 – Distribuzione temporale delle concentrazioni di VFA ed etanolo come COD equivalenti ed andamento nel tempo del COD solubile in uscita	56
Figura 4-21 – Andamento del rapporto tra acido butirrico e acetico e resa molare di produzione idrogeno nel tempo per le due fasi	57

Indice delle tabelle

Tabella 2-1 – Reazioni di dark fermentation del glucosio (Bundhoo, Molee, 2015)	8
Tabella 2-2 – Reazioni biochimiche di fermentazione del glucosio (Yuan,2017)	11
Tabella 3-1 – Parametri operativi dell’impianto pilota	25
Tabella 3-2 – Caratteristiche del siero permeato concentrato	28
Tabella 3-3 – Concentrazioni delle soluzioni di nutrienti in aggiunta dall’esterno	29
Tabella 3-4 – Misurazioni effettuate sui diversi campioni e relativa frequenza	30
Tabella 3-5 - Fattori di equivalenza per il COD	35
Tabella 4-1 – Valori medi dei parametri di processo per le due diverse fasi	48
Tabella 4-2 – Confronto con lo studio di Yuan (2017)	58

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

Questa tesi si incentra sulla valorizzazione di scarti industriali per la produzione di bioenergia.

La produzione di BioH₂ tramite dark fermentation di siero di latte precedentemente deproteneizzato con ultrafiltrazione (in maniera tale che sia composto prevalentemente da lattosio) è stata monitorata in reattore anaerobico CSTR completamente miscelato, situato nel laboratorio del dipartimento di Ingegneria Civile ed Ambientale (LIA).

Il processo, nella sua fattispecie, è già stato studiato da lavori precedenti (Gratarola (2016), Yuan (2017), Sacchi (2015), Gugliandolo (2018)) nell'ambito del progetto di ricerca ECO-SI (Energia e Componenti di pregio da Siero di latte) volto allo sviluppo di un impianto pilota che consenta lo sfruttamento e dunque la valorizzazione del siero di latte, sottoprodotto delle industrie casearie e prodotto dalla cooperativa PLAC (Produttori Latte Associati Cremona).

La valorizzazione del siero di latte risulta molto importante in quanto viene generato dalle industrie casearie in grandi quantità ed è dotato di un carico di sostanza organica tale da causare seri problemi all'ambiente se non correttamente smaltito.

Per quanto riguarda la produzione di biogas e, particolarmente, bioH₂, essa si colloca nella ricerca e nello sviluppo di metodi per produrre energia rinnovabile: l'idrogeno, infatti, è una delle principali alternative ai combustibili fossili a causa del suo elevato contenuto energetico.

L'utilizzo di energia pulita e sostenibile offre l'enorme vantaggio di limitare l'utilizzo e sfruttamento delle fonti fossili e, in parallelo, il loro ingente rilascio di anidride carbonica (CO₂) in atmosfera, con conseguente abbattimento dei problemi a essa conseguenti, quali i fenomeni di cambiamenti climatici.

1.1 Obiettivi

Lo scopo specifico di questo lavoro riguarda il monitoraggio di un processo biologico per il trattamento di siero caseario tramite fermentazione al buio.

Lo studio si è incentrato sull'ottimizzazione dei parametri operativi volti a massimizzare la resa di produzione di idrogeno, in maniera tale da comprendere al meglio il ruolo e l'influenza che i fattori possano avere sul processo complessivo.

Un altro obiettivo è il confronto dei dati ottenuti con quanto ottenuto in precedenza dagli studi di Yuan (2017).

Lo studio è stato poi suddiviso in due fasi che hanno lo stesso obiettivo precedentemente descritto, ma valutano e discutono la differenza degli andamenti nel tempo dei parametri di processo generata da un diverso inoculo di partenza.

La struttura della tesi è la seguente: il capitolo 2 descrive il processo biologico di dark fermentation utilizzato nel nostro studio, nonché i principali parametri operativi e di processo; il capitolo 3 descrive come il lavoro manuale sia stato svolto all'interno del laboratorio, ossia quali materiali e quali metodi hanno contraddistinto l'attività sperimentale; il capitolo 4, invece, riguarderà la discussione dei risultati ottenuti nelle due diverse fasi di studio mentre il capitolo 5, ossia il capitolo finale, tratterà le considerazioni conclusive.

CAPITOLO 2

STATO DELL'ARTE

In questo capitolo, oltre ad una breve descrizione del siero di latte, sono riportati i principi fondamentali della dark fermentation e i principali parametri operativi per il processo. Vengono infine elencati e descritti i più importanti fenomeni di inibizione del processo, che causano un consumo parassita di idrogeno diminuendo le rese di processo effettive rispetto a quelle teoriche.

2.1 Siero di latte

Il siero di latte è un sottoprodotto liquido dell'industria casearia che si genera dalla separazione del latte dalla cagliata, tipicamente torbido e di color giallo-verdastro, di composizione variabile a causa dei numerosi fattori che la influenzano (qualità e composizione del latte, processi di produzione del formaggio).

La precipitazione della caseina porta alla formazione di due tipi di sieri: siero acido ($\text{pH} < 5$), derivante da fermentazione o aggiunta di minerali acidi/sostanze organiche e siero dolce (pH compreso tra 6 e 7), ottenuto da enzimi proteolitici come la chimosina (Panesar et al, 2007).

La differenza tra i due sieri sta nella composizione delle proteine, nell'acidità e nel contenuto di minerali.

La tipologia di siero che viene utilizzata nello studio è di tipo dolce, fisicamente trattata con un processo di ultrafiltrazione che rimuove le proteine in esso contenute e fa sì che sia composto prevalentemente da lattosio.

Il siero, infatti, è in origine costituito prevalentemente da acqua (93-94%) e per il resto da sostanze contenute nel latte utilizzato quali lattosio, proteine, acido lattico e grassi.

Nella figura seguente è rappresentata la composizione (in percentuale) delle principali sostanze contenute nel siero di latte.

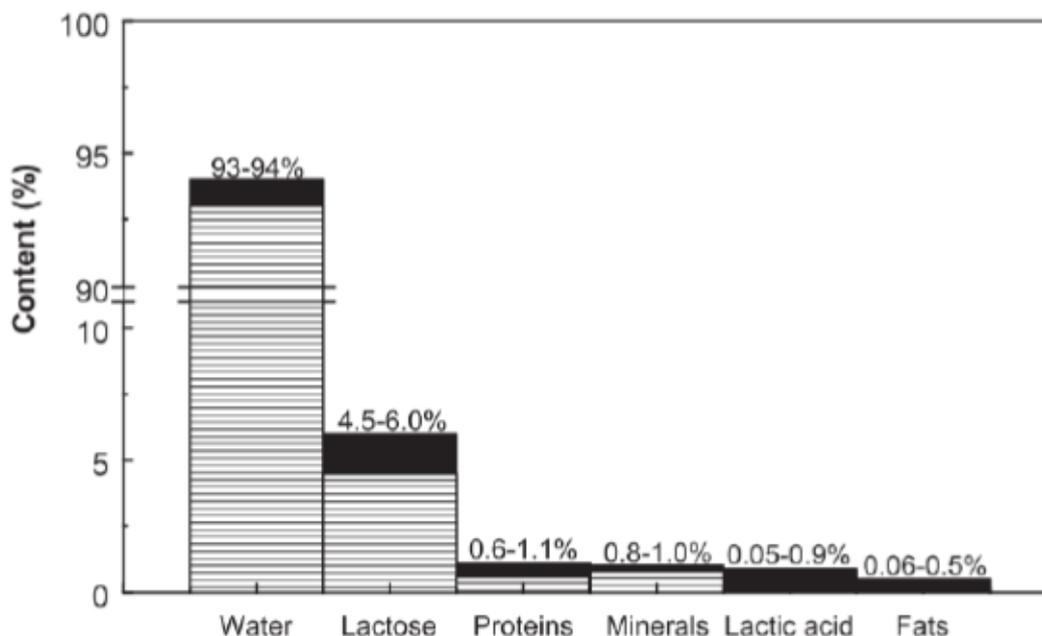


Figura 2-1 – Composizione del siero di latte (Prazeres et al, 2012)

Tra le sue caratteristiche più rilevanti si annota l'elevato carico di sostanza organica, di cui si necessita di tener conto da un punto di vista ambientale.

Quest'ultimo parametro è espresso in termini di BOD (Biological Oxygen Demand) e COD (Chemical Oxygen Demand) e di valori compresi, rispettivamente, tra (27-60) kg/m³ e (50-102) kg/m³.

Il loro rapporto, indice di biodegradabilità, è pari a 0,5 e indica una buona biodegradabilità costituita per lo più (90%) da lattosio (Prazeres et al., 2012).

L'elevato carico di sostanza organica conferisce al siero di latte un potere inquinante che non consente lo smaltimento diretto in ambiente se non previo trattamento con reflui municipali. Dall'altro lato, l'elevata biodegradabilità della sostanza organica in esso presente consente di utilizzare trattamenti biologici per la sua depurazione, ma anche di sfruttarlo in processi biologici volti alla produzione di biogas.

Il trattamento del siero di latte riguarda processi che prevedono una valorizzazione sia dal punto di vista della produzione di biogas che del recupero di componenti proteiche importanti: nel primo caso parliamo, in particolare, della digestione anaerobica, della fermentazione e della produzione di energia elettrica tramite celle a combustibile microbiche. Per quanto concerne invece il recupero di componenti proteiche si sfruttano prevalentemente processi di filtrazione su membrana: microfiltrazione, nanofiltrazione, ultrafiltrazione.

In funzione del diverso tipo di trattamento si avrà un diverso effluente a causa della diversa efficienza di trattenimento delle proteine, funzione a sua volta del diametro di cut off delle membrane.

Questi processi, inoltre, danno l'enorme vantaggio di ridurre il volume di effluente da trattare e la concentrazione di lattosio al suo interno (processo di osmosi inversa per quest'ultimo caso).

2.2 Digestione anaerobica

La digestione anaerobica è un processo di degradazione della sostanza (o substrato) organica mediato da microrganismi (detti anaerobici) capaci di convertire il substrato organico in assenza di ossigeno a bioenergia.

Il prodotto finale è costituito da biogas, anidride carbonica (CO₂) e metano (CH₄), lo stato finale più ossidato e ridotto della sostanza organica.

Nel processo la sostanza organica stessa funge da accettore finale di elettroni.

Il processo si svolge tramite una serie di reazioni biologiche in serie determinate da una specifica cinetica batterica, dunque saranno funzioni di specifiche condizioni di processo ottimali per ogni ceppo batterico agente.

Il processo globale, infatti, è dato dall'attività complessiva dei singoli gruppi batterici, i quali non sono in grado di portare avanti il processo per via autonoma.

Le attività batteriche inerenti ad un singolo processo, inoltre, sono in grado di influenzare i processi successivi; è da qui che si evince l'importanza di garantire le condizioni operative ottimali ad ogni gruppo di microrganismi agente.

La digestione anaerobica si sviluppa prevalentemente in quattro fasi (figura 2.2) per ognuna delle quali opera il ceppo batterico prevalentemente coinvolto: esse sono (in ordine) la fase di idrolisi (batteri idrolitici), la fase di acidogenesi (batteri acidogeni o fermentativi), la fase di acetogenesi (batteri acetogeni) e la fase finale di metanogenesi (batteri metanigeni).

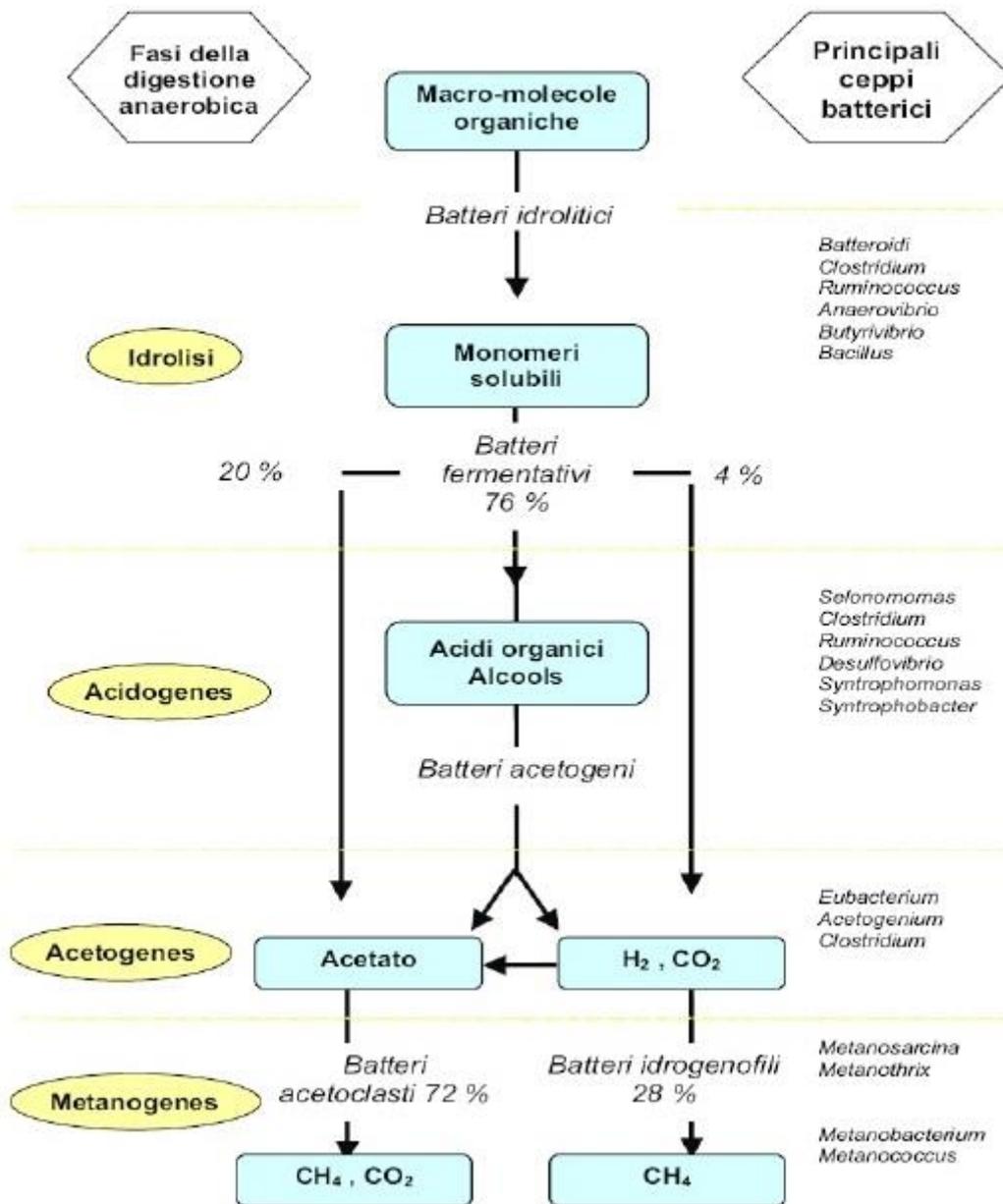


Figura 2-2 - Schema del processo di digestione anaerobica

Durante la prima fase di idrolisi i composti originari complessi (polimeri, molecole complesse) vengono degradati, rispettivamente, in monosaccaridi (partendo dai polimeri) o composti più semplici quali amminoacidi e acidi grassi a lunga catena (partendo ad esempio da proteine o grassi), in grado di essere sfruttati dai batteri nelle fasi successive poiché idonei ad attraversare la membrana cellulare.

Durante la fase di acidogenesi i prodotti idrolizzati nella fase precedente vengono utilizzati come substrato e convertiti in intermedi acidi detti acidi grassi volatili (VFA) quali propionico e butirrico, nonché in alcoli a basso peso molecolare quale l'etanolo, con conseguente abbassamento del pH. In questa parte di processo vi è anche produzione di idrogeno (H_2) e anidride carbonica (CO_2).

Nella fase di acetogenesi tutti gli acidi formati vengono convertiti in acido acetico con contestuale produzione di idrogeno e anidride carbonica.

L'ultima fase, la metanogenesi, prevede infine la formazione di metano (CH_4) e anidride carbonica (CO_2). La formazione del metano può avvenire attraverso due possibili vie: la metanogenesi acetoclastica (per il 70%), in cui l'acido acetico è convertito a metano e anidride carbonica tramite reazione red-ox particolare in cui allo stesso tempo viene ridotto e ossidato; la metanogenesi idrogenotrofa, in cui l'idrogeno prodotto nella fase di acetogenesi viene convertito in metano tramite una classica reazione red-ox in cui l'idrogeno molecolare viene ossidato (donatore di elettroni) e l'anidride carbonica ridotta (accettore di elettroni).

2.3 Fermentazione al buio

Per fermentazione al buio (o dark fermentation) si intende un processo di degradazione biologica di substrato organico (tipicamente matrici ricche di carboidrati) in condizioni ambientali di assenza di luce e ossigeno, al fine di produrre idrogeno.

Il processo consiste in una serie di reazioni redox in cui il trasferimento degli elettroni è garantito dall'enzima idrogenasi: quest'ultimo permette lo scambio di elettroni tra la ferredossina ridotta (Fd^+) o il dinucleotide nicotil ammidico (NADH), con conseguente rispettiva generazione delle loro forme ossidate $Fdox$ e NAD^+ , e i protoni, i quali verranno ridotti ad idrogeno molecolare dai batteri.

I protoni H^+ generati fungeranno da accettori degli elettroni generati dall'ossidazione del substrato organico e saranno dunque garanti della neutralità (Ghimire et al, 2015).

La degradazione e la conversione finale di prodotti complessi in bioidrogeno è la conseguenza di una serie di reazioni biochimiche molto simili a quelle presenti nella digestione anaerobica, con la fondamentale differenza inerente alla mancanza della fase di metanogenesi.

Nella figura 2.3 si espone un generico schema delle differenti fasi e dei possibili percorsi biochimici della fermentazione al buio di un generico substrato organico.

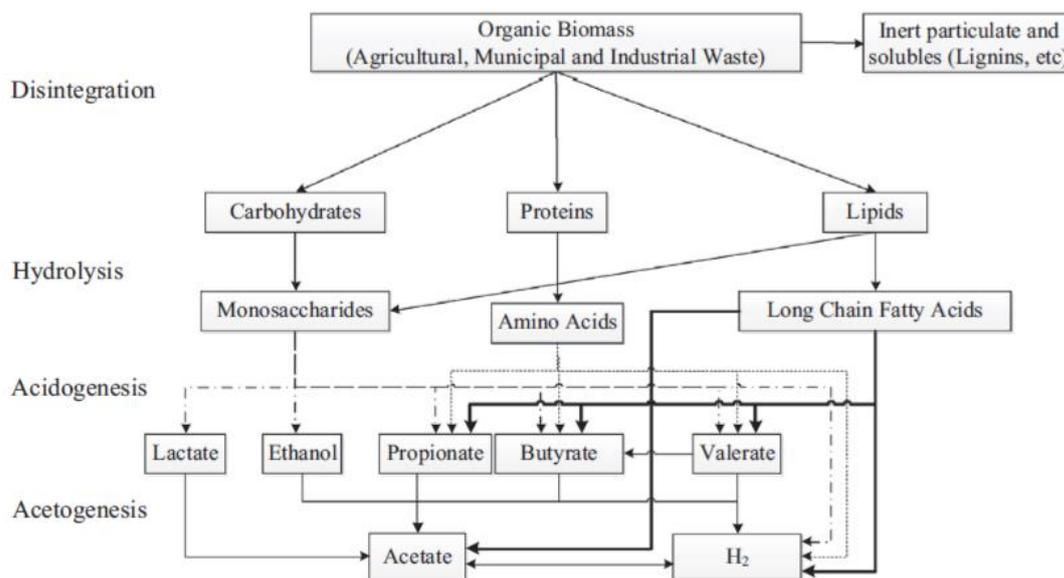


Figura 2-3 – Fermentazione al buio (Ghimire et al,2015)

In figura 2.4 vengono mostrati, poi, i diversi possibili percorsi di degradazione del glucosio. Dapprima si ha la formazione di piruvato (CH_3COCOO^-), H^+ e $NADH$; il piruvato, prodotto intermedio principale della prima fase di degradazione, verrà poi convertito ad acetil coenzima A attraverso due possibili vie: percorso PFL (pyruvate formate lyase) o PFOR (pyruvate ferredoxine oxido reductase), eq.2.2 e eq.2.3 rispettivamente. Una volta formato l'acetil coenzima A, esso verrà ulteriormente degradato per dare i prodotti finali (quali acetato o etanolo).

Tabella 2-1 – Reazioni di dark fermentation del glucosio (Bundhoo, Molee, 2015)

Reazione
Glicolisi
$C_6H_{12}O_6 + 2NAD^+ \rightarrow 2CH_3COCOO^- + 4H^+ + 2NADH$ [eq.2.1]
Percorso PFL
$CH_3COCOO^- + CoA-H \rightarrow acetyl-CoA + HCOO^-$ $HCOO^- + H^+ \rightarrow CO_2 + H_2$ [eq.2.2]
Percorso PFOR
$CH_3COCOO^- + CoA + 2F_{dox} \rightarrow acetyl-CoA + 2F_{red} + 2CO_2$ $F_{red} + 2H^+ \rightarrow F_{dox} + H_2$ [eq.2.3]
Reazioni dell'acetil coenzima A
$Acetyl-CoA + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + CoA-H$ $Acetyl-CoA + 2NADH + 2H^+ \rightarrow CH_3CH_2OH + CoA-H + 2NAD^+$ [eq.2.4]

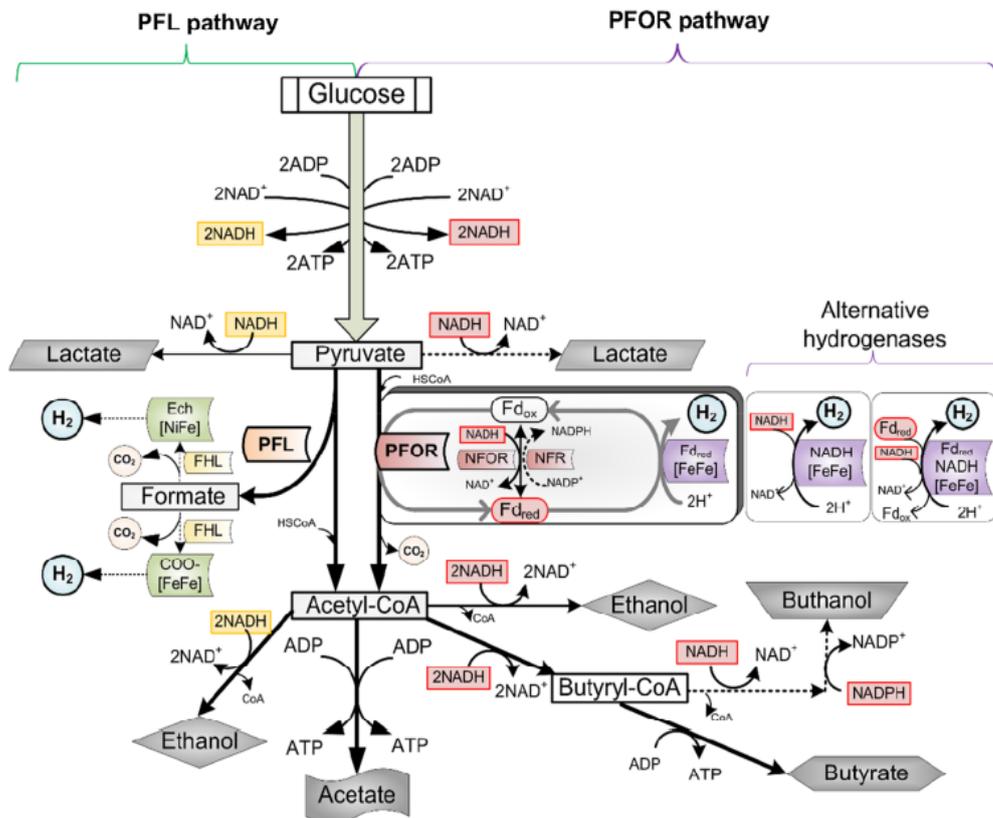


Figura 2-4 – Dark fermentation del glucosio (Tapia-Venegas et al,2015)

Queste vie metaboliche possono essere mediate da batteri strettamente anaerobici (*Clostridia*, archea), batteri facoltativamente anaerobici (*Escherichia Coli*), ma anche da batteri aerobi (*Alcaligenes*) (Li C and Fang, 2007); inoltre, in funzione dei percorsi di degradazione, come verrà mostrato, varia il rendimento di produzione di idrogeno; i prodotti principali sono acetato e butirrato (Hawkes et al,2007).

Le reazioni principali nella fermentazione al buio portate avanti dai batteri di tipo anaerobico (a partire da una molecola di glucosio) sono, infatti:



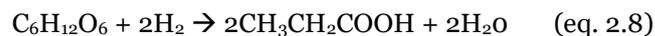
Quando il percorso favorisce la formazione di acido acetico (eq. 2.5) il rendimento di produzione di idrogeno è di 4 molH₂ per mole di glucosio; nel caso in cui venga favorita invece la formazione di acido butirrico (eq. 2.6) il rapporto si dimezza (2molH₂ per mole di glucosio).

Il rendimento effettivo di produzione d'idrogeno è però minore di quello teorico, in quanto la degradazione del substrato organico può seguire differenti percorsi di degradazione in cui non è prevista la produzione di idrogeno, oppure parte del substrato stesso può essere

utilizzato per la produzione di nuova biomassa (Hallenbeck et al, 2002). Ad esempio, sotto alcune specifiche condizioni operative, il percorso metabolico può portare ad un eccesso di produzione di etanolo e acetato (2.7) con conseguente riduzione delle moli stechiometriche di idrogeno prodotte a 2 molH₂ per mole di glucosio (Li C and Fang, 2007):



Altri percorsi metabolici sono quelli caratterizzati dai batteri cosiddetti *Clostridium Articum*, i quali prevedono un eccesso di produzione di propionato (2.8) con conseguente consumo di idrogeno prodotto:



Allo stesso modo, si verificano percorsi metabolici con sola produzione di acido lattico (eq.2.9) ed etanolo (eq.2.10) senza alcuna produzione di moli di idrogeno (Khanal et al, 2003):



Vari studi (Hawkes et al, Kim et al) proposero il rapporto tra acido butirrico ed acido acetico prodotti (B/A) come indicatore quantitativo del bioidrogeno prodotto associato ai percorsi metabolici precedentemente descritti. In particolare, Kim et al trovarono una proporzionalità diretta tra il rapporto B/A e il rendimento di produzione di idrogeno in uno studio portato avanti su reattore CSTR con carico organico pari a (10-60) gCOD/L, pH pari a 5.5 e tempo di ritenzione idraulica pari a 12 ore (Ghimire et al,2015).

In generale, in letteratura, si è osservato un rendimento di 2,5 molH₂ prodotte per mole di glucosio laddove il rapporto B/A sia pari a 3:2 (Hawkes et al, 2007) come dimostrato nell'equazione (2.11):



In contrasto con ciò, è stato dimostrato che non sempre il rapporto B/A è un buon indicatore per il rendimento di idrogeno prodotto, in quanto quest'ultimo può dipendere anche da un eccesso di attività omoacetogenica. In tal caso, B/A non è un buon indicatore in quanto batteri acetogeni (es.*Clostridium*) possono diminuire notevolmente la resa di bioidrogeno effettiva convertendo idrogeno ed anidride carbonica (o direttamente l'esoso) ad acetato (Ghimire et al, 2015).

Nel nostro caso, la fonte di carbonio è il lattosio presente nel siero di latte, il quale viene inizialmente degradato a glucosio, zuccheri semplici e galattosio, per poi passare alla produzione di bioidrogeno, anidride carbonica, e acidi grassi.

Il rendimento massimo teorico di produzione di idrogeno è pari a 8molH₂ per mole di lattosio con produzione di acido acetico e scende a 4molh₂/mol lattosio nel caso in cui si

segua il percorso metabolico che porta alla produzione di acido butirrico, ipotizzando che non vi sia produzione di etanolo.

Alcune altre reazioni, invece, seguono la via di degradazione del substrato ma senza che vi sia produzione di idrogeno, mentre le restanti comportano addirittura un consumo dell'idrogeno prodotto, come mostrato in tabella.

Queste ultime sono vie metaboliche svantaggiose, poiché diminuiscono il rendimento di idrogeno prodotto per competizione per la degradazione del substrato disponibile o per consumo dell'idrogeno stesso.

Tabella 2-2 – Reazioni biochimiche di fermentazione del lattosio (Yuan,2017)

Reazione	Equazione
Con Produzione di idrogeno	
$C_{12}H_{22}O_{11}+5H_2O \rightarrow 4CH_3COOH+4CO_2+8H_2$	[2.12]
$C_{12}H_{22}O_{11}+H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2CH_2COOH+4CO_2+4H_2$	[2.13]
Senza produzione di idrogeno	
$C_{12}H_{22}O_{11}+H_2O \rightarrow 4CH_3CHOHCOOH+CO_2$	[2.14]
$C_{12}H_{22}O_{11}+3H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2OH+4CO_2$	[2.15]
Con consumo di idrogeno	
$4H_2+C_{12}H_{22}O_{11} \rightarrow 4CH_3CH_2COOH+3H_2O$	[2.16]
$4H_2+CO_2 \rightarrow CH_4+2H_2O$ $4H_2+2CO_2 \rightarrow CH_3COOH+2H_2O$	[2.17]
$CH_3CH_2COO^-+2CO_2+6H_2 \rightarrow CH_3(CH_2)_3COO^-+4H_2O$	[2.18]
$CH_3(CH_2)_2COO^-+2CO_2+6H_2 \rightarrow CH_3(CH_2)_4COO^-+4H_2O$	[2.19]

2.4 Vie di consumo dell'idrogeno

Per ottimizzare la produzione di idrogeno è fondamentale controllare le reazioni competitive e i fenomeni che porterebbero ad una diminuzione del rendimento teorico di produzione dell'idrogeno.

Particolare attenzione va data a:

- Metanogenesi idrogenotrofa
- Omoacetogenesi
- Produzione di lattato
- Solventogenesi

Tali processi possono essere controllati, in maniera più o meno efficace, attraverso il controllo dei parametri operativi a essi relativi (SRT, HRT, pH, temperatura, ecc.) nonché tramite pretrattamenti del substrato o inoculo utilizzato.

I meccanismi sopracitati di consumo di idrogeno possono portare anche ad un'eventuale inibizione del processo, nel momento in cui essi contribuiscano ad un eccessivo aumento della concentrazione degli acidi prodotti a valori inibenti per i batteri idrogeno formatori: inibendo la biomassa acetogena si ha un accumulo di VFA all'interno del reattore, mentre inibendo la biomassa metanogena si ha un accumulo di acetato e idrogeno.

Nei paragrafi seguenti vengono descritti nel dettaglio i processi di consumo di idrogeno e le strategie per la loro prevenzione, mentre successivamente (paragrafo 2.6) si tratterà il controllo di tali fenomeni tramite l'ottimizzazione dei principali parametri di processo.

2.4.1 Metanogenesi

La metanogenesi idrogenotrofa è un processo che prevede la riduzione della CO₂, con l'idrogeno molecolare utilizzato come donatore di elettroni, per dare una conseguente produzione di metano e rappresenta l'ultima fase del processo di digestione anaerobica.

Per evitare questa fase bisogna inibire l'attività dei batteri metanigeni ed evitare, dunque, lo sviluppo successivo di metano: le strategie principali si incentrano sull'ottimizzazione dei valori di pH e HRT, nonché un eventuale pretrattamento del substrato o dell'inoculo.

Nello specifico, si adottano bassi valori di pH e HRT (Hydraulic Retention Time) e un pretrattamento del substrato (o inoculo) sia termico ad alta temperatura che chimico, laddove il tempo di ritenzione idraulica (HRT) è definito come il periodo di tempo in cui una portata di fluido Q permane in un reattore di volume V ed è pari al rapporto V/Q.

I batteri metanigeni operano in un range di pH pari a (6-8), dunque per valori molto inferiori a 6 la loro attività è fortemente inibita, risultando incapaci di crescere e produrre metano per valori di pH pari a 4,7 (Van Ginkel et al, 2005); inoltre, secondo lo studio di Valdez et al (2008), al diminuire del valore di HRT (ossia alta velocità di dilavamento) si verifica un maggior dilavamento dei batteri metanigeni prima che essi possano crescere a sufficienza da produrre metano. Gli autori suggeriscono un valore di HRT superiore alle 6 ore.

Il pretrattamento termico prevede un innalzamento della temperatura del substrato/inoculo fino a 100°C per 15-20 minuti (Valdez et al, 2008) in modo da eliminare tutti i batteri che non sono in grado di sopravvivere a tali condizioni ambientali avverse.

Questo pretrattamento funge da “selezionatore” delle specie microbiche da eliminare, in quanto alcune specie, nel verificarsi di tali condizioni avverse, sono in grado di attivare dei meccanismi di difesa protettivi quali la formazione di spore resistenti al calore, radiazioni, essiccamenti, pH inibenti e a sostanze tossiche (Valdez et al, 2008): tra queste specie, quali *Clostridia* e *Bacillus*, rientrano le categorie di batteri idrogeno produttori e di omoacetogeni. Inoltre, Bundhoo et al (2015) riportano la possibilità di utilizzare altresì inibenti chimici, citando ad esempio il bromoetano solfato (BES) come ottimale nel pretrattamento chimico del substrato.

2.4.2 Omoacetogenesi

I batteri omoacetogeni, strettamente anaerobi, presentano un metabolismo tale da comportare il consumo di idrogeno molecolare, utilizzato come donatore di elettroni al fine di ridurre l'anidride carbonica ad acetato.

Generalmente, molti studi hanno dimostrato come l'omoacetogenesi inibisca la produzione di idrogeno sia per impianti in continuo che in batch (Cata Saady, 2013).

Una dimostrazione dell'effetto omoacetogenico è stato fornito da Dinamarca et al (2009): il loro studio è stato svolto su reattore anaerobico CSTR in cui si è osservata possibile attività omoacetogenica, dovuta ad un decremento dell'anidride carbonica e dell'idrogeno nello spazio di testa del reattore con un aumento in parallelo della produzione di acidi.

Gli autori hanno poi condotto un test in batch alimentando idrogeno dall'esterno nello spazio di testa del reattore per osservare e verificare il possibile consumo.

E' stato riscontrato un consumo di idrogeno molecolare alla temperatura operativa di 35°C risultato pari a 2 mmolH₂/gVSS/d, con un rapporto iniziale H₂:CO₂ pari a 2:1 nello spazio di testa del reattore.

Cata Saady (2013) dimostrò la dipendenza del consumo di idrogeno per via omoacetogenica dalla pressione parziale dello stesso nello spazio di testa al reattore, fenomeno favorito per valori di pressione parziale superiori a 500 Pa corrispondente, per un reattore che operi con una pressione nello spazio di testa di 1,02 bar, ad una percentuale di idrogeno nel biogas pari a 0,5%.

Non vi è una vera e propria strategia di controllo della fase di omoacetogenesi, se non quella di ottimizzare i principali parametri di processo.

I trattamenti termici, ad esempio, non sono in grado di abbattere i batteri omoacetogeni: questo può essere dovuto al fatto che gli omoacetogeni sono una classe di batteri formanti spore e dunque in grado di sopravvivere a condizioni simil rigide; è dunque arduo prevenire il fenomeno di omoacetogenesi, in quanto sono stati fatti molteplici studi su questo problema senza un metodo risolutivo univoco vero e proprio.

2.4.3 Produzione di lattato

I batteri lattici, molto comuni nel processo di fermentazione al buio, possono inibire la resa di produzione di bioidrogeno e parzialmente (o completamente) il processo stesso di fermentazione.

Sono noti per la loro attività antimicrobica che può comportare, ad esempio, acidificazione per produzione di acido lattico (da degradazione competitiva del substrato). Un esempio di batteri lattici è la famiglia delle *Lactobacillaceae*.

Sikora et al (2013) presentano un lavoro in cui una serie di studi accuratamente selezionati analizzano l'influenza dei batteri lattici sulla produzione di idrogeno sia in reattori in continuo che in batch.

Riportiamo alcuni esempi: Noike et al (2002), indagando sugli effetti dell'inibizione da batteri lattici sul processo di fermentazione, riportano una netta inibizione da batteri lattici causata da reazioni competitive: la produzione di acido lattico, infatti, sembrerebbe portare ad un graduale arresto della produzione di idrogeno.

Confermano la precedente tesi Ren et al (2007), sperimentando un reattore in continuo con produzione di idrogeno da biomassa organica: la specie batterica *Lactococcus* risulta responsabile dell'inibizione della produzione di idrogeno per reazioni competitive col substrato con conseguente formazione di acido lattico e/o etanolo.

Altri studi, invece, sembrano essere in contrasto con quelli precedentemente riportati: Baghchehsaraee et al (2008) riporta, come evidenziato in figura 2.5, un effetto positivo dell'aggiunta di acido lattico che ha portato, addirittura, ad un aumento della produzione di idrogeno.

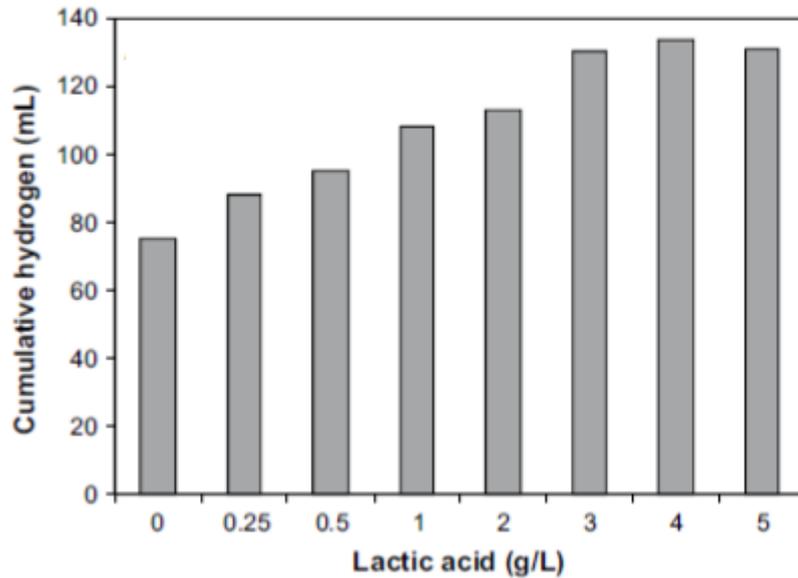


Figura 2-5 – Effetto dell'aggiunta di acido lattico sulla produzione cumulativa di idrogeno (Baghchehsaraee, 2008)

Yang et al (2007), studiando la produzione di bioidrogeno in continuo, riportano che la classe prevalente di batteri da acido lattico (circa il 50%) è rappresentata da *Lactobacillus* e che è stata osservata una netta diminuzione della produzione di idrogeno con la riduzione numerica della specie sopra citata. Gli autori concludono che i batteri appartenenti al genere *Lactobacillus* possano migliorare la resa di produzione di idrogeno tramite fermentazione del lattosio.

Emerge dunque una sostanziale difficoltà nel trovare una generalizzazione estendibile a tutti gli studi, probabilmente per la differente specificità dei parametri di processo utilizzati che rendono arduo il confronto: quello che sembra evidente, invece, è l'importanza di considerare le sostanze prodotte dalle diverse possibili specie di batteri lattici piuttosto che la concentrazione di acido lattico in sé.

2.4.4 Acetogenesi e Solventogenesi

Durante processo di fermentazione al buio si generano anche sottoprodotti solubili come acidi organici (acido acetico, butirrico, propionico, lattico) e solventi come acetone o butanolo.

La formazione di questi sottoprodotti è funzione diretta del percorso degradativo che seguono i batteri, classificato rispettivamente in acidogenesi (formazione di acidi organici) e solventogenesi (formazione di solventi), e dunque funzione indiretta dei parametri che

regolano i processi e le fasi di degradazione batterica: pretrattamenti del substrato, valore di pH, temperatura, pressione parziale di idrogeno.

Nel caso dell'acidogenesi, gli acidi possono essere sia in forma dissociata che indissociata ma ugualmente inibenti: difatti, gli acidi dissociati aumentano la forza ionica della miscela interna al reattore, causando la dissoluzione delle cellule dei batteri idrogeno produttori, con conseguente passaggio alla fase di solventogenesi; gli acidi non dissociati, invece, sono in grado di attraversare la membrana cellulare ove si dissociano a causa dell'elevato pH, causando un aumento degli ioni H⁺ e un netto gradiente di pH tra l'interno e l'esterno della cellula che si ripercuote negativamente sull'attività dei microrganismi: questo perché i protoni vengono forzatamente espulsi dalla cellula per compensare allo squilibrio di gradiente di pH consumando energia (ATP) che viene meno allo sviluppo della crescita batterica, causandone la progressiva morte.

Il ruolo del pH è molto importante: oltre a controllare la crescita dei batteri metanigeni e a influire sulla resa di produzione di idrogeno, è il parametro che regola il passaggio di fase verso la solventogenesi.

Con il processo di fermentazione si generano idrogeno e acidi organici: se il pH non è adeguatamente controllato, l'accumulo di questi acidi causa un "salto" negativo di pH (come mostrato in figura 2.6, in concomitanza con l'aumento degli acidi organici).

Col diminuire del pH si rischia di incentivare la produzione di solventi e il passaggio di fase alla solventogenesi, tipicamente per valori di pH inferiori o pari a 4,5 (Valdèz-Vazquez et al, 2009).

Come riportato dallo studio di Valdèz-Vazquez et al (2009), l'equazione di Henderson-Hasselbalch dimostra la dipendenza del pH con la concentrazione di acidi organici indissociati:

$$pH = pK_a + \log_{10}([A^-]/[HA]) \quad [\text{eq. 2.20}]$$

dove pK_a è il logaritmo negativo della costante di dissociazione acida per il generico acido HA.

Si nota che la dipendenza aumenta per pH < pK_a.

Per evitare l'inibizione da elevata concentrazione di acidi indissociati, il pH dovrebbe essere compreso tra valori pari o superiori a 4,8, valore che corrisponde alla costante di dissociazione del butirrato (Valdez-Vazquez et al, 2009).

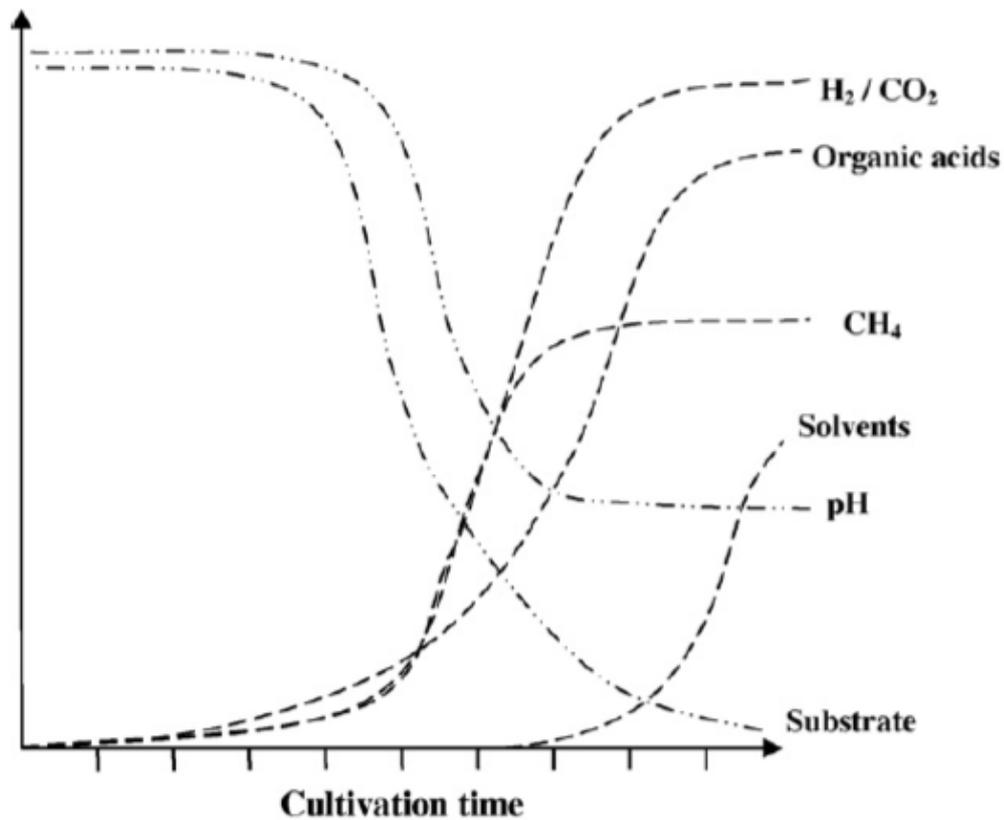


Figura 2-6 – Performance di fermentazione in batch per la produzione di bioidrogeno (Valdez – Vazquez et al)

2.5 Parametri di processo

2.5.1 pH

Nella fermentazione al buio il pH influisce sulla degradazione della sostanza organica dei microrganismi (quale l'enzima idrogenasi) e sulle reazioni di formazione dei metaboliti e degli intermedi di reazione: in sostanza, avremo dunque diverse rese di produzione d'idrogeno.

Sono stati condotti diversi studi sui valori possibili di questo parametro e si è osservata un'ottimizzazione della fermentazione al buio per valori di pH pari a 5,5 (Dinamarca, 2011). Valori di pH inferiori a 4,5 incentivano una produzione di solventi (Fang et Liu, 2002).

2.5.2 Temperatura

La temperatura è uno dei parametri più importanti della fermentazione al buio.

L'attività batterica può essere svolta in condizioni psicrofile (5-25 °C), mesofile (5-40°C), termofile (40-65°C), termofile estreme (65-80°C) e ipertermofile (superiori a 80°C): all'aumentare della temperatura aumenta anche l'attività enzimatica fino al livello ottimale, per poi diminuire in caso di eccessi ulteriori (Fabiano and Perego, 2001).

Nel caso specifico della fermentazione al buio, i range di temperatura ottimali sono mesofili e termofili, con valori ottimi rispettivamente pari a 37°C e 55°C (Shaterzade et Ataei, 2017).

Nella fermentazione al buio, inoltre, alcuni autori hanno osservato come il cambio di temperatura comporti un cambiamento nella comunità batterica (Bastidas et al, 2015), come ad esempio il passaggio dai batteri *Clostridium*, per temperature mesofile, ai batteri *Thermoanaerobacterium* nel salto a condizioni termofile (Karadag and Puhakka, 2010).

La resa di produzione di idrogeno resta invariata nelle due diverse condizioni termiche sopracitate, mentre Lin and Chang (2004) hanno osservato una minor resa di idrogeno ed una minor frazione di idrogeno nel gas per temperature mesofile: questo può essere dovuto al fatto che i batteri termofili siano meno inibiti dalla pressione parziale di idrogeno (Waligorska, 2012).

Le temperature termofile garantiscono dunque migliori condizioni operative, quali la rimozione del COD influente e la velocità di crescita dei microrganismi, ma hanno lo svantaggio di avere costi più elevati e presentare una certa instabilità di processo.

2.5.3 HRT

Il tempo di ritenzione idraulico (HRT), definito come il tempo medio di permanenza del fluido entrante nel reattore, nel nostro caso per reattore completamente miscelato coincide con il tempo di residenza cellulare.

Questo parametro influenza fortemente la fase di idrolisi e gli intermedi generati, dunque la produzione finale di idrogeno.

Il controllo del parametro HRT consente di inibire l'attività degli organismi consumatori di idrogeno, in particolare dell'attività metanogenica: bassi valori di HRT comportano un dilavamento dei metanigeni, poichè questi crescono più lentamente dei microrganismi produttori di idrogeno (Ghimire et al, 2015).

La produzione di idrogeno aumenta al diminuire del tempo di ritenzione idraulico (Kim et al, 2006), perchè inibisce l'attività dei batteri metanigeni, ma bisogna evitare il dilavamento

della biomassa; però deve essere scelto anche in funzione della biodegradabilità del substrato.

Studi sperimentali su reattori CSTR hanno dimostrato che il range di HRT ottimale per la produzione di bioidrogeno è pari a 6-12h (Bastidas et al,2015).

2.5.4 Substrato

Il processo di fermentazione al buio può essere applicato a diverse categorie di substrati (alcuni esempi sono i fanghi, il lattosio, il glucosio o il saccarosio) ma il rendimento è superiore per matrici ricche di carboidrati.

Non è sufficiente considerare solo il substrato in sé, ma anche prestare attenzione alla sua concentrazione (in termini di gCOD/l), in quanto anch'essa correlata alla produzione di idrogeno: in funzione del diverso tipo di substrato abbiamo diverse concentrazioni ottimali da alimentare al reattore per massimizzare le rese di processo.

Inoltre, eccessive concentrazioni di substrato in ingresso possono portare all'eccessiva formazione di VFA che, accumulandosi, contribuiscono ad inibire il processo.

Tutto ciò è confermato dallo studio di Kim et al (2006): gli autori testarono, in un reattore CSTR con condizioni operative di 35°C e HRT pari a 12 ore, l'effetto della concentrazione di substrato (nella fattispecie saccarosio, fatto variare da 10 gCOD/l a 60 gCOD/l) sulla produzione di idrogeno, riscontrando una netta correlazione. Riscontrarono, infatti, la massima resa di produzione per valori di concentrazione in ingresso pari a 30 gCOD/l, valore oltre il quale l'eccesso di substrato portò ad una perdita di efficienza sia nella produzione di idrogeno che nell'efficienza di degradazione del saccarosio.

Un ultimo parametro importante correlato al substrato è l'OLR (Organic Loading Rate, misurato in [gCOD/l/d]): esso non è altro che il rapporto tra la concentrazione di substrato C in ingresso e il tempo di ritenzione idraulica HRT, quest'ultimo inversamente proporzionale come riportato nell'equazione seguente:

$$OLR = C / HRT \quad (gCOD/l/d)$$

Può essere controllato, dunque, aumentando la concentrazione di substrato in ingresso o diminuendo il tempo di residenza idraulico (con gli accorgimenti precedentemente descritti).

2.5.5 Nutrienti

L'aggiunta di nutrienti (azoto e fosforo tipicamente) e microelementi in traccia consente di ottimizzare la crescita dei batteri e della loro attività enzimatica: essi sono infatti fonti di azoto per la formazione di proteine ed enzimi utili ai batteri idrogeno produttori (in particolar modo l'azoto).

Questi elementi vanno dosati in base ad un rapporto ottimale COD:micronutriente.

Hawkes et al (2006) riportano nel loro studio diverse definizioni del rapporto COD:N e COD:P per diversi autori: il range varia da (11-73):1 per l'azoto a (73-970):1 per il fosforo.

In ogni caso, nel momento in cui il substrato non debba contenere un'adeguata quantità di tali nutrienti, si necessita di apportare una corretta aggiunta dall'esterno.

Nonostante l'azoto sia un supporto fondamentale all'attività batterica è importante prestare attenzione alle concentrazioni delle sue possibili forme, rappresentate da ammoniaca libera (NH_3) o ione ammonio (NH_4^+): elevate concentrazioni di ammoniaca libera, attraversando la membrana cellulare, reagiscono con i protoni formando lo ione ammonio che porta all'aumento del pH intracellulare, causando una possibile inibizione dell'attività batterica.

Per quanto riguarda invece gli ioni metallici, la loro presenza, come è noto, rischia di inibire il processo causando un effetto di tossicità ai batteri idrogeno produttori: tuttavia, è stato dimostrato come in piccole quantità possano portare anche effetti positivi al rendimento di produzione (Ghimire et al, 2015).

Ciò non significa che il dosaggio di tali ioni sia necessariamente un bene per i microrganismi: metalli pesanti quali Cadmio, Cobalto, Zinco o il Nickel stesso, presenti tipicamente in reflui industriali o municipali, possono inibire completamente l'attività dei batteri anaerobici.

Ad esempio, Lin e Shei (2008) hanno dimostrato la tossicità, nel seguente ordine decrescente, degli ioni di Zinco (il più tossico), Rame e Cromo per concentrazioni pari, rispettivamente, a 4.5, 6.5 e 60 mg/l, che hanno portato ad una riduzione del 50% della produzione di idrogeno.

Un altro elemento di grande importanza per la fermentazione al buio è il magnesio, attivatore degli enzimi chinasi e sintetasi. Diversi studi hanno provato ad analizzare l'effetto dell'aggiunta di magnesio sulla produzione di idrogeno, poiché un eccesso di concentrazione può sopprimere la produzione di idrogeno (Yuan,2017).

2.5.6 Pressione parziale H_2

La pressione parziale di idrogeno è responsabile del trasferimento di fase di idrogeno dalla fase liquida alla fase gassosa, processo favorito per basse pressioni parziali nello spazio di testa del reattore. Inoltre, poiché l'enzima idrogenasi è responsabile dell'ossidazione e

riduzione della ferredossina nel processo di fermentazione, se la concentrazione di idrogeno in fase liquida aumenta troppo viene sfavorita l'ossidazione della ferredossina e dunque l'eccessiva riduzione inibisce la produzione di idrogeno (Ghimire et al, 2015).

Lee et al (2012) hanno studiato l'effetto della riduzione di pressione parziale di idrogeno in un reattore CSTR volto alla produzione di idrogeno con HRT pari a 6 ore, trovando un ottimo nella resa di produzione di idrogeno e nell'efficienza di produzione pari, rispettivamente, a 4,5 molH₂/mol saccarosio e al 56,2%.

Nella digestione anaerobica la riduzione della pressione parziale di idrogeno e di anidride carbonica è portata avanti dai batteri metanogeni tramite la loro conversione in metano, ma poiché qui stiamo parlando di fermentazione al buio, dunque di un processo privo di fase di metanogenesi, la pressione parziale di idrogeno e la CO₂ devono essere ridotte artificialmente.

Ad esempio, Ghimire et al (2015) dimostrarono la possibilità di ridurre la pressione con una pompa a vuoto.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

In questo capitolo sono descritti l'impianto pilota e le sue componenti principali, nonché il funzionamento generale e le analisi, con le opportune metodologie, portate avanti al fine di ottimizzare la gestione, la conduzione e la produzione della normale attività del reattore.

3.1 Attività sperimentale

L'attività sperimentale è volta all'ottimizzazione del processo in continuo di dark fermentation per la produzione di bioidrogeno da siero di latte su impianto pilota. Il lavoro di laboratorio, incentrato su una migliore conoscenza del processo e su come questo possa venire influenzato da fattori esterni, riguarda dunque la gestione generale e il monitoraggio dell'impianto, nello specifico la gestione comprende: preparazione di alimento influente (composto per lo più da siero di latte, acqua e micronutrienti); preparazione della soluzione di soda necessaria a mantenere il pH sul valore ottimale di 5.5; lo smaltimento dell'effluente (digestato); prelievo e analisi sul siero di latte (fondamentali per la preparazione dell'alimento), sul liquore miscelato all'interno e sul biogas (tramite gas cromatografo); raccolta e analisi di dati di pressione generati all'interno del reattore tramite manometro Keller.

Con i dati di pressione si può calcolare la produzione volumetrica di biogas, mentre grazie al gas cromatografo si valuta la composizione percentuale delle sostanze presenti nel biogas e, dunque, il rendimento di produzione d'idrogeno.

La gestione del reattore ha altresì comportato interventi inquadrati come di manutenzione straordinaria, in quanto inerenti al funzionamento tecnico dell'impianto, quali la sostituzione

e pulizia dei tubi delle pompe di alimento, spurgo e soda o la sostituzione di sensori interni al reattore, nonché la manutenzione del gas cromatografo.

A tal proposito, si è registrato nel mese di febbraio un intervento di manutenzione straordinaria inerente ad un guasto interno all'impianto pilota che ha comportato una necessaria interruzione delle analisi, un breve spegnimento del reattore e un riavvio a diverse condizioni sperimentali di partenza.

Per questo motivo i risultati saranno suddivisi e confrontati tra due periodi di tempo: nel primo periodo, detto fase 1, l'impianto pilota è stato fatto partire con un inoculo formato da acqua di rete e siero di latte; nel secondo periodo, postumo alla riparazione interna dell'impianto pilota, il reattore è stato fatto ripartire alimentando della biomassa organica già presente al suo interno dalla fase 1.

3.2 Impianto pilota

La produzione di bioidrogeno è stata condotta tramite impianto pilota in reattore completamente miscelato (CSTR), sito all'interno del laboratorio del Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale (LIA). Le principali componenti dell'impianto pilota sono mostrate in figura 3.1.

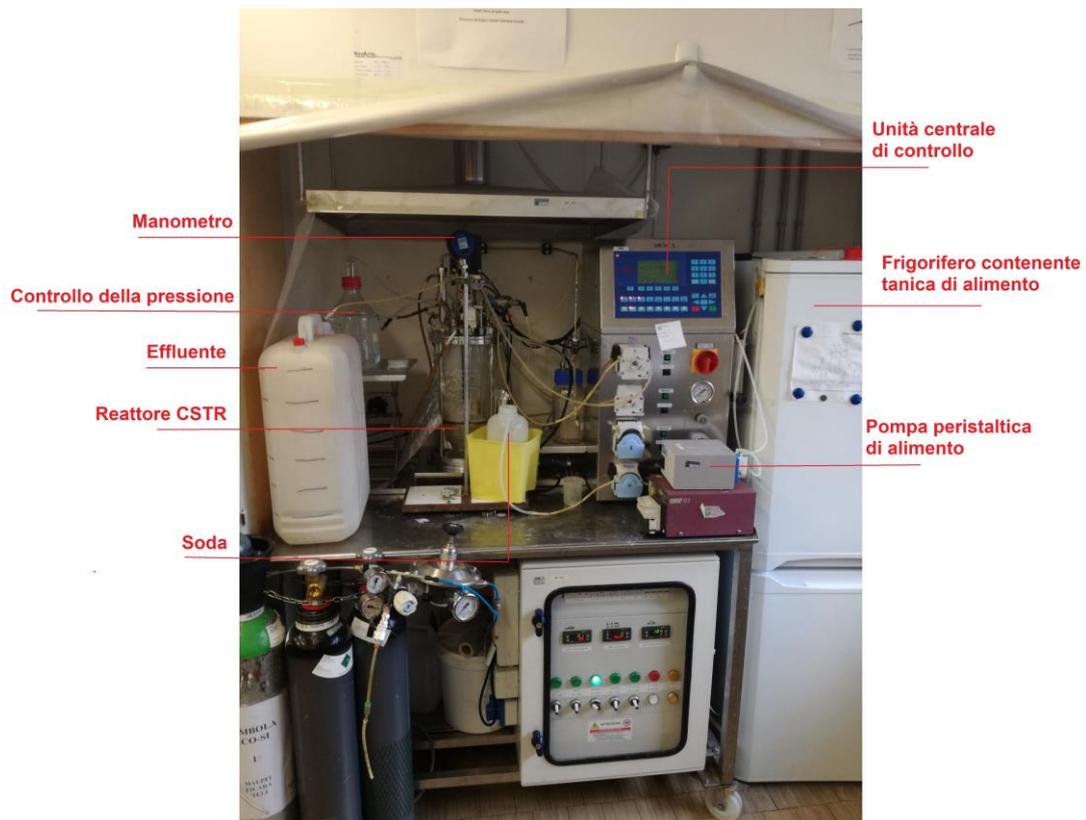


Figura 3-1 – Componenti principali dell'impianto pilota

Il volume del reattore è di 10 litri, di cui 3 litri sono occupati dalla miscela al suo interno. All'interno del frigorifero viene conservata la tanica contenente l'alimento, di cui vengono pompate circa 8 l/d da pompa peristaltica con tempo di ritenzione idraulico HRT pari a 9 ore. L'alimento è una soluzione costituita da acqua di rete, siero di latte, micronutrienti e cloruro di ammonio.

Tutti i parametri caratterizzanti le condizioni operative sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 3-1 – Parametri operativi dell'impianto pilota

Parametro Operativo	Valore
Volume del reattore (L)	10
Volume miscela (L)	3
HRT (h)	9
Portata di alimento (L/d)	8
pH	5,5
Temperatura (°C)	36
Miscelazione (rpm)	200

L'impianto pilota, nel suo complesso, è costituito dal reattore cilindrico in vetro completamente sigillato contenente la miscela, le due taniche contenenti l'alimento e l'effluente (entranti ed uscenti tramite pompa peristaltica), una bottiglia contenente due litri di soda e una bottiglia di vetro contenente acqua deionizzata che funge da sistema di sicurezza e controllo della pressione.

Si fornisce in figura uno schema funzionale dell'impianto pilota e delle apparecchiature ad esso collegate.

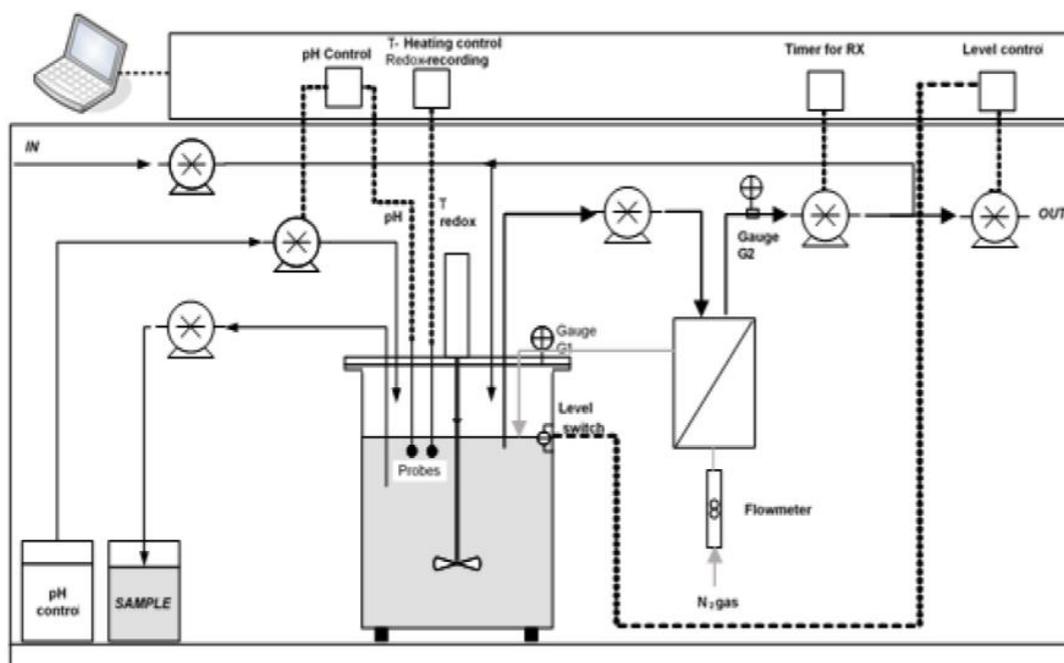


Figura 3-2 – Schema funzionale dell'impianto pilota

Sulla testa del reattore sono poste due sonde per il controllo di pH e temperatura, il miscelatore (che opera a 200 rpm) ed un sensore che controlla la formazione di "schiuma" all'interno della miscela e che controlla indirettamente il livello della miscela all'interno del reattore.

Sulla testa del reattore, inoltre, è sito il manometro digitale KELLER con cui vengono misurati e raccolti i dati di pressione, salvati su computer portatile collegato al manometro tramite porta USB.

Il controllo delle pompe peristaltiche di alimento ed effluente, nonché l'impostazione dei parametri principali di processo viene effettuata tramite l'interfaccia "Diachrom" di processo posta accanto al reattore; per quanto riguarda invece il controllo dei principali parametri di

processo (temperatura, pH, miscelazione) essi vengono monitorati tramite il computer portatile a cui sono connesse le sonde interne al reattore.

Vi sono componenti specifiche che ne garantiscono la manutenzione:

- La temperatura è mantenuta sui 36°C grazie ad un sistema di riscaldamento costituita da una piastra riscaldante posta alla base del reattore e da un sistema di raffreddamento tramite di acqua di rete
- Il pH è mantenuto pari a 5,5 tramite il dosaggio di soda (NaOH 3M) mediante pompa peristaltica

Il biogas generato dall'attività ed accumulato nello spazio di testa viene poi allontanato e immesso in atmosfera previa condensazione dell'umidità; inoltre, la cappa d'aria sovrastante l'impianto pilota, di portata d'aria pari a 200 mL/min, funge da sistema di sicurezza per prevenire eventuali perdite di biogas.

Vi sono, inoltre, due punti nel reattore in cui è possibile prelevare i campioni di effluente e di biogas per poterli analizzare, punti che verranno analizzati successivamente

L'effluente prodotto dall'attività è quotidianamente raccolto in taniche da 10 litri ed etichettato come digestato (codice CER 190606), stoccato in apposita camera dei rifiuti e smaltito successivamente come rifiuto speciale non pericoloso.

3.3 Matrici liquide

3.3.1 Siero di latte

Il siero di latte utilizzato per gli esperimenti è stato prelevato da SERIM ITALIA (BS), periodicamente ordinato in funzione delle necessità sperimentali e conservato nella cella frigorifera presente nel laboratorio LIA.

La tipologia utilizzata è quella di un siero permeato di ultrafiltrazione sottoposto a concentrazione con osmosi inversa (figura 3.2).

All'arrivo di ogni nuova tanica (da circa 10L) sono effettuate le analisi per determinare COD e azoto totale, in maniera tale da verificare eventuali scostamenti rispetto ai valori tabulati ed effettuare gli esperimenti con la massima precisione possibile.

Per effettuare ulteriori indagini sul processo, sul siero tal quale venivano anche, sporadicamente, fatte analisi dei solidi totali sospesi (TSS) e dei solidi sospesi volatili (VSS), nonché della concentrazione di azoto ammoniacale presente.

Le caratteristiche del siero concentrato utilizzato durante la sperimentazione sono riportate in tabella 3.2.

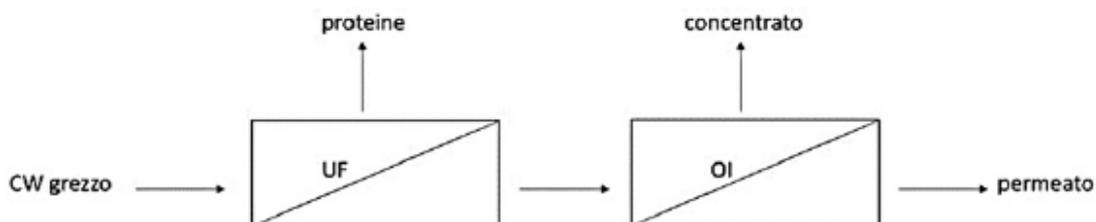


Figura 3-3 – Trattazione del siero grezzo prima di essere utilizzato come permeato concentrato

Tabella 3-2 – Caratteristiche del siero permeato concentrato

Parametro	Valore nel siero permeato concentrato
COD (g/l)	149±6,45
Ntot (mg/l)	553,8±68
N-NH₃ (mg/l)	77,2±55,42
TSS (g/l)	1,81±0,24
COD/TSS	82,3
COD/Ntot	269

Il siero, come si può notare, presenta un elevato valore di COD e di azoto totale dovuti all'osmosi inversa.

3.3.2 Alimento

L'alimento in ingresso al reattore viene formulato diluendo il siero concentrato con acqua di rete, micronutrienti (Tabella 3.3) e cloruro di ammonio (NH₄Cl).

L'aggiunta di macro e micronutrienti è funzionale a garantire concentrazioni adeguate e non limitanti il metabolismo batterico.

La composizione dell'alimento è calcolata in modo da avere valori di COD e azoto totale rispettivamente pari a 10 g/l di COD e 150mg/l di azoto totale; il rapporto risultante, pari a 15mgN/gCOD è garantito dal dosaggio di cloruro di ammonio (NH₄Cl).

I nutrienti servono a garantire la crescita ottimale della biomassa e sono preparati in soluzioni concentrate, la cui composizione (in termini di concentrazioni delle sostanze nutrienti aggiunte) è riportata in tabella 3.3.

L'alimento viene poi conservato in una tanica di 30L nel frigorifero posto accanto all'impianto e dosato tramite pompa peristaltica collegata al reattore adeguatamente calibrata per fornire 8 l/d allo stesso.

Tabella 3-3 – Concentrazioni delle soluzioni di nutrienti in aggiunta dall'esterno

Composto	Concentrazione (mg/l)
KH ₂ PO ₄	100
FeSO ₄ *7H ₂ O	35,5
ZnCl ₂	0,75
CuSO ₄ *5H ₂ O	5
MnSO ₄ *H ₂ O	9,2
CoCl ₂ *6H ₂ O	2,6
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	12,5
MgCl ₂ *6H ₂ O	100

3.4 Metodi e determinazioni analitiche

Il corretto funzionamento del processo in continuo è stato verificato tramite periodiche analisi di laboratorio sul biogas generato, sull'alimento e sull'effluente, secondo lo schema e la frequenza di tabella 3.4.

Tabella 3-4 – Misurazioni effettuate sui diversi campioni e relativa frequenza

Parametro misurato	Campione	Frequenza
COD	Alimento, effluente	3 volte a settimana
Azoto totale	Effluente	1 volta a settimana
Azoto ammoniacale	Effluente	1 volta a settimana
Solidi Sospesi Totali	Effluente, Alimento	3 volte a settimana
Solidi Sospesi Volatili	Effluente, Alimento	1 volta a settimana
Idrogeno	Biogas	Ogni giorno

I parametri analizzati sono: COD (domanda chimica di ossigeno) su alimento ed effluente; contenuto di azoto totale ed azoto ammoniacale sull'effluente; solidi sospesi totali e solidi sospesi volatili sull'effluente; contenuto percentuale di idrogeno sul biogas.

Per le determinazioni dei solidi sospesi totali si è utilizzato un sistema di filtrazione su apparato filtrante, con pompa a vuoto e filtri in fibra di vetro GFC.

Per quanto riguarda le analisi delle concentrazioni di COD, azoto totale ed azoto ammoniacale sono stati utilizzati invece dei kit commerciali (test in cuvetta Hach-Lange) con l'ausilio di un termostato lange HT 200s ad alta temperatura per la fase della digestione; le analisi su kit commerciale richiedono campioni privi di sospensione e si riferiscono ad un range di misurazione ben definito per ogni kit: per questo, si è reso necessario filtrare il campione su apparato filtrante con pompa a vuoto su filtri in acetato di cellulosa (diametro pari a 0,45 µm), nonché una eventuale diluizione del campione filtrato con acqua deionizzata nel caso in cui fosse necessario rientrare nel range di misurazione del kit utilizzato.

Le analisi sul biogas invece sono state effettuate tramite campionamento in gas bag e dapprima su successivo utilizzo di gas cromatografo (MICROGC3000, Agilent Technologies) in laboratorio LIA, per poi mandare le gas bag di volta in volta ad analisi in laboratorio "A.Rozzi" sito nel polo di Cremona, causa guasto al gas cromatografo, per utilizzare un gas cromatografo supplementare (Master GC, Dani Instruments).

3.4.1 COD

Le analisi avvengono tramite kit LCK914 di intervallo (5-60) gO₂/l e si riferiscono ad una quantità di COD solubile; esse sono state effettuate sia sull'effluente che sull'alimento e sul siero di latte tal quale.

3.4.2 Azoto totale ed ammoniacale

Le analisi vengono effettuate anch'esse mediante kit commerciale: LCK 238, intervallo (5-40) mgTN/l per la componente di azoto totale e LCK 303, intervallo (2-47) mgNH₄-N (2,5-60) mgNH₄/l per l'azoto ammoniacale.

3.4.3 Solidi sospesi totali e solidi sospesi volatili

I solidi sospesi totali, ossia tutte le sostanze non disciolte contenute nel campione da analizzare, sono stati analizzati tramite apparato filtrante Millipore, sfruttando filtri in fibra di vetro GFC del diametro di circa 1,2 µm; l'analisi è stata effettuata sia sull'effluente che sul siero tal quale.

La filtrazione è stata eseguita in doppio, in maniera tale da avere un valore finale che fosse la media dei due: è stato scelto di filtrare 10 ml per la miscela di effluente e 20ml per il siero di latte tal quale. Di seguito sono stati determinati i solidi sospesi volatili, tramite muffola (550°C) in laboratorio LIA, per l'effluente.

Le misurazioni di solidi sospesi totali e volatili sono state espresse in g/l, mentre la procedura di determinazione è stata condotta seguendo il metodo APHA (2005).

3.4.4 Biogas

Il biogas è stato analizzato quotidianamente in maniera tale da ottimizzare il controllo del rendimento del reattore. Il campionamento è stato effettuato tramite una sacca in tedlar (gas bag) attaccata ad un tubo di campionamento sulla testa del recipiente di raccolta del biogas: è stato inoltre utilizzato un flusso di azoto ausiliario per velocizzare la raccolta del biogas e garantire un'adeguata diluizione necessaria al gas cromatografo per la lettura dei dati.

L'analisi della composizione del biogas (in termini di idrogeno, anidride carbonica e metano) è stata effettuata dunque tramite gascromatografia (gas cromatografo microGC 3000, Agilent Technologies).

Lo strumento è composto da due colonne analitiche: una a setacci per la lettura di N₂, H₂, CH₄ e O₂; una polimerica per la lettura di CO₂ e N₂O.

Tramite connessione LAN è poi possibile collegare il gas cromatografo ad un computer su cui è stato installato il software SOPRANE (sviluppato da SRA Instrument S.P.A.) per la raccolta e la lettura dei dati.

Mediante un foglio di calcolo, poi, si rilevano le percentuali di idrogeno, anidride carbonica e metano presenti nel biogas: la quantità di metano è sempre risultata nulla, indice di una completa assenza del fenomeno di metanogenesi.

La produzione di biogas in termini quantitativi, invece, viene effettuata sfruttando i dati raccolti dal manometro sito in testa al reattore e collegato al computer su cui è presente il software LOGGER 5 (sviluppato da KELLER) per la gestione dei dati di pressione: il calcolo viene poi effettuato su foglio di calcolo attraverso il metodo di Teli (2015).

Mediante il foglio di calcolo, le curve di pressione generate dai dati raccolti sono trasformate in curve di volume sulla base della legge dei gas perfetti e il volume cumulato di biogas prodotto viene successivamente calcolato tramite software matlab in termini di litri normali di biogas.

Quando si analizza una curva di questo tipo è importante notare la pendenza e la distanza tra i massimi, indicatori dell'attività biologica (e dunque, per via indiretta, del volume di biogas generato): la distanza, difatti, rappresenta l'intervallo temporale che intercorre tra i massimi, ossia tanto più sono vicini i picchi della curva di pressione tanto più la curva è ripida e dunque maggior quantità di biogas prodotto nell'unità di tempo.

3.5 Indici di produzione

Gli indici di produzione utilizzati per seguire e comprendere il processo sono riportati di seguito.

La **portata di biogas prodotto** è definita come il rapporto tra il volume di biogas in un certo periodo di tempo

$$Q_{biogas} = V_{biogas}/t \quad (NL/h)$$

dove Q_{biogas} è la portata di biogas prodotto, V_{biogas} è il volume di biogas (in NL) generato dal reattore e cumulato nel lasso di tempo t (ore).

La **portata di idrogeno prodotto** è calcolata moltiplicando la precedente per la percentuale di idrogeno misurata al suo interno:

$$Q_{H_2} = Q_{biogas} * \%H_2 \quad (NLH_2/h)$$

La **produzione volumetrica di idrogeno**, invece, è data dal rapporto tra la portata di idrogeno prodotta e il volume della miscela contenuta nel reattore:

$$VHPR = Q_{H_2}/V_{mix} \quad (NL/Lmix/h)$$

dove V_{mix} (l) è la portata di miscela contenuta nel reattore, pari a 3 litri.

La **resa molare di produzione di idrogeno** è definita dal rapporto tra moli di idrogeno prodotte per moli di substrato consumato, in un dato e identico intervallo di tempo.

Si ricorda che con riferimento al lattosio come substrato, tale valore è pari a:

$$mol\ substrato = [Q_{IN} * C_{IN} / PM_{Lattosio}]$$

In questo caso, la resa è stata definita come il rapporto tra le moli di idrogeno prodotte e le moli di lattosio in ingresso al reattore (Gugliandolo,2018).

$$Resa_{H_2} = (Q_{H_2}/22,4) / [(Q_{in} * C_{in,lattosio})/PM_{lattosio}] \quad (molH_2/molLattosio)$$

dove: Q_{H_2} è la portata di idrogeno; Q_{in} è la portata di alimento in ingresso al sistema; $C_{in,lattosio}$ e $PM_{lattosio}$ sono, rispettivamente, la concentrazione in ingresso (g/l) e il peso molecolare di lattosio.

La concentrazione in ingresso di lattosio viene calcolata rispetto al lattosio teorico, ipotizzando che la maggior parte del COD presente nel siero sia composto da lattosio, così da assumere tutto il COD in ingresso come equivalente al lattosio (Gugliandolo, 2018).

Sapendo che in ingresso la concentrazione di COD è pari a 10gCOD/l e che il fattore di COD equivalente è pari a 1,12 gCOD/gLattosio, la concentrazione di lattosio in ingresso è calcolata come segue:

$$C_{in,Lattosio} = (10/1,12)gLattosio/L$$

3.6 Tasso di crescita cellulare

La resa di crescita dei batteri esprime quanto substrato viene consumato dai microrganismi per la loro crescita, ossia quanto substrato è andato a costituire nuova biomassa (sintesi cellulare).

Viene definito come il rapporto tra la biomassa uscente dal sistema (espressa come SSV) e il substrato rimosso dal sistema (gCODrim), entrambi calcolati sullo stesso intervallo di tempo.

$$Y = SSV / COD_{RIM} \quad (gSSV/gCODrimosso)$$

dove:

SSV rappresenta il carico di solidi sospesi volatili effluenti su base giornaliera (gSSV/d)
CODrim rappresenta la quantità di substrato (gCODrim/d) rimosso in un giorno dal sistema, calcolato come differenza tra il COD influente (tutto in forma solubile) e il COD effluente solubile

La sostanza organica in forma sospesa in uscita può essere espressa in termini di COD in base alla seguente formula:

$$\text{COD}_{\text{ssv}} = \text{SSV} * 1,42$$

dove 1,42 rappresenta il valore tipico del rapporto COD/SSV della biomassa batterica, costituita prevalentemente da proteine.

In questo modo il coefficiente di crescita può essere definito anche su base COD/COD.

3.7 Bilanci di massa

Il bilancio di massa viene effettuato sul COD e su base giornaliera.

In base alla teoria, il COD in ingresso deve essere uguale al carico giornaliero di COD uscente dal sistema.

Quest'ultimo è dato dalla somma di due componenti: l'idrogeno e il COD uscente, a sua volta costituito dalla somma del COD solubile e del COD legato ai solidi sospesi volatili.

La seguente equazione esprime il bilancio complessivo:

$$\text{COD}_{IN} = \text{COD}_{OUT,S} + \text{COD}_{VSS} + \text{COD}_{H_2} \text{ (gCOD/d)}$$

dove:

COD_{OUT,S} rappresenta la componente di COD solubile contenuta nell'effluente in uscita dal sistema misurato tramite kit commerciale

COD_{H₂} rappresenta la frazione di COD equivalente all'idrogeno prodotto

COD_{VSS} rappresenta il COD associato ai solidi sospesi volatili uscenti

Per ogni componente, la frazione di COD equivalente (gCOD/d) a essa relativa è calcolata tramite fattori equivalenti riportati in tabella 3.5, mentre il COD solubile è quello misurato dalle analisi dei campioni di effluente.

L'analisi del bilancio del COD è essenziale in questo tipo di studi per verificare soprattutto che non vi siano errori sistematici o occasionali durante le misurazioni delle specifiche componenti.

E' stato inoltre effettuato un secondo bilancio sul COD solubile uscente secondo l'equazione riportata di seguito, dove si confronta il COD solubile con la somma delle componenti relative alle sostanze disciolte misurate (acidi organici volatili: propionico, butirrico, isobutirrico, acetico ed etanolo), tutti in termini di COD equivalente.

$$COD_{OUT, S} = COD_{HA} + COD_{ETH} + COD_{Pr} + COD_{ISO} + COD_{BUT} \text{ (g/d)}$$

dove:

COD_{HA} rappresenta la frazione di COD relativa all'acido acetico

COD_{ETH} rappresenta la frazione di COD relativa all'etanolo

COD_{Pr} rappresenta la frazione di COD relativa all'acido propionico

COD_{ISO} rappresenta la frazione di COD relativa all'acido isobutirrico

COD_{BUT} rappresenta la frazione di COD relativa all'acido butirrico

La non chiusura di questo bilancio starebbe ad indicare la presenza nell'effluente di altre sostanze organiche non misurate singolarmente, quali ad esempio del lattosio residuo.

Tabella 3-5 - Fattori di equivalenza per il COD

Componente	Fattore di equivalenza	U.M.
H ₂	8	gCOD/gH ₂
H ₂	0,714	gCOD/NLh ₂
VSS	1,42	gCOD/gVSS
Etanolo	2,08	gCOD/gEta
Acido acetico	1,07	gCOD/gHac
Acido propionico	1,51	gCOD/gPro
Acido butirrico	1,82	gCOD/gBut
Acido isobutirrico	1,82	gCOD/gIso
Lattosio	1,12	gCOD/gLat

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONI

In questo capitolo vengono riportati e discussi gli esiti degli esperimenti portati avanti sull'impianto pilota e i risultati numerici inerenti ai parametri operativi di maggiore interesse.

L'impianto pilota è stato alimentato con una sola tipologia di siero e non sono stati mutati i parametri operativi fondamentali (pH, HRT, temperatura, miscelazione) durante gli esperimenti.

Dal precedente studio di Yuan (2017), sul medesimo impianto pilota, è risultato che le migliori rese di processo si ottenevano nelle seguenti condizioni operative: concentrazione di COD in ingresso pari a 10 gCOD/l, HRT pari a 9h e conseguente OLR è pari a 26,7 gCOD/l/d. Questi parametri sono stati mantenuti anche nel corso di questa sperimentazione.

Si possono distinguere due periodi nello studio: il primo è stato interrotto a fine febbraio a causa di un guasto alla piastra riscaldante sottostante il reattore, che ha portato ad una riduzione della temperatura operativa da 36°C a 16°C; il secondo periodo, iniziato dalla seconda metà di marzo, ha visto, come si mostrerà, un netto miglioramento delle rese di processo. I due periodi verranno distinti come FASE 1 e FASE 2.

La FASE 1 è partita con un inoculo formato da acqua di rete e siero di latte, mentre nel riavvio post riparazione (FASE 2) l'inoculo è stato costituito da biomassa organica già presente nel reattore dalla FASE 1.

Le analisi sull'idrogeno sono state interrotte per un certo periodo (da fine gennaio a metà marzo circa), a causa della rottura del gascromatografo presente al laboratorio LIA. Successivamente l'analisi è ripresa presso il laboratorio "A.Rozzi" del Polo di Cremona, con minor frequenza rispetto al periodo iniziale.

Le analisi sulla quantità di biogas in sé, invece, sono state soggette a minor interruzione: questo perché, nonostante il guasto al gas cromatografo, è stato comunque possibile monitorare il volume di biogas generato dal reattore grazie ai dati raccolti dal manometro Keller ed elaborati su pc dal metodo di Teli (2015).

Si tratterà dapprima l'andamento generale dei parametri operativi, per poi confrontare tali andamenti tra i due diversi periodi e trarre le dovute conclusioni.

4.1 Rendimento del processo

I parametri e le grandezze monitorate sono: la produzione di biogas (NL/h) e la conseguente percentuale di idrogeno in esso contenuto; il rendimento molare di idrogeno (molH_2/mol lattosio); il rendimento di rimozione del COD (%); la concentrazione di solidi sospesi volatili nell'effluente e nel mixed liquor (gSSV/L); i bilanci di massa calcolati su base giornaliera per il COD; concentrazione degli acidi organici volatili e di etanolo; la resa di crescita ed il consumo di soda.

Produzione di biogas, idrogeno e contenuto percentuale di idrogeno

I due grafici sottostanti mostrano un confronto tra la produzione oraria di biogas e di idrogeno (figura 4.1) e la percentuale di idrogeno contenuta nel biogas nel tempo (figura 4.2). Come si nota subito dai grafici il passaggio tra le due fasi comporta un immediato miglioramento.

Nella prima delle due fasi: non si sono superati i 0,7 NL/h di biogas prodotti, con un trend stabilmente oscillante tra 0,4 e 0,6 NLbiogas/h, mentre la portata oraria di idrogeno non ha mai superato un valore massimo di 0,26 NLh²/h.

La percentuale di idrogeno invece ha avuto un andamento decrescente, iniziando con valori superiori al 50% ed abbassandosi progressivamente al di sotto del 40% verso la conclusione della prima delle due fasi.

Con l'inizio della seconda fase inizia un susseguirsi di buoni risultati con andamento crescente per entrambi i parametri (e anche per gli altri che analizzeremo, come verrà mostrato).

La quantità di biogas generata riprende dai valori di chiusura della fase 1, per salire progressivamente e stabilizzarsi tra l'unità e 1,2 NL/h prodotti, con soventi picchi persino al di sopra di 1,2 NL/h.

La portata oraria di idrogeno parte da un valore di 0,53 NLh²/h, pari a due volte il picco massimo raggiunto nella fase 1, per poi decrescere fino a 0,32 NLh²/h e riprendere un trend crescente costante con un picco pari a 0,71 NLh²/h.

La percentuale di idrogeno contenuta nel biogas, invece, riparte subito da valori che si aggirano intorno al 50% per intraprendere un andamento stabile tra il 50% e il 52% fino al termine degli esperimenti.

Il salto vuoto tra le due fasi in figura 4.2 è dovuto ai già citati problemi di manutenzione straordinaria dapprima inerenti al gas cromatografo e poi alla piastra riscaldante sottostante al reattore, problemi che hanno segnato una lunga interruzione delle analisi sull'idrogeno contenuto nel biogas.

La produzione di biogas in sé, invece, presenta una minore interruzione poiché è stata interrotta solo durante i problemi alla piastra riscaldante.

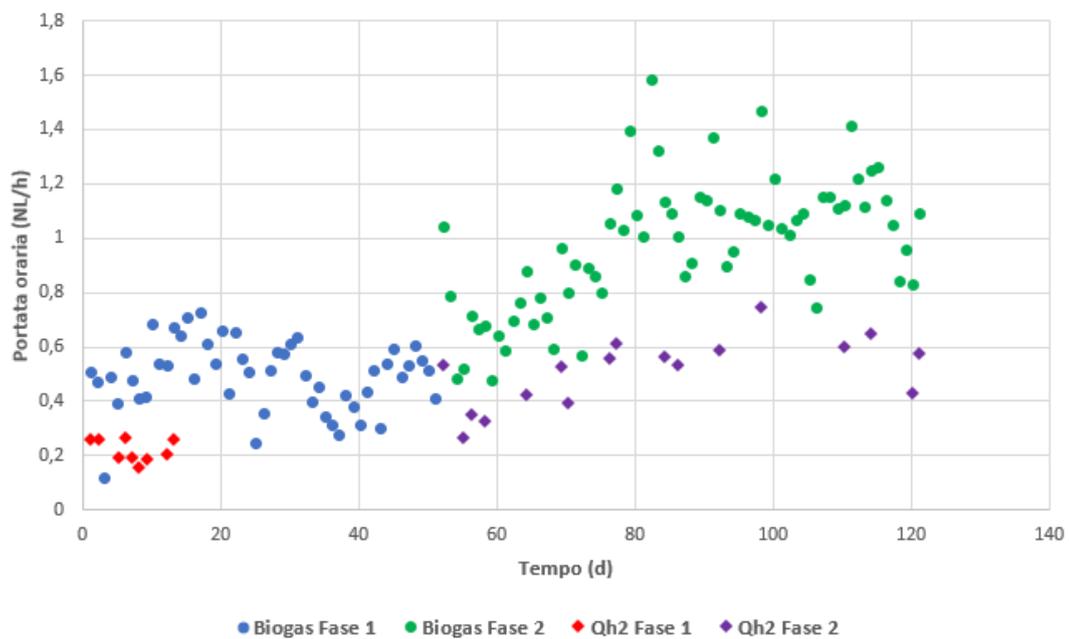


Figura 4-1 – Andamento nel tempo della produzione oraria di biogas e di idrogeno per le due diverse fasi

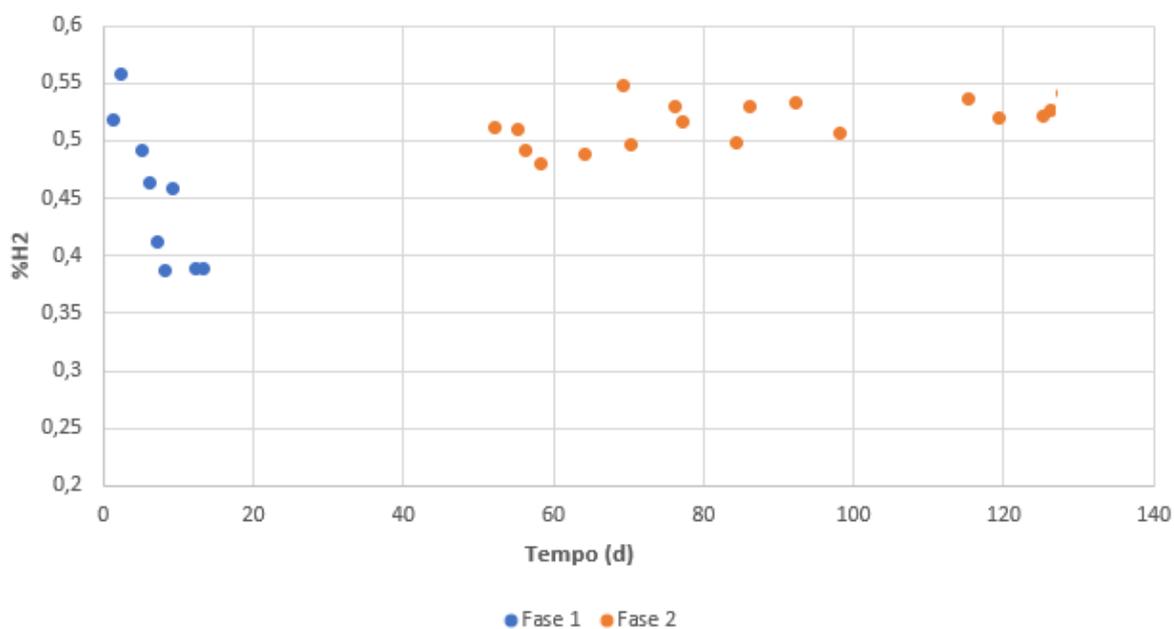


Figura 4-2 – Andamento nel tempo della percentuale di idrogeno contenuta nel biogas per le due diverse fasi

Rendimento molare

Anche il rendimento molare mostra una netta differenza tra le due diverse fasi analizzate in figura 4.3.

Nella prima delle due fasi i valori erano nell'intorno ad 1 molH₂/mol lattosio, con svariati picchi che non superavano il valore pari a 1,4 molH₂/mol lattosio.

La seconda fase, invece, è ripartita con valori leggermente più alti della conclusione della precedente (intorno a 1,45 molH₂/mol lattosio) per poi aumentare nettamente e stabilizzarsi in un intervallo compreso tra (2,5-3) molH₂/mol lattosio, con rari picchi superiori alle 3molH₂/mol lattosio.

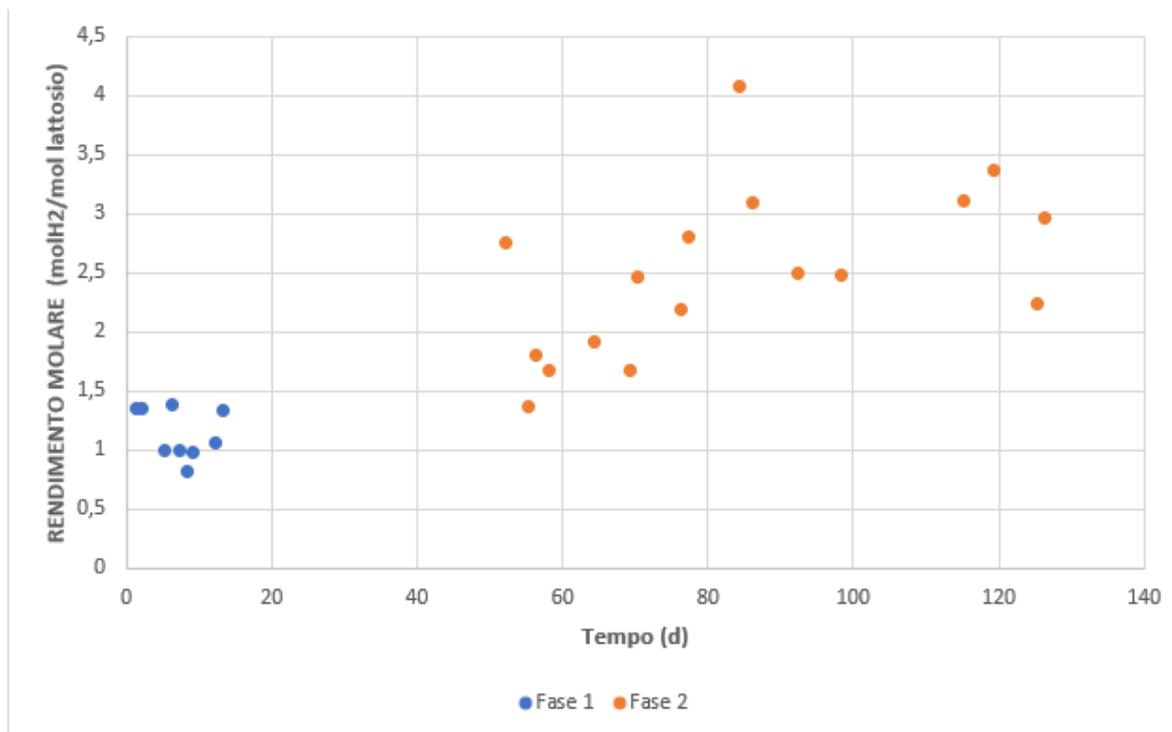


Figura 4-3 – Andamento nel tempo del rendimento molare di idrogeno per le due diverse fasi

Consumo giornaliero di soda

Il consumo di soda, calcolato quotidianamente, presenta un andamento molto variegato, come mostrato nelle figure seguenti sia in termini di moli di soda consumante giornalmente che in termini di moli di soda consumate per portata in alimento.

Durante la fase 1 presenta un andamento crescente fino a valori molto alti e superiori alle 25 mol/d, mentre con l'inizio della fase 2 l'andamento è descritto da un trend decrescente fino a stabilizzarsi su un intervallo compreso tra le 12 e le 16 mol/d consumati.

Nello stesso periodo la resa molare è cresciuta, con trend inverso abbastanza chiaro. I massimi rendimenti di produzione del processo (in termini di produzione di biogas e idrogeno) sono stati raggiunti intorno al giorno 90, ossia per valori di soda consumata compresi tra le 12 e le 16 mol/d, ben inferiori a valori di soda consumata raggiunti in precedenza (picchi di 26 mol/d durante la fase 1 e l'inizio della fase 2).

Da questo si conclude che il consumo di soda sarà indicatore di buona attività batterica fino ad un valore ottimo, oltre il quale non si verifica necessariamente una migliore attività dei microrganismi.

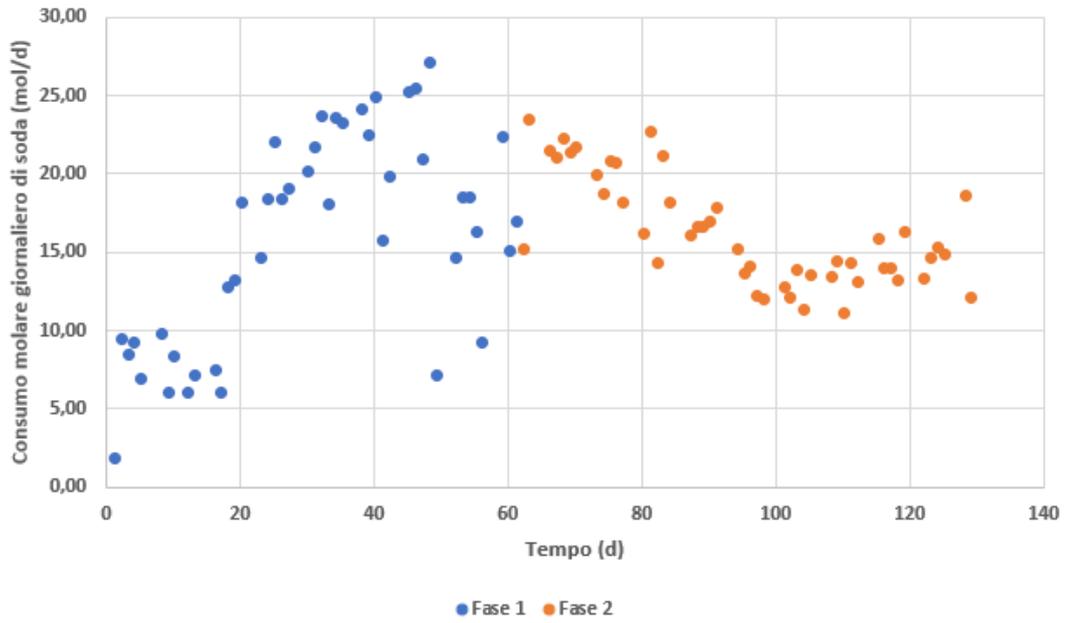


Figura 4-4 – Consumo molare giornaliero di soda per le due fasi

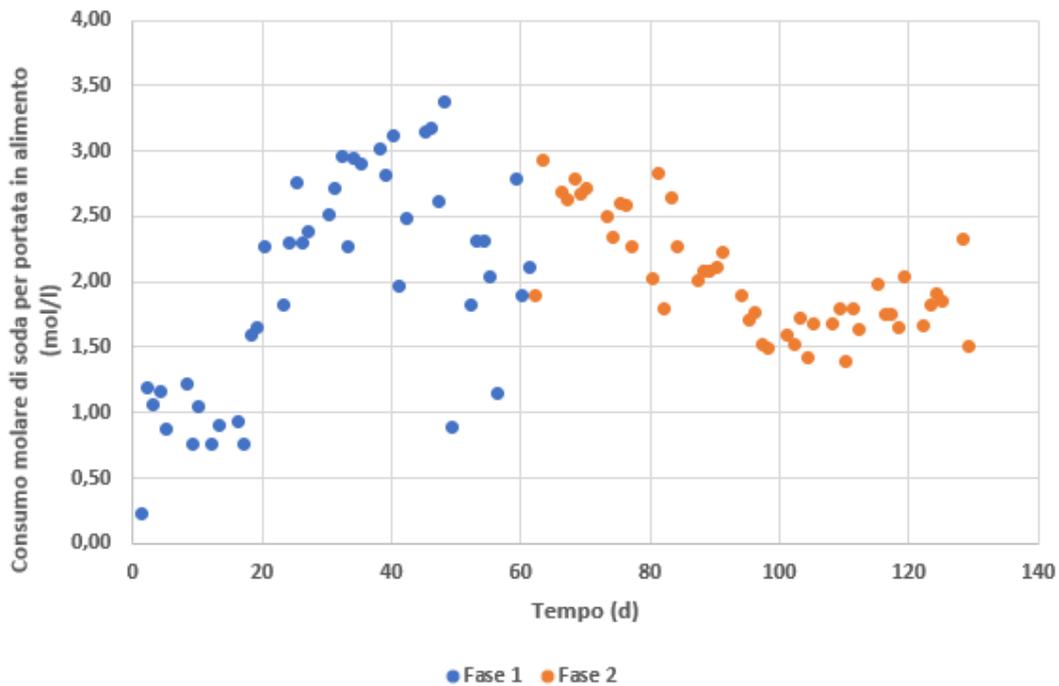


Figura 4-5 – Consumo molare di soda per litri in alimento per le due fasi

Si è provato, come rappresentato in figura 4.6, a confrontare il consumo giornaliero di soda con il rendimento di rimozione di COD.

I due parametri sono rappresentati su due diversi assi ma definiti nello stesso intervallo di tempo, corrispondente all'ascissa del grafico.

Si evince, dalla figura, come dal giorno 90 circa ci sia una contemporanea stabilizzazione di entrambi i parametri nei rispettivi intervalli, in concomitanza con il raggiungimento delle migliori rese di processo in termini di produzione di idrogeno.

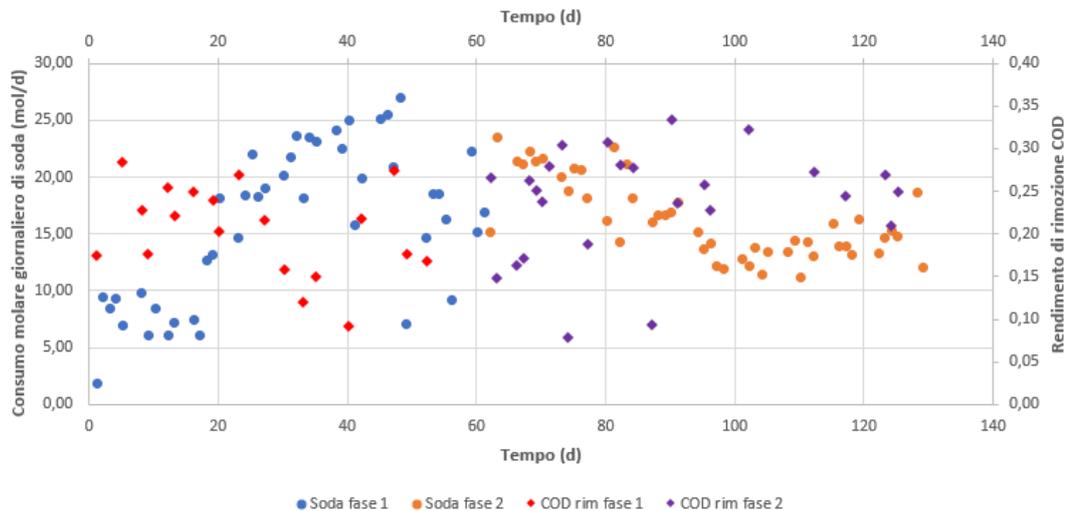


Figura 4-6 – Confronto tra le moli di soda giornalmente consumate ed il rendimento di rimozione di COD nel tempo

Rendimento di rimozione COD e concentrazione SSV

Il rendimento di rimozione del COD presenta differenze meno palesi tra le due fasi studiate rispetto ai parametri sopra analizzati, ma comunque un lieve miglioramento. Durante la prima fase, dopo una buona percentuale di rimozione superiore al 20%, ha mostrato un andamento decrescente rispetto al trend generale corrispondente a una rimozione tra il 10% e il 17%.

Nell'arco della seconda fase, dopo una leggera difficoltà nei primi giorni, si stabilizza quasi subito tra il 23% e il 27% di rimozione con rari picchi pari o superiori al 30%.

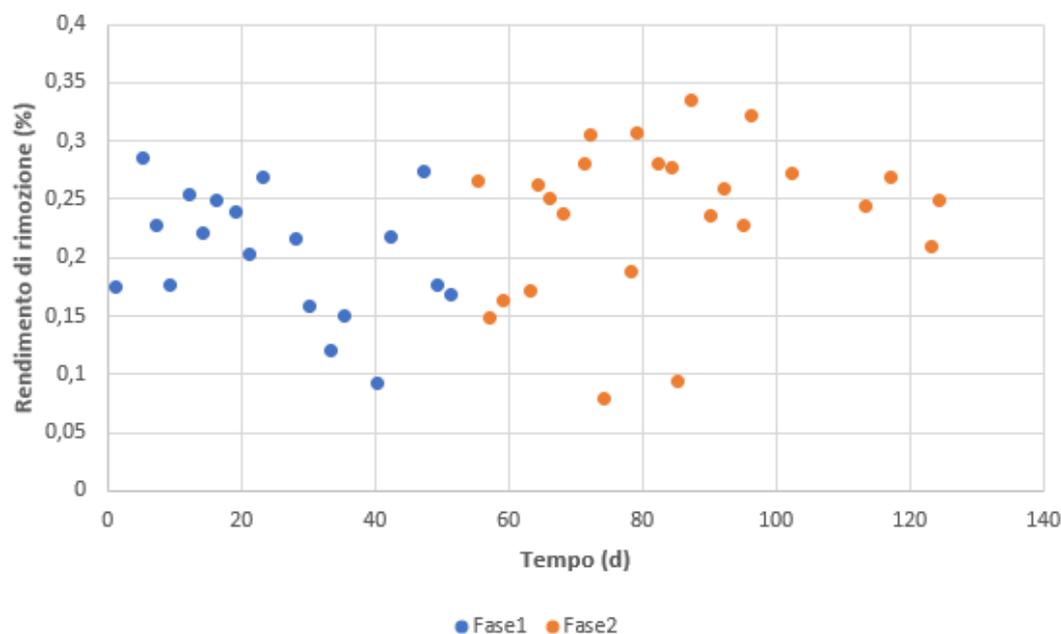


Figura 4-7 – Andamento nel tempo del rendimento di rimozione del COD per le due diverse fasi

La concentrazione di solidi sospesi volatili è il parametro che mostra maggior regolarità tra le due fasi, seppur anche qui si noterà una piccola differenza.

Nella prima fase le concentrazioni effluenti si intervallano tra (1-1,5) gSSV/l, mentre nella seconda fase c'è una lieve diminuzione che porta l'intervallo tra (0,9-1,1) gSSV/l, con un leggero aumento nelle ultime misurazioni.

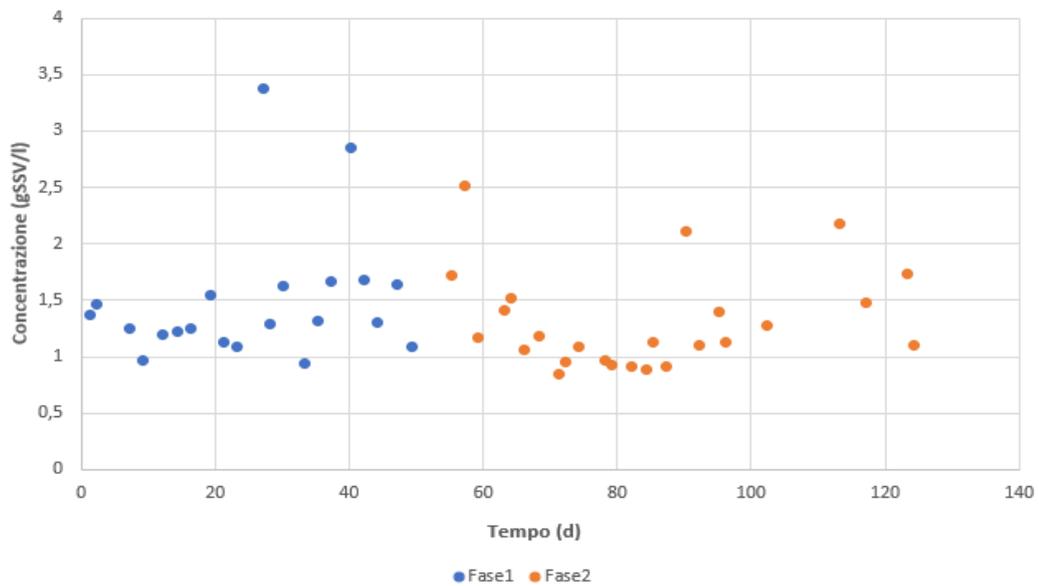


Figura 4-8 – Andamento nel tempo della concentrazione di solidi sospesi volatili per le due diverse fasi

Resa di crescita cellulare

L'andamento della resa di crescita cellulare nel tempo è mostrato in figura 4.7

I valori sono sempre risultati molto alti e di un ordine di grandezza superiore ai valori di letteratura che caratterizzano i microrganismi di tipo anaerobico.

Secondo Speece (1996) la Y per l'acidogenesi dei carboidrati è compresa tra 0,14 e 0,17 gVSS per gCOD rimosso, equivalenti a 0,2 – 0,24 se espressi come COD su COD.

Nello studio, infatti, la resa è sempre risultata compresa tra 0,4 e 0,9 gCOD/gCODrim (esclusi alcuni picchi superiori all'unità, probabilmente dovuti ad errori di misurazione) e mediamente pari ai seguenti valori: 0,93 gCOD/gCODrim per la fase 1 e 0,8 gCOD/gCODrim per la fase 2.

Si rappresenta, nella figura seguente, l'andamento della resa di crescita (in termini di gCOD/gCOD_{rim}) nel tempo per le due fasi.

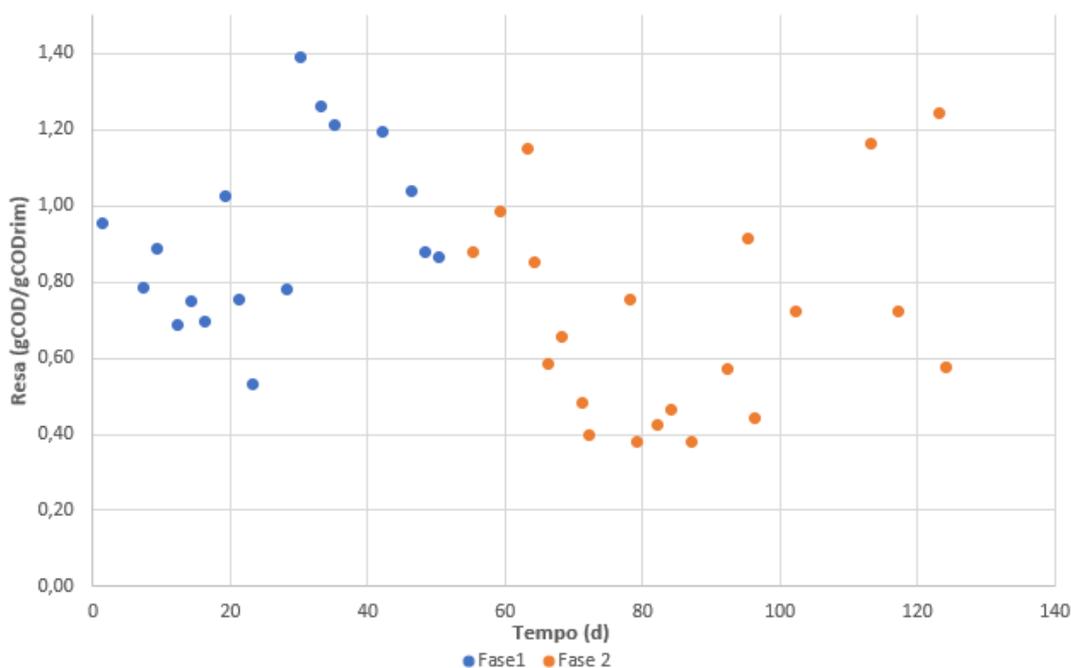


Figura 4-9 – Andamento nel tempo della resa di crescita cellulare per le due fasi

Per spiegare questa anomalia si sono fatte due ipotesi:

1) Coagulazione di materiale organico, legata alla presenza di proteine nel siero in alimento. Si è quindi proceduto a stimare quale sarebbe la massima quantità di coagulo (SSV) che potrebbe formarsi ed essere presente nell’effluente, se tutto l’azoto influente fosse in forma di proteine e venisse coagulato al 100%.

Sapendo che in ingresso al reattore vi sono circa 36,5 mgN_{in}/l di azoto (a cui andrà sommata una componente in aggiunta in alimento di cloruro di ammonio pari a 8 grammi per 18 litri di alimento) mentre in uscita si ha mediamente un valore pari a 118mgN_{out}/l e che possiamo assumere un rapporto proteine/azoto pari a 6,25mgProteine/mgN, avremo:

$$(8\text{gNH}_4\text{Cl} \cdot (0,26\text{gN/gNH}_4\text{Cl}) / 18\text{l}_{\text{ALIMENTO}}) / 1000\text{mg/g} = \mathbf{115,5 \text{ mgN/l}}$$

$$\text{Da cui } (115,5 + 36,5)\text{mgN/l} = \mathbf{152 \text{ mgN}_{\text{IN}}/\text{l}}$$

che costituisce la concentrazione complessiva di azoto in ingresso.

Conoscendo mediamente il quantitativo di azoto uscente, si può calcolare allora:

$$((152\text{mgN}_{\text{in}}/\text{l} - 118\text{mgN}_{\text{out}}/\text{l}) \cdot 6,25 \text{ mgPro/mgN}) / 1000\text{mgN/gN} = \mathbf{0,2 \text{ gProteine/l}}$$

Ossia 0,2 grammi di proteine per litro che restano all'interno del reattore.

Ipotizzando che il 100% di queste proteine vada a coagulare si avrà dunque un valore equivalente di 0,2 gSSV/l.

Andando a sostituire questo valore alla concentrazione di solidi sospesi volatili in uscita (valore mediamente pari a 1,1-1,2 gSSV/l) si è provveduto, dunque, a ricalcolare la resa di crescita.

Si osserva che le proteine coagulate, con questo calcolo approssimato, rappresentano circa il 20% della concentrazione di solidi sospesi volatili in uscita dal sistema, da cui discende che la resa di crescita cellulare si ridurrà di un fattore prossimo al 20% rispetto al valore calcolato in precedenza.

Si ottiene, di conseguenza, un valore medio di Y pari a:

$$Y = 0,71gCOD/gCOD_{RIM}$$

2) Accumulo intracellulare

Questa ipotesi deriva da osservazioni tramite microscopio epifluorescenza Zeiss Axiolab, su cui è montato un filtro per la visualizzazione SYBR GREEN (ex490-em520).

Le osservazioni sono state effettuate su un campione di biomassa prelevato dall'interno del reattore e si è evidenziata la formazione di "focchi" di sostanza organica dell'ordine dei (100-150) micron all'interno della biomassa organica.

Questi "focchi" sono formati dall'accumulo di sostanza organica non morta e potrebbero essere la causa di una resa di crescita cellulare così alta.

Si mostra in figura 4.8 un esempio delle osservazioni fatte al microscopio.



Figura 4-10 – Flocchi di biomassa organica osservati al microscopio

Si riassumono i valori medi da analisi dei principali parametri in tabella 4.1 per le due diverse fasi di processo:

Tabella 4-1 – Valori medi dei parametri di processo per le due diverse fasi

Parametro	Fase 1	Fase 2
<i>OLR (gCOD/l/d)</i>	26,7	26,7
<i>Produzione oraria biogas (NL/h)</i>	0,41±0,12	0,98±0,24
<i>%H₂</i>	45±6,2	52±1,8
<i>Rendimento molare (molH₂/mol lattosio)</i>	1,16±0,21	2,51±0,7
<i>COD rimosso (%)</i>	20,5±5	24±6,5
<i>Resa di crescita Y (gSSV/gCODrim)</i>	0,93±0,23	0,9±0,43
<i>SSV (gSSV/l)</i>	1,6±0,59	1,32±0,44

Si riportano, nelle figure seguenti, gli istogrammi relativi ai parametri di processo riportati nella tabella precedente per le due fasi di studio (escluso il carico organico OLR il cui valore è stato mantenuto costante) con relativi 25-esimo percentile ($q_{0,25}$) e 75-esimo percentile ($q_{0,75}$).

La distanza tra i due percentili rappresentati in figura, ossia la distanza interquartile (definita come $q_{0,75} - q_{0,25}$) è un indice di dispersione, ossia una misura robusta della variabilità dei dati centrali, cioè non estremi.

Nel caso della produzione oraria di biogas (figura 4.11) si nota una distanza interquartile simile per la fase 1 e la fase 2, ossia una variabilità dei dati quasi costante per quanto riguarda le due fasi di studio.

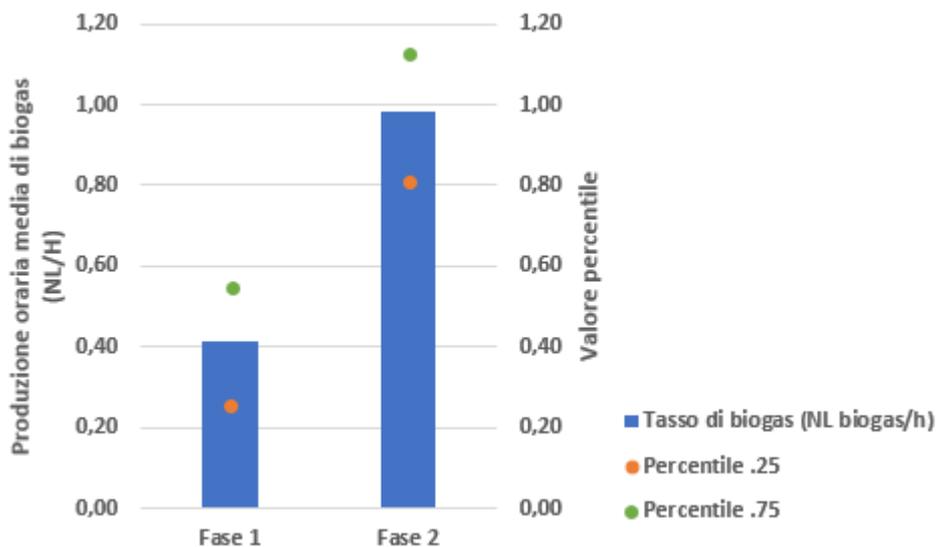


Figura 4-11 - Produzione media oraria di biogas per le due fasi

I dati analizzati sulla percentuale media di idrogeno contenuta nel biogas (figura 4.12) e sul rendimento molare (figura 4.13) non concordano con quanto detto in precedenza: si evidenzia, nel primo dei due casi, una variabilità molto più ampia per quanto concerne i dati analizzati durante la prima fase dello studio, con i percentili calcolati sulla fase 2 molto più incentrati attorno al valor medio.

Nel secondo caso (figura 4.13), viceversa, si presenta una maggiore variabilità dei dati per la seconda fase dello studio, mentre nei dati analizzati durante la fase 1 si verifica un valore

molto inferiore della distanza interquartile, con i percentili molto più incentrati attorno al valor medio calcolato.

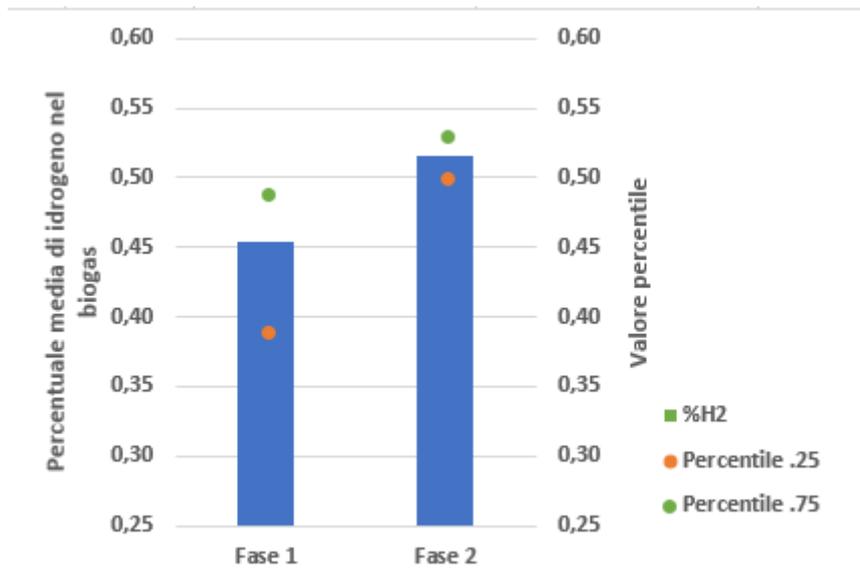


Figura 4-12 - Percentuale media di idrogeno contenuta nel biogas per le due fasi

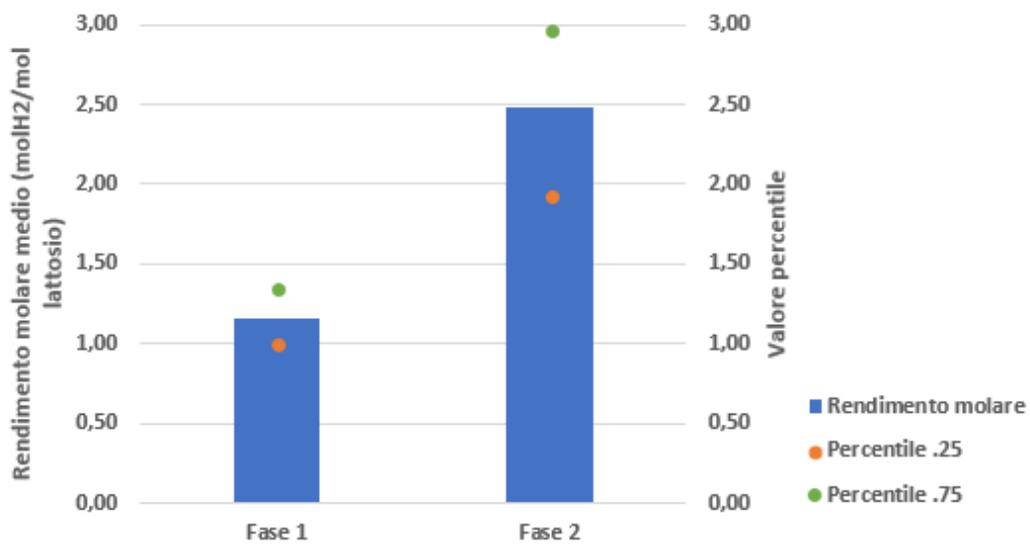


Figura 4-13 –Rendimento molare medio per le due fasi

Il rendimento medio di rimozione del COD (figura 4.14) presenta una buona variabilità dei dati per entrambe le fasi dello studio.

La fase 2, nello specifico, presenta una variabilità dei dati analizzati lievemente inferiore rispetto alla fase 1.

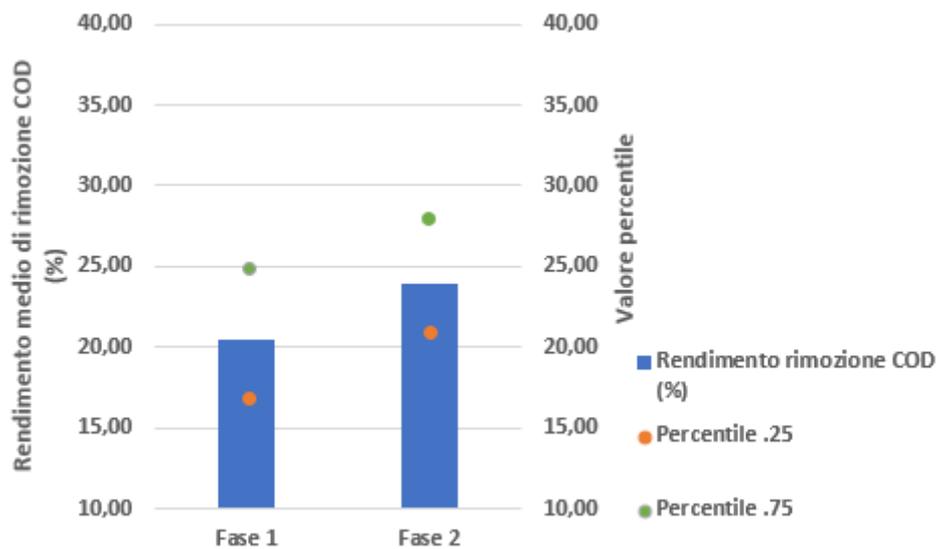


Figura 4-14 – Rendimento medio di rimozione COD per le due fasi

E' stata poi registrata, sulla resa media di crescita, la maggior variabilità dei dati analizzati tra tutti i parametri di processo (figura 4.15), nonché una forte asimmetria dei dati per entrambe le fasi di studio.

In particolare, la fase 2 risulta molto più variabile della fase 1 e presenta una notevole asimmetria verso la metà sinistra dei dati analizzati.

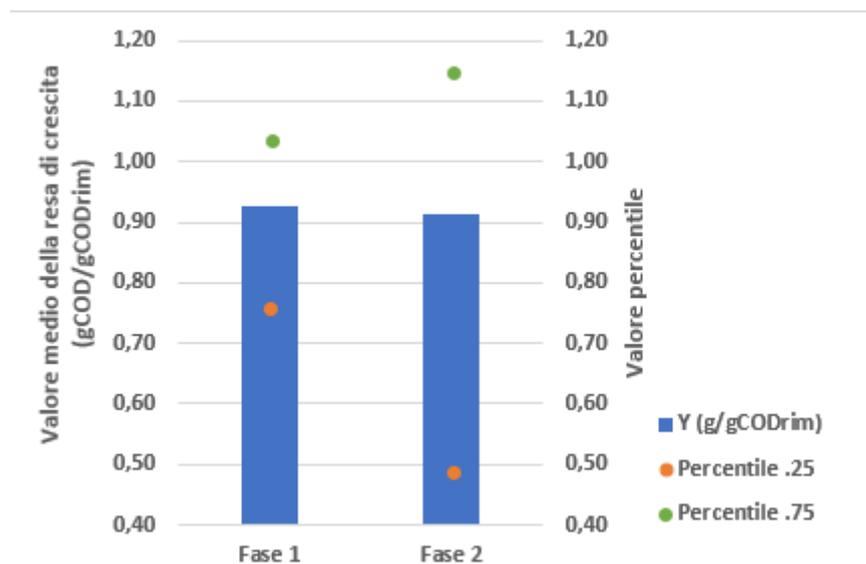


Figura 4-15 – Resa media di crescita per le due fasi

La concentrazione media di solidi sospesi volatili (figura 4.16) presenta infine una variabilità dei dati (in termini di distanza interquartile) quasi costante tra le due fasi di studio, ma altresì una forte asimmetria verso la metà sinistra dei dati analizzati, soprattutto per quanto concerne la fase 1.

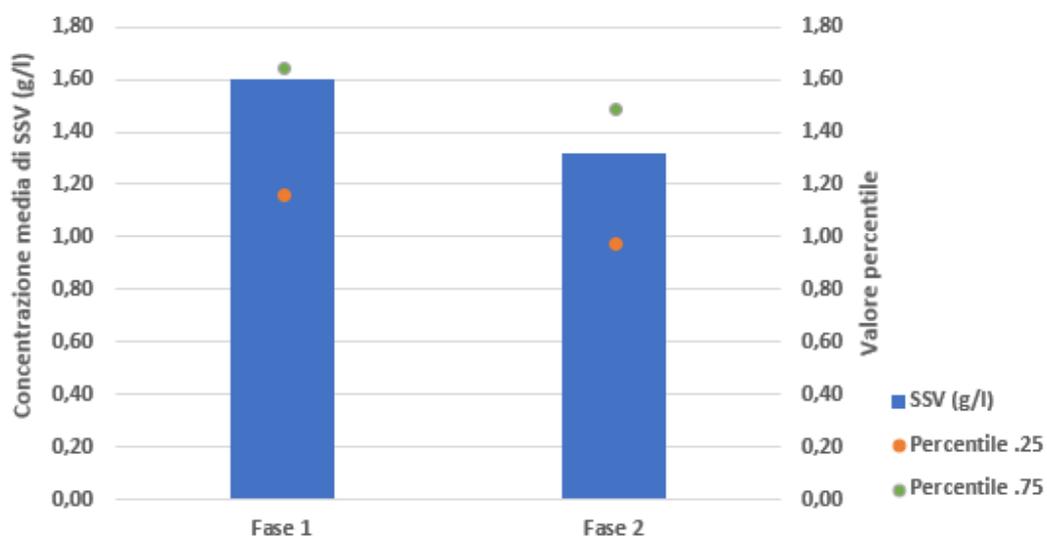


Figura 4-16 – Concentrazione media di SSV per le due fasi

Si riportano infine, nella tabella seguente, i percentili 25-75 dei parametri sopra analizzati per entrambe le fasi.

Bilanci di massa sul COD

Il bilancio di massa in termini di COD viene calcolato mediante l'equazione descritta al Capitolo 3 (paragrafo 3.8); è stato possibile effettuare questo calcolo solo in alcuni giorni in cui vi era la reperibilità dei dati sull'idrogeno.

Si ritiene accettabile un valore dell'errore percentuale tra COD in ingresso e COD uscente pari a $\pm 10\%$, calcolato come segue:

$$Errore = (COD_{in} - COD_{out, tot}) / COD_{in}$$

In generale, i bilanci di massa risultano buoni per entrambe le fasi: durante la prima fase l'errore percentuale è risultato accettabile per il 90% delle misurazioni effettuate, ovvero inferiore al 10%.

Durante la seconda fase, invece, l'errore percentuale è stato rispettato per il 75% delle misurazioni effettuate.

Si riporta, nella figura 4.17, la ripartizione media del carico giornaliero di COD durante la fase 1 e la fase 2.

Le barre laterali rappresentano il carico di COD totale in ingresso (barra azzurra) e il carico di COD solubile totale uscente (in rosso), mentre le barre sovrapposte rappresentano la composizione del COD solubile in uscita (in termini di COD solubile, COD convertito in VSS e COD che va a formare idrogeno).

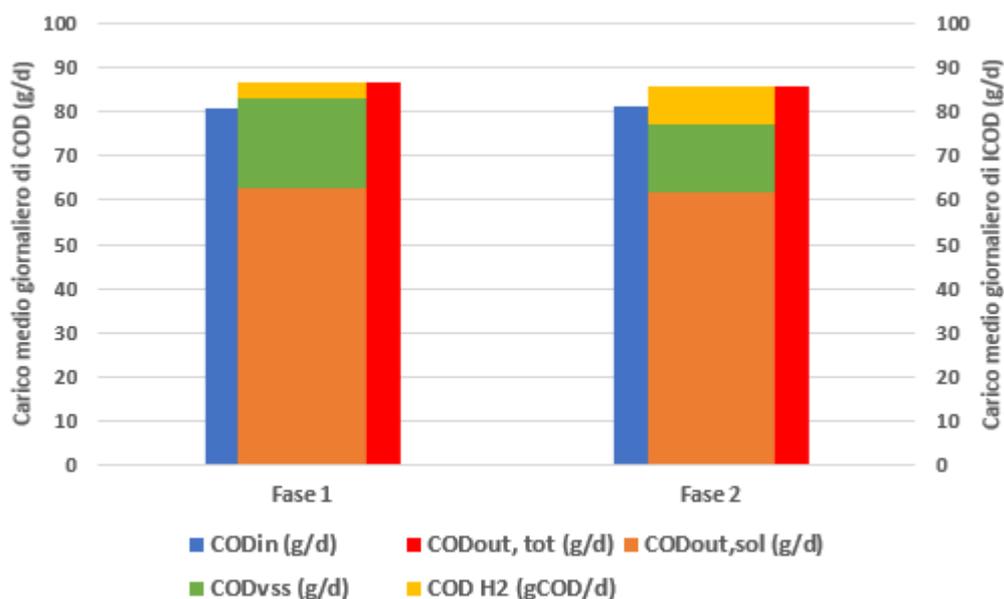


Figura 4-17 – Carico medio giornaliero di COD inerente ai bilanci di massa per la fase 1 e la fase 2

Durante la fase 1 l'errore percentuale è risultato mediamente pari al -7,49% e dunque accettabile.

Durante la fase 2 l'errore percentuale è risultato mediamente pari al -3,42% e dunque accettabile.

In entrambe le fasi gli errori medi commessi risultano accettabili e i bilanci di massa sono rispettati, non superando l'errore ammissibile pari a $\pm 10\%$.

Migliora, nel complesso, l'errore percentuale commesso, arrivando ad un valore ampiamente accettabile.

Con la seconda fase si verifica una modesta variazione della distribuzione percentuale del COD: quasi immutate le percentuali di carico di COD in ingresso e solubile uscente, si presenta invece una maggior frazione di COD associato alla componente idrogeno (con conseguente minor frazione associata ai volatili).

Si riportano dunque di seguito, nelle figure 4.18 e 4.19 rispettivamente, gli andamenti nel tempo dei bilanci di massa per le due fasi.

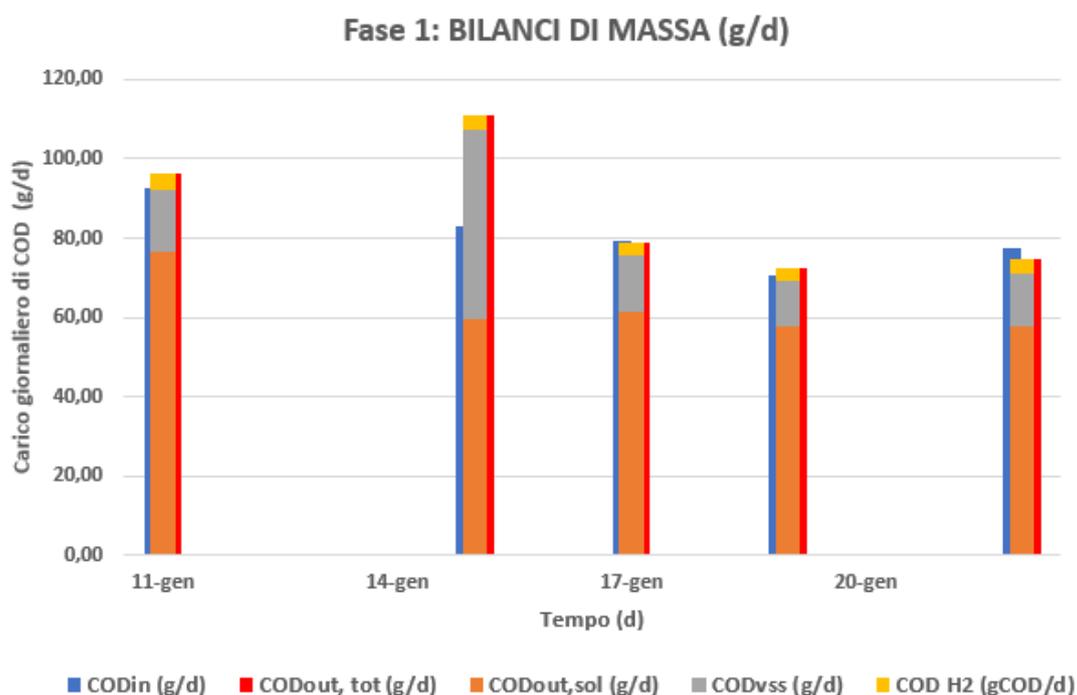


Figura 4-18 – Bilanci di massa nel tempo per la fase 1

Nelle figure:

CODin rappresenta il carico giornaliero di COD in ingresso al sistema

CODout, solubile rappresenta il carico di COD solubile uscente

COD_{vss} rappresenta il carico di COD giornaliero che viene convertito in solidi sospesi volatili

COD_{H2} rappresenta il carico giornaliero di COD che va a formare idrogeno

COD_{out, tot} rappresenta il carico complessivo di COD uscente dal sistema giornaliero (ossia la somma delle tre componenti: solubile, idrogeno, VSS)

Per ognuno dei singoli bilanci le barre laterali rappresentano le componenti di COD totale in ingresso e in uscita, mentre le colonne in pila al centro rappresentano la composizione del COD totale in uscita, in termini di COD solubile, COD convertito in solidi sospesi volatili e COD che va a formare idrogeno.

Si nota come i bilanci si chiudano bene rispettando l'errore accettabile pari a $\pm 10\%$, eccezion fatta per il secondo dei due in cui si nota una componente in uscita nettamente superiore.

Si nota anche come la differenza in altezza tra barra blu (COD in) e barra arancione scuro (COD_{out, sol}) sia molto simile all'altezza della componente COD_{VSS}, a conferma degli elevati valori di Y già prima discussi.

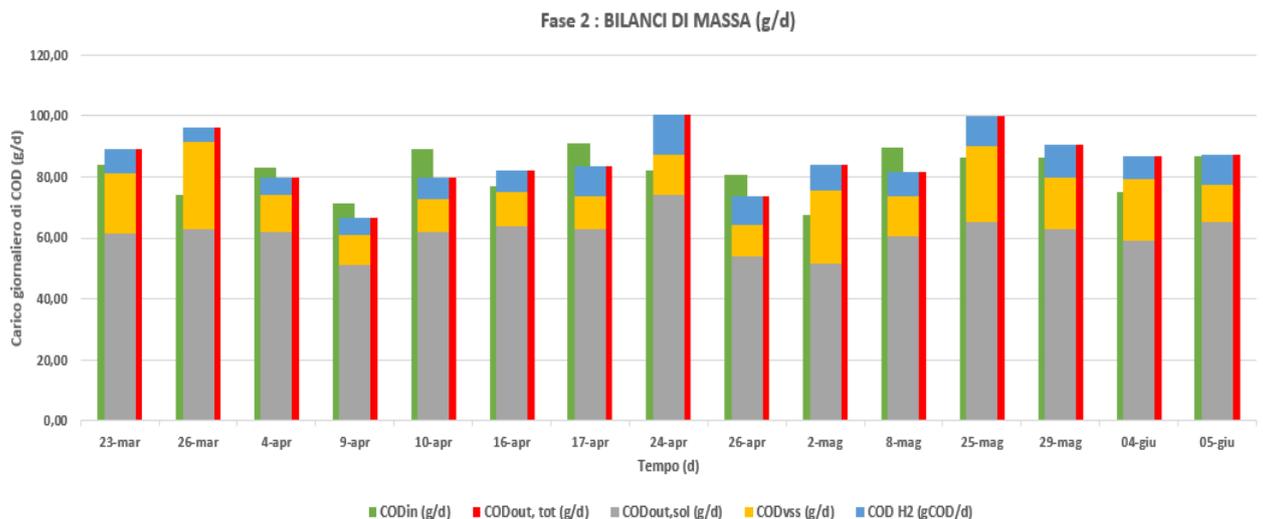


Figura 4-19 – Bilanci di massa nel tempo per la fase 2

Si nota come per la maggior parte delle misurazioni i bilanci rispettino l'errore accettabile pari a $\pm 10\%$, raggiungendo un errore prossimo allo 0% nell'ultima misurazione del 5 giugno.

VFA ed etanolo

L'andamento nel tempo della composizione dell'effluente in termini di concentrazioni equivalenti di COD (gCOD/d) viene mostrato in figura 4.20 e confrontato con la concentrazione complessiva di COD solubile uscente dal sistema.

Per tutti i campioni sono stati analizzati i VFA (Volatile Fatty Acids) e la quantità di etanolo.

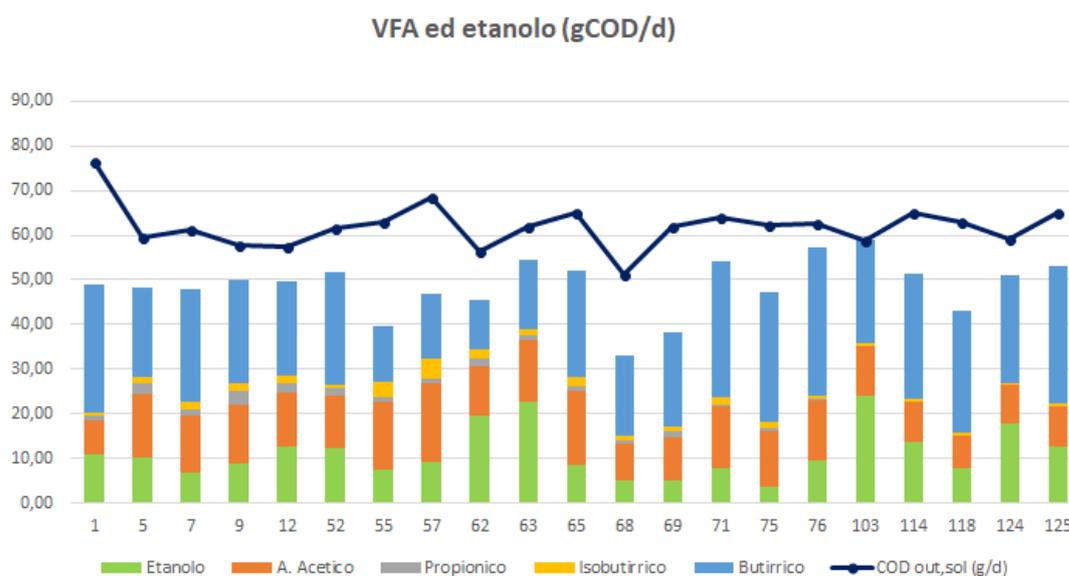


Figura 4-20 – Distribuzione temporale delle concentrazioni di VFA ed etanolo come COD equivalenti ed andamento nel tempo del COD solubile in uscita

Si evidenzia come il COD solubile in uscita non coincida mai con la concentrazione totale delle sostanze analizzate tranne che per un campione risalente al giorno 87.

Questo può essere spiegato dalla presenza di componenti non identificate all'interno del campione analizzato oppure da un'eccessiva concentrazione di lattosio, sostanza di cui non è stata effettuata alcuna misurazione nello studio.

Il rapporto tra acido butirrico ed acetico può essere utilizzato come parametro di efficienza del processo, in quanto indica la via metabolica intrapresa dalla biomassa, ed è generalmente compreso tra 0,64 e 3,6 (Hawkes et al, 2006).

Se il rapporto è inferiore a 1 il processo segue la via fermentativa dell'acido acetico, più produttiva (in termini di idrogeno) rispetto a quella dell'acido butirrico, se invece il rapporto è superiore a 1 il processo segue la via fermentativa dell'acido butirrico.

Risulta interessante osservare, tramite figura 4.21, come le rese maggiori del processo (in termini di produzione di idrogeno) si siano mostrate a partire dalla fase 2 (giorno 71 circa), ossia per un rapporto B/A in media lievemente superiore a 1 e che dunque, da letteratura, dovrebbe essere meno produttivo in termini di produzione di idrogeno rispetto ad un valore inferiore ad 1.

Nella figura seguente si mostra, di conseguenza, la correlazione tra il rapporto B/A (mol/mol) e la resa di produzione di idrogeno (in termini di molH₂/mol lattosio).

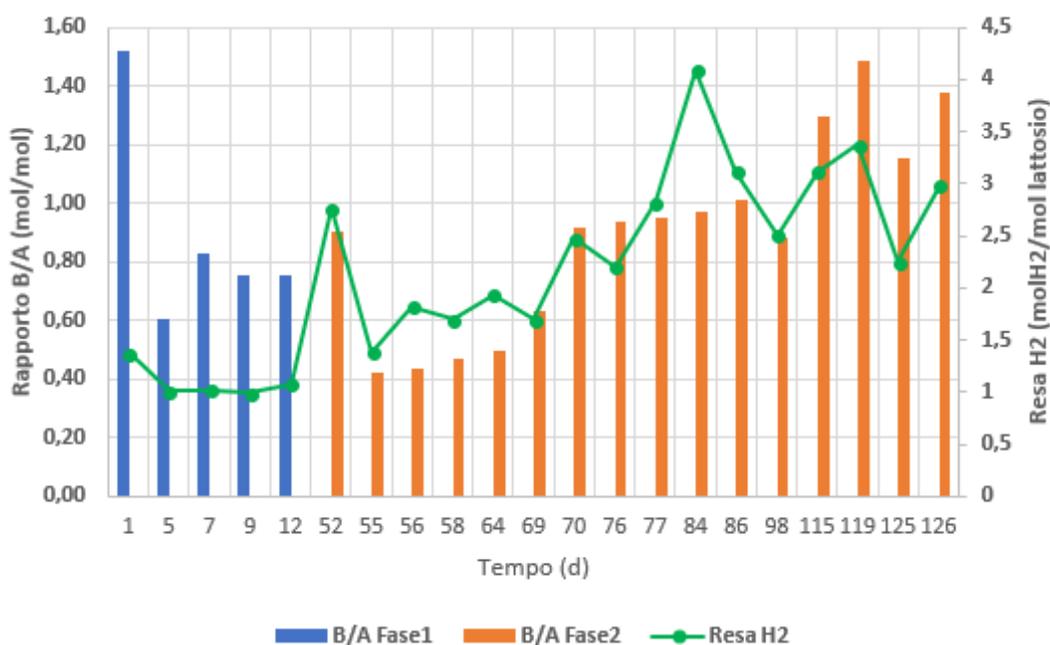


Figura 4-21 – Andamento del rapporto tra acido butirrico e acetico e resa molare di produzione idrogeno nel tempo per le due fasi

I due parametri sono suddivisi in due diversi assi ma definiti nello stesso intervallo di tempo, rappresentato dall'ascissa del grafico.

Come discusso in precedenza si nota, a partire dal giorno 70, un aumento, in parallelo, per entrambi i parametri di processo.

4.2 Discussioni

La diversa modalità di riavvio tra le due fasi e l'univoca tipologia di siero utilizzato, a condizioni operative non modificate, porta ad identificare il differente inoculo utilizzato come unica discriminante del processo.

L'aumento della quantità di biogas e della produzione di idrogeno, agli inizi costante e poi gradualmente aumentati nel tempo con l'inizio della fase 2, potrebbe essere dovuto alla necessità per la biomassa organica di avere un tempo di acclimatazione alle condizioni operative del reattore.

La resa di crescita (gSSV/gCOD) risulta pari a 0,91 nella fase 2, ossia valore per cui il COD rimosso sembra andare quasi tutto in crescita di nuova biomassa, valore di crescita non riscontrabile in letteratura per dei microrganismi di tipo anaerobico.

Questo potrebbe essere dovuto o a accumulo intracellulare o a coagulazione delle proteine ancora presenti nell'influyente con conseguente formazione di caseina.

I risultati ottenuti con la fase 2 sono confrontati al precedente studio di Yuan (2017) e risultano simili, essendo le condizioni operative le stesse.

Tabella 4-2 – Confronto con lo studio di Yuan (2017)

Parametro	Presente studio (fase 2)	Yuan (2017)
<i>Rendimento di rimozione COD (%)</i>	24±6,5	18±2
<i>Percentuale di idrogeno nel biogas (%)</i>	52±1,8	50±4
<i>Rendimento molare (molH₂/mol latt)</i>	2,51±0,7	2,5±0,85
<i>Concentrazione VSS (g/l)</i>	1,32±0,44	0,86±0,14

I valori di Yuan (2017) sono stati confrontati alla fase 2 dello studio, in quanto concerne ai migliori risultati ottenuti nel presente studio.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

L'attività sperimentale condotta ha permesso di indagare il processo di fermentazione biologica del siero di latte per la produzione di idrogeno ed avere nuovi elementi conoscitivi per comprendere ed ottimizzare meglio il processo.

Gli esperimenti sono stati condotti su impianto pilota in reattore completamente miscelato (CSTR) alla temperatura di 36°C, pH mantenuto costante e pari a 5.5 mediante dosaggio automatico di soda (3M) con HRT pari a 9 ore.

L'attività sperimentale è stata rivolta al monitoraggio delle performance del reattore e della produzione di bioidrogeno mantenendo costanti le condizioni operative ma suddivisa in due fasi, la fase 1 e la fase 2.

La differenza tra le due fasi riguarda la composizione dell'inoculo di partenza, composto da acqua e siero di latte nella fase 1 e composto da biomassa organica già acclimatata nella fase 2.

Per la fase 1 si sono riscontrate produzioni orarie di biogas mediamente pari a 0,5 NLH₂/h ed una percentuale media di idrogeno pari al 45%, ma il suo andamento sembrava seguire un trend decrescente verso valori leggermente inferiori.

La resa molare è risultata mediamente pari a 1,16 molH₂/mol lattosio e i bilanci di massa rispettano l'errore accettabile pari a ±10%.

Il reattore è stato poi riavviato, dando l'avvio alla fase 2, in cui le produzioni sono nettamente migliorate.

La produzione giornaliera di biogas è risultata mediamente pari a 0,98 NLH₂/h con una percentuale media di idrogeno pari al 51%, con un trend costante e stabilizzato sui valori elencati.

La resa molare è risultata mediamente pari a 2,51 molH₂/mol lattosio per la fase 2, con picchi superiori alle 3 molH₂/mol lattosio, e i bilanci di massa rispettano l'errore accettabile pari a ±10%, arrivando ad un errore prossimo allo 0% nelle ultime misurazioni effettuate.

L'aspetto di maggior rilievo riscontrato lungo il processo riguarda la presenza di valori della resa di crescita Y molto alti, dell'ordine di 0,9 gCOD/gCODrim.

Questi valori sono ben superiori di quelli tipici dei processi anaerobici.

L'ipotesi di coagulazione batterica ha portato a ricalcolare la resa di crescita cellulare, diminuita di un fattore prossimo al 20% ma pari ad un valore ancora troppo alto per quello che ci si aspetta da letteratura per dei microrganismi anaerobici.

Un aspetto importante per chiarire questa anomalia riguarda la caratterizzazione della biomassa all'interno del siero di latte, che potrebbe essere utilizzata per identificare la presenza o meno di microrganismi inibenti o competitivi nei confronti dei batteri idrogeno produttori, nonché possibili coagulazioni tra i batteri a livello microscopico che potrebbero essere responsabili di una resa di crescita così alta.

Riferimenti bibliografici

- Arooj, M. F., Han, S., Kim, S., Kim, D., & Shin, H. (2008).** *Effect of HRT on ASBR converting starch into biological hydrogen*
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., & Margaritis, A. (2009).** *Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production*
- Bastidas-Oyanedel, J., Schmidt, J., Bonk, F., & Thomsen, M. (2015).** *Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio)chemical industry*
- Bundhoo, M. A. Z., Mohee, R., & Hassan, M. A. (2015).** *Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review*
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013).** *Cheese whey wastewater: Characterization and treatment*
- Dinamarca, C., & Bakke, R. (2009).** *Apparent hydrogen consumption in acid reactors: observations and implications*
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., et al. (2015).** *A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products*
- Gratarola P., (2016).** *Produzione di bioidrogeno da siero di latte ultrafiltrato in reattore CSTR mediante dark fermentation*
- Gugliandolo M., (2018).** *Produzione continua di idrogeno tramite dark fermentation di siero di latte – Indagine sperimentale per l’ottimizzazione del processo*

- Hallenbeck P. C., Benemann J. R., (2002).** *Biological hydrogen production; Fundamentals and limiting processes*
- Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. (2007).** *Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress*
- Karadag D., Puhakka J.A., (2010).** *Enhancement of anaerobic hydrogen production by iron and nickel*
- Kim, S., Han, S., & Shin, H. (2006).** *Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter*
- Lee, D., Show, K., & Su, A. (2011).** *Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture*
- Li C., Fang, H.H.P., (2007).** *Fermentative Hydrogen Production from Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures*
- Lin, CY, Chang, RC (2004).** *Fermentative hydrogen production at ambient temperature*
- Lin, CY, Shei, S-H. (2008).** *Heavy metal effects on fermentative hydrogen production using natural mixed microflora.*
- Noike T., (2002).** *Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria*
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012).** *Cheese whey management: A review*
- Ren, N., Xing, D., Rittmann, B.E., Zhao, L., Xie, T. & Zhao, X. (2007).** *Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production*

- Saady, N. M. C. (2013).** *Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge*
- Sacchi D., (2015).** *Produzione continua di idrogeno da siero di latte ultrafiltrato in reattore MBR*
- Shaterzadeh, M.J. & Ataei, S. (2017).** *The effects of temperature, initial pH, and glucose concentration on biohydrogen production from Clostridium acetobutylicum*
- Sikora, A., Blaszczyk, M., Jurkowski, M., & Zielenkiewicz, U. (2013).** *Lactic acid bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence?*
- Speece R.E. (1996).** *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters.*
- Tapia-Venegas E., Ramirez-Morales J.E., Silva-Illanes F., Toledo-Alarcón J., Paillet F., Escudie R., Chyi-How Lay, Chen-Yeon Chu, Leu H., Marone A., Chiu-Yue Lin, Dong-Hoon Kim, Trably E., Ruiz-Filippi G., (2015).** *Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system*
- Valdez-Vazquez, I., & Poggi-Varaldo, H. M. (2009).** *Hydrogen production by fermentative consortia*
- Van Ginkel S, Logan BE(2005).** *Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids*
- Waligorska, M. (2012)** *Fermentative hydrogen production process design and bioreactors*
- Wang J., Wan W., (2009).** *Factors influencing fermentative hydrogen production: A review*
- Yuan (2017).** *Biohydrogen production from cheese whey by dark fermentation*

