

POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Civile, Ambientale e Territoriale

Corso di laurea in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio



POLITECNICO
MILANO 1863

**INDAGINE SPERIMENTALE PER L'OTTIMIZZAZIONE DELLA
PRODUZIONE IN CONTINUO DI BIOH₂ VIA DARK FERMENTATION
DEL SIERO DI LATTE**

Relatore: Prof.ssa Francesca MALPEI

Correlatori: Dott.ssa Mariacristina GUGLIANDOLO

Dott.ssa Micol BELLUCCI

Tesi di Laurea di:

Cesare MASCHERONI

Matr. N. 897572

Anno Accademico 2018 - 2019

Sintesi

Lo scopo della seguente tesi è lo studio del processo biologico di dark fermentation finalizzato alla produzione di bioH_2 , mirato all'ottimizzazione del processo e delle rese di produzione. Il processo è stato condotto in un reattore completamente miscelato (CSTR) del volume di 10 litri operante a HRT di 9 ore e pH pari a 5,5. La temperatura è stata variata nel corso della sperimentazione (36 °C e 50 °C) per individuare quella ottimale. Nel corso della sperimentazione si è osservata, in alcuni casi, la formazione di granuli. In condizioni mesofile e assenza di granuli le rese di produzione sono state mediamente pari a 3,5 moli H_2 /moli lattosio per il periodo 1 e 1,6 moli H_2 /moli lattosio per il periodo 3 (periodi aventi le stesse condizioni operative); la produzione di biogas tra 0,8 e 1,4 NL/h e tra 0,5 e 1 NL/h rispettivamente. Il periodo 2 caratterizzato, rispetto al primo e al terzo, dalla presenza di granuli nel reattore ha presentato rese medie di 1 moli H_2 /moli lattosio e produzioni di biogas tra 0,3 e 0,7 NL/h. La variazione di temperatura del quarto periodo invece aveva come obiettivo la valutazione delle variazioni di produzione e di crescita batterica; il passaggio alle condizioni termofile ha determinato una forte riduzione sia delle rese di produzione di idrogeno, sempre inferiori a 0,2 moli H_2 /moli lattosio, sia della produzione di biogas, inferiore a 0,1 NL/h.

Indice dei contenuti

SINTESI	3
INDICE DEI CONTENUTI	5
INDICE DELLE FIGURE	8
INDICE DELLE TABELLE	10
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	11
1.1 Obiettivi.....	11
CAPITOLO 2 STATO DELL'ARTE	13
2.1 Digestione anaerobica.....	13
2.2 Dark fermentation.....	16
2.3 Dark fermentation del glucosio.....	17
2.3.1 Reazioni di produzione di idrogeno.....	19
2.3.2 Processi di consumo di idrogeno.....	22
Metanogenesi.....	22
Omoacetogenesi.....	26
Produzione di acido lattico.....	27
Acetogenesi e solventogenesi.....	28
2.3.3 Parametri di processo.....	29
Temperatura.....	29
pH.....	30
HRT.....	30

Substrato.....	31
Carico organico ed effetto della concentrazione.....	32
Nutrienti.....	33
Pressione parziale dell'idrogeno.....	34
2.4 Siero di latte.....	35
2.5 Dark fermentation di siero di latte.....	39
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI.....	41
3.1 Introduzione.....	41
3.2 Materiali.....	42
3.2.1 Impianto pilota.....	42
3.2.2 Matrici liquide.....	44
Siero di latte e alimento.....	44
3.3 Metodi.....	47
3.3.1 Piano sperimentale.....	47
3.3.2 Analisi e misure.....	50
3.3.3 Elaborazioni dei dati.....	53
CAPITOLO 4 RISULTATI.....	57
4.1 Periodo 1.....	58
4.1.1 Risultati e discussione.....	58
4.2 Periodo 2.....	67
4.2.1 Risultati e discussione.....	67
4.3 Periodo 3.....	75
4.3.1 Risultati e discussione.....	75

4.4	Periodo 4.....	83
4.4.1	Risultati e discussione.....	83
4.5	Confronto tra periodi.....	90
CAPITOLO 5	CONCLUSIONI.....	99
CAPITOLO 6	BIBLIOGRAFIA.....	101

Indice delle figure

Figura 2.1 Processo di digestione anaerobica (Cata Saady et al., 2013)

Figura 2.2 Processo di dark fermentation (Ghimire et al., 2015)

Figura 2.3 Dark fermentation del glucosio (Tapia Venegas et al., 2015)

Figura 2.4 Dark fermentation del lattosio (Napoli et al., 2011)

Figura 2.5 Effetto dei pretrattamenti sulla produzione di idrogeno (Kan et al., 2013)

Figura 2.6 Effetto dell'aggiunta di acido lattico sulla produzione cumulativa di idrogeno (Baghchehsaraee et al., 2008)

Figura 2.7 Composizione siero di latte (Prazeres et al., 2012)

Figura 3.1 Impianto pilota e principali componenti

Figura 3.2 Schema funzionale dell'impianto pilota

Figura 3.3 Processo di formazione del siero di latte permeato concentrato

Figura 3.4 Curva di pressione nel reattore

Figura 4.1 Produzioni di biogas e di idrogeno periodo 1

Figura 4.2 Composizione del biogas periodo 1

Figura 4.3 Produzione di idrogeno e percentuale di rimozione del COD periodo 1

Figura 4.4 Resa di produzione di idrogeno del periodo 1

Figura 4.5 Concentrazioni SSV nel periodo 1

Figura 4.6 Correlazione COD rimosso cumulato e SSV cumulati nel periodo 1

Figura 4.7 Bilancio di massa del COD periodo 1

Figura 4.8 Concentrazione del COD solubile effluente

Figura 4.9 Produzioni di biogas e di idrogeno periodo 2

Figura 4.10 Composizione biogas periodo 2

Figura 4.11 Produzione di idrogeno e percentuale di rimozione del COD periodo 2

Figura 4.12 Resa di produzione di idrogeno del periodo 2

Figura 4.13 Concentrazioni SSV nel periodo 2

Figura 4.14 Correlazione COD cumulato rimosso e SSV cumulati nel periodo 2

Figura 4.15 Bilancio di massa del periodo 2

Figura 4.16 Composizione COD solubile effluente periodo 2

Figura 4.17 Produzione di biogas periodo 3

Figura 4.18 Composizione del biogas periodo 3

Figura 4.19 Produzione di idrogeno ed efficienza di rimozione del COD periodo 3

Figura 4.20 Rese di produzione di idrogeno del periodo 3

Figura 4.21 Concentrazioni SSV nel periodo 3

Figura 4.22 Correlazione COD cumulato rimosso e SSV cumulati nel periodo 3

Figura 4.23 Composizione del COD effluente periodo 3

Figura 4.24 Composizione COD solubile effluente periodo 3

Figura 4.25 Produzioni di biogas e di idrogeno periodo 4

Figura 4.26 Composizione del biogas periodo 4

Figura 4.27 Produzione di idrogeno ed efficienza di degradazione del COD periodo 4

Figura 4.28 Resa di produzione di idrogeno del periodo 4

Figura 4.29 Concentrazioni SSV nel periodo 4

Figura 4.30 Correlazione COD cumulato rimosso e SSV cumulati nel periodo 4

Figura 4.31 Bilancio di massa del COD del periodo 4

Figura 4.32 Composizione COD solubile effluente periodo 4

Figura 4.33 Produzioni medie di biogas

Figura 4.34 Produzioni medie di idrogeno

Figura 4.35 Composizione media del COD effluente

Figura 4.36 Concentrazione media COD influente ed effluente e relativa rimozione

Figura 4.37 Valori medi per rese di rimozione e tassi di crescita cellulare

Figura 4.38 Bilanci di massa nel tempo dell'intero periodo di studio

Figura 4.39 Composizione del COD solubile effluente

Figura 4.40 Rapporto butirrico/acetico nel tempo

Indice delle tabelle

- Tabella 2.1 Principali reazioni biochimiche da fermentazione del glucosio
- Tabella 2.2 Principali reazioni biochimiche da fermentazione del lattosio (Yuan 2017)
- Tabella 2.3 Interventi finalizzati ad inibire la metanogenesi
- Tabella 2.4 Concentrazioni medie siero di latte
- Tabella 2.5 Fermentazione del siero di latte in reattori in continuo (Yuan 2017)
- Tabella 2.6 Fermentazione del siero di latte in reattori Batch (Yuan 2017)
- Tabella 2.7 Riassunto delle sperimentazioni di dark fermentation condotte con siero di latte (CW), siero di latte diluito (CWD) e siero di latte in polvere (CWP); %DS è la percentuale di degradazione del substrato
- Tabella 3.1 Caratteristiche siero di latte (Ghaly e Kamal 2004)
- Tabella 3.2 Composizione 8 litri di alimento rappresentativi di 24h di funzionamento del reattore
- Tabella 3.3 Composizione percentuale alimento di partenza
- Tabella 3.4 Caratteristiche soluzione 1 di micronutrienti
- Tabella 3.5 Caratteristiche soluzione 2 di micronutrienti
- Tabella 3.6 Condizioni operative del reattore
- Tabella 3.7 Misurazioni effettuate e relative frequenze
- Tabella 3.8 Condizioni operative dei quattro periodi
- Tabella 3.9 COD equivalenti per la verifica del bilancio di massa
- Tabella 4.1 Rese di produzione di idrogeno in termofilia
- Tabella 4.2 Concentrazione lattosio influente ed effluente
- Tabella 4.3 Composizione percentuale del biogas prodotto

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

Il seguente elaborato si occupa della produzione di bioH₂ tramite il processo di dark fermentation, usando come substrato per la crescita batterica il siero di latte precedentemente deproteinizzato tramite ultrafiltrazione in modo tale da ottenere un prodotto costituito principalmente da lattosio. Lo studio è stato condotto a scala di laboratorio su impianto pilota, presso il Laboratorio di Ingegneria Ambientale (LIA), ed il processo biologico sviluppato in un reattore completamente miscelato (CSTR).

Tale processo è stato oggetto di lavori precedenti nell'ambito del LIA (Sacchi (2015), Gratarola (2016), Yuan e Luongo (2017), Gugliandolo (2018), Zappulla (2019)) e del progetto di ricerca ECO-SI (Energia e Componenti di pregio da Siero di latte), è finalizzato allo sviluppo di un impianto pilota per la valorizzazione del siero di latte, quale sottoprodotto dell'industria casearia e prodotto dalla cooperativa PLAC (Produttori Latte Associati Cremona).

L'utilizzo del siero di latte permette di ottenerne una sua valorizzazione, che presenta un duplice interesse: uno di carattere energetico, in quanto la produzione di biocombustibili, e in particolare bioH₂, si annovera tra le tecniche di produzione di energia rinnovabile. Inoltre, essendo l'idrogeno un vettore energetico, risulta essere una delle principali alternative ai combustibili fossili; l'altro di carattere ambientale dovuto ai problemi di inquinamento causabili in caso di sversamento diretto del siero per il suo elevato contenuto di sostanza organica.

Lo sviluppo di processi con produzione di energia pulita è orientato alla ricerca di nuovi percorsi e tecnologie che svincolino la produzione stessa dai combustibili fossili, il cui utilizzo ha determinato un ingente rilascio di gas serra, in particolare anidride carbonica (CO₂), con conseguenti problemi legati ai cambiamenti climatici.

1.1 Obiettivi

I lavori precedenti già citati hanno determinato produzioni di biogas tra 0,4 e 1,2 NLbiogas/h con percentuali di idrogeno tra il 45 e il 55% (Gugliandolo (2018), Zappulla (2019)) e tra il 15 e il 35% (Tugui (2017)). Le rimozioni del COD sono oscillate tra il 15 e 30% per i primi due studi mentre superiori quelle nello studio di Tugui e comprese tra 20 e il 40%; le concentrazioni dei solidi sospesi volatili invece oscillanti per tutti gli studi tra 0,9 e 1,5 gSSV/l. Le rese di produzione di idrogeno erano risultate essere comprese tra 0,9 e 3 molH₂/moli lattosio, mentre i tassi di crescita cellulari sono stati molto variabili: da valori medi di 0,08 gSSV/gCODrim (Gugliandolo 2018) si passa a valori compresi tra 0,57 e 1,7 gSSV/gCODrim nello studio di Zappulla (2019).

Le percentuali degli acidi volatili, componenti il COD effluente, sono molto diversificate: l'etanolo presenta percentuali sempre inferiori al 20% in tutti i precedenti studi; costanti intorno al 10% sono state le percentuali di acido acetico mentre la gran parte del COD solubile effluente era costituito da acido butirrico: tra il 50 e il 70% negli studi di Tugui e Zappulla e tra il 10 e il 20% nello studio di Gugliandolo.

Le principali criticità riscontrate negli studi precedenti sono state legate a chiusure dei bilanci di massa non perfette e all'ottenimento di tassi di crescita cellulari superiori a 0,15 gSSV/gCODrimosso, eccessivi per batteri che si sviluppano in ambiente anaerobico.

Lo scopo specifico della seguente tesi è l'ottimizzazione delle differenti condizioni operative dell'impianto al fine di massimizzare la produzione di idrogeno tramite dark fermentation.

Lo studio è stato suddiviso in 4 periodi: i primi tre aventi gli stessi parametri operativi (condizioni mesofile con temperatura pari a 36°C e pH 5,5), ma il secondo caratterizzato dalla presenza di granuli all'interno del reattore e l'ultimo posto in condizioni termofile, con temperatura pari a 50°C, con l'obiettivo di valutare l'andamento dei diversi parametri, in particolare la produzione di biogas e le rese di produzione, in condizioni differenti.

Il seguente elaborato è invece così strutturato: nel capitolo 2 viene riportato, dalla revisione della letteratura, lo state dell'arte, in merito ai processi biologici di digestione anaerobica prima e di dark fermentation poi con i rispettivi parametri operativi; nel capitolo 3 viene riportata la modalità di lavoro svolta all'interno del laboratorio, ovvero i materiali e i metodi dell'attività sperimentale. Nel capitolo 4 vengono riportati e discussi i risultati ottenuti dall'attività di laboratorio e dalla loro elaborazione, mentre nel capitolo 5, ovvero quello finale, le considerazioni conclusive.

CAPITOLO 2

STATO DELL'ARTE

In questo capitolo viene descritto il processo di digestione anaerobica completo, quello di sola dark fermentation ed infine vengono presentate le caratteristiche del siero di latte e del processo produttivo da cui deriva.

2.1 Digestione anaerobica

La digestione anaerobica è un processo di degradazione della sostanza organica in condizioni di anaerobiosi, ovvero in assenza di ossigeno, sia molecolare (O_2) sia legato ad altri elementi quali l'azoto nitrico (NO_3^-). Tale processo porta principalmente alla formazione, come prodotti finali, di due gas: anidride carbonica (CO_2) e metano (CH_4).

I processi anaerobici sono basati sulla presenza di diversi batteri ciascuno dei quali in grado di operare e riprodursi in assenza totale di ossigeno. I ceppi batterici coinvolti nel processo di digestione anaerobica sono molteplici: i batteri idrolitici, i batteri acidogeni, i batteri acetogeni e i batteri metanigeni responsabili, nell'ultimo passaggio della catena trofica, della produzione di biogas costituito da metano (per i 2/3 del totale) e CO_2 . Il substrato di base di ogni ceppo batterico è il prodotto finale del ceppo. Le varie fasi sono caratterizzate da cinetiche differenti le quali vanno a comporre la cinetica complessiva del processo; le ultime fasi, in particolare quella metanigena, sono le più lente e quindi quelle limitanti l'intero processo.

L'efficienza del processo dipende inoltre dalle condizioni operative, quali temperatura, pH e sostanze inibenti, ma anche dalle caratteristiche del substrato; substrati semplici rendono più rapida la prima fase della digestione anaerobica (l'idrolisi) e più lenta quella metanigena finale, mentre substrati complessi limitano l'idrolisi favorendo quella metanigena.

La digestione anaerobica è costituita da quattro fasi (Figura 2.1): idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi.

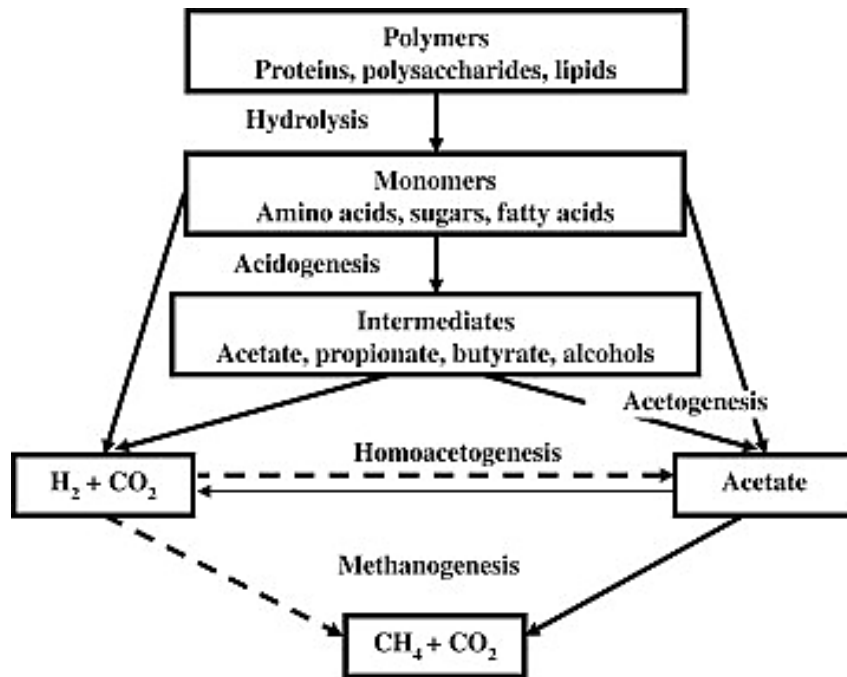


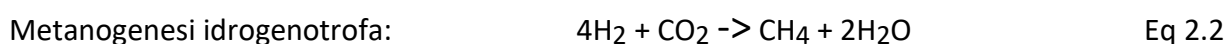
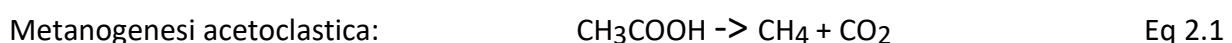
Figura 2.1 Processo di digestione anaerobica (Cata Saady et al., 2013)

L'idrolisi è la prima fase del processo che comporta la degradazione dei substrati organici complessi in composti più semplici; in particolare i polimeri quali i carboidrati vengono degradati a monomeri (monosaccaridi) mentre altri composti complessi quali proteine e grassi a composti più semplici quali amminoacidi e acidi grassi a lunga catena. I batteri idrolitici possono inoltre colonizzare e degradare il materiale particolato (Vavilin et al., 1996) oppure produrre enzimi extracellulari in grado di separare le molecole complesse in monomeri (Sanders et al., 1999).

La seconda fase è l'acidogenesi durante la quale i batteri acidogeni degradano i prodotti dell'idrolisi in acidi grassi a catena corta, detti acidi grassi volatili (propionico, butirrico, acetico e valerico), alcoli e chetoni. Durante l'acidogenesi vi è produzione di anidride carbonica e idrogeno.

La terza fase è l'acetogenesi in cui i batteri acetogeni degradano gli acidi volatili in acetato, proprionato e butirrato i quali, se sottoposti a fermentazione, comportano un'ulteriore produzione di acetato. Durante questa fase si ha un'ulteriore produzione di idrogeno e anidride carbonica.

L'ultima fase è la metanogenesi operata dai batteri metanigeni; è la fase limitante l'intero processo a causa della lentezza della crescita dei batteri e della loro sensibilità alle variazioni delle condizioni ambientali. La metanogenesi si distingue in due processi entrambi con produzione finale di metano: la metanogenesi acetoclastica (Eq 2.1) e quella idrogenotrofa (Eq 2.2). La prima è responsabile del 70% della produzione totale di metano e viene svolta dai batteri *Archea* a partire dall'acido acetico precedentemente formato, il quale viene degradato a metano e anidride carbonica; la seconda determina il restante 30% producendo metano e acqua a partire dall'idrogeno (che si ossida) e dall'anidride carbonica (che si riduce) formati nelle precedenti fasi della digestione stessa.



La metanogenesi idrogenotrofa, anche se quantitativamente inferiore, risulta essere di fondamentale importanza per l'efficienza del processo in quanto regola i quantitativi di idrogeno, il cui eventuale accumulo diventa un inibente della completezza del processo arrestandolo alla fase acidogena, con accumulo di acidi volatili e abbassamento del pH dai valori ottimali.

La digestione anaerobica è un processo, la cui ottimizzazione in termini di produzione di biogas, richiede il controllo di una serie di parametri fondamentali per far operare i batteri in condizioni ottimali. I principali parametri da cui dipende l'efficienza del processo sono temperatura e pH, la cui costanza risulta essere fondamentale per il corretto svolgimento delle reazioni.

La temperatura svolge un ruolo fondamentale nella digestione anaerobica in quanto influenza l'attività batterica regolandone velocità di crescita e degradazione. In funzione dell'intervallo di temperatura si distinguono tre tipologie di digestione: psicrofila, tra i 4 e i 15°C, mesofilia, tra i 20 e i 40°C e termofila tra 45 e 70°C.

La differenza di temperatura condiziona le cinetiche biologiche con impatti significativi sulle due fasi maggiormente limitanti il processo (acetogenesi e metanogenesi). L'elevata temperatura, tipica della termofilia, determina cinetiche ed efficienze di processo maggiori, ma allo stesso tempo presenta svantaggi legati ad un maggior rilascio di ammoniaca libera (inibente del processo) e maggiori costi energetici. E' stato riscontrato invece che i processi di digestione anaerobica in regime mesofilo mostrano le migliori produzioni di biogas, ma in generale è possibile osservare che, all'interno dell'intervallo di temperatura ottimale, la produzione di biogas e la rimozione di substrato aumentano al crescere della temperatura (Stafford et al., 1980).

Il pH è un parametro indicativo della stabilità dell'intero processo; una sua variazione rispetto alle condizioni ottimali determina la perdita dell'equilibrio tra le diverse specie batteriche che compongono la catena trofica della digestione anaerobica. Per valori complessivi di pH compresi tra 6.5 e 7.5 il processo può essere considerato stabile. Eventuali innalzamenti del pH portano ad una riduzione dell'efficienza del processo anche a causa dello spostamento dell'equilibrio ammoniaca-ammonio verso la prima, determinandone un accumulo che funge da inibente al processo stesso. Un abbassamento del pH, dovuto ad accumulo di acidi grassi volatili o a scarsa alcalinità, determina un rallentamento o blocco della crescita dei metanigeni, con arresto del processo alla fase acetogena.

2.2 Dark fermentation

La dark fermentation (Figura 2.2) è un processo di degradazione biologica anaerobica di substrati organici, in assenza di luce e ossigeno, con produzione finale di idrogeno (H_2). Tale processo, nella realtà, produce una miscela di biogas contenente, oltre all' H_2 , CO_2 e anche minori quantità di metano (CH_4), monossido di carbonio (CO) ed idrogeno solforato (H_2S) (Alibardi e Cossu, 2006).

Con il termine dark fermentation si intende un processo anaerobico all'interno del quale si svolgono le fasi di digestione prima descritte (Capitolo 2, sotto capitolo 2.1), che producono H_2 , ma non la metanogenesi.

Nel processo di dark fermentation sono proprio la fase fermentativa e la fase acetogenica i processi che devono essere massimizzati e mantenuti in condizioni stabili per poter ricavare il massimo quantitativo di idrogeno potenzialmente producibile. Ne consegue che per massimizzare la produzione di idrogeno si deve verificare un'inibizione della fase metanigena (Hawkes et al., 2002). Per l'inibizione si sfruttano alcune caratteristiche proprie dei batteri fermentativi e dei batteri metanigeni che saranno descritte nei successivi paragrafi.

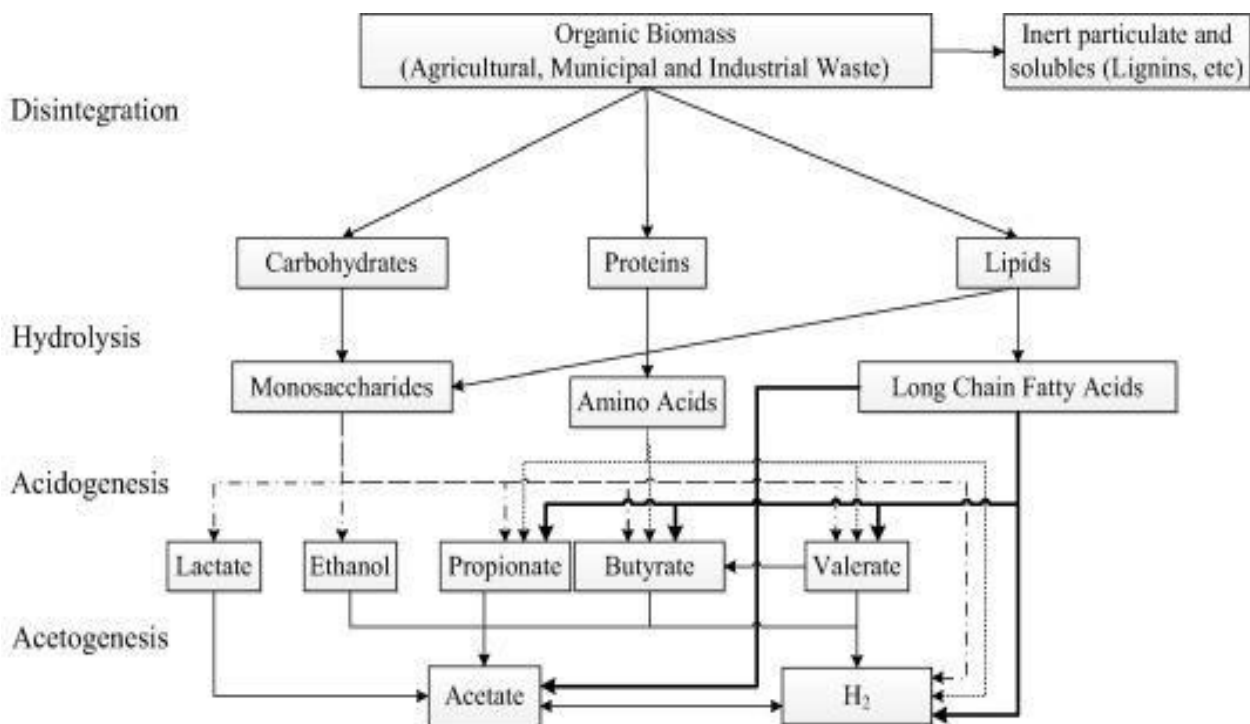


Figura 2.2 Processo di dark fermentation (Ghimire et al., 2015)

2.3 Dark fermentation del glucosio

La dark fermentation del glucosio (Figura 2.3) inizia con la degradazione del glucosio a piruvato, H⁺ e NADH (glicolisi Eq.2.3).

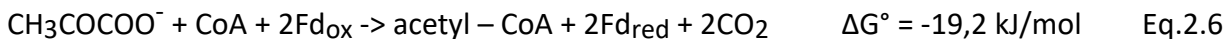


A sua volta il piruvato viene ossidato ad acetyl-CoA seguendo il Pfl pathway (pyruvate formate lyase) Eq.2.4 ed Eq.2.5 o il Pfor pathway (pyruvate ferredoxin oxido reductase) rispettivamente Eq.2.6 ed Eq.2.7. La direzione del pathway metabolico è determinata dalle condizioni ambientali del processo, che risulta essere influenzato da temperatura, pH e dalla dinamica della comunità microbica (Ziara et al., 2018).

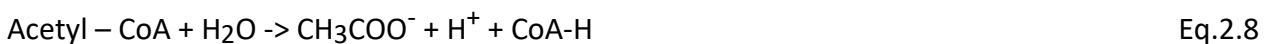
Pfl pathway:



Pfor pathway:



Tramite un sistema di fosforilazione l'acetyl-CoA può essere fosforilato per generare i principali prodotti della dark fermentation: acetato (Eq.2.8) e butirato (Eq.2.9). Quando gli acidi organici sono prodotti, la ferredoxina ridotta è in grado di trasferire elettroni all'enzima idrogenase, che consente l'utilizzo di protoni come accettori finali di elettroni. In questo modo la ferredoxina è nuovamente ossidata e l'idrogeno molecolare (H₂) viene liberato dalla cellula batterica.



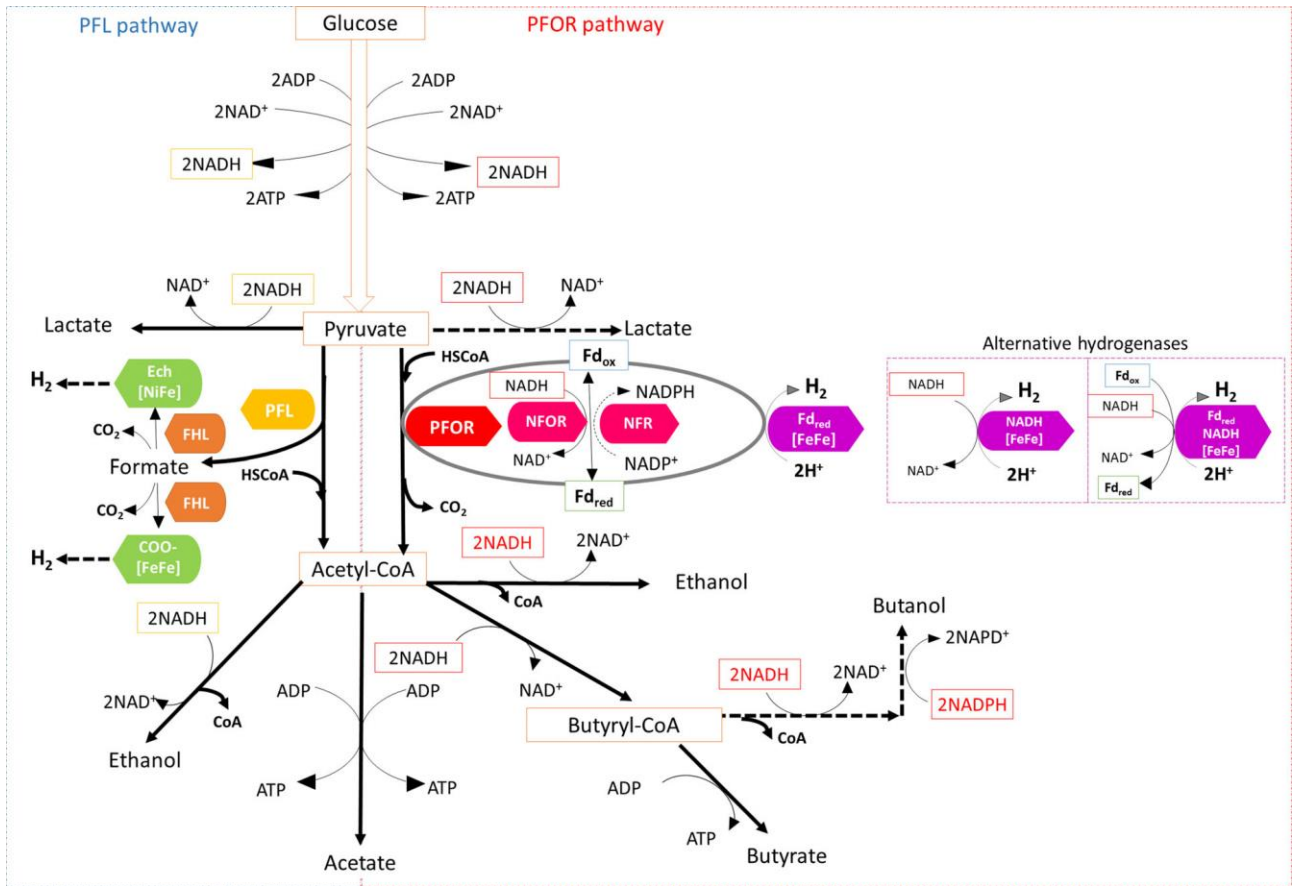
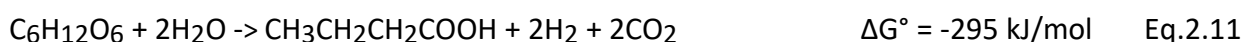


Figura 2.3 Dark fermentation del glucosio (Tapia Venegas et al., 2015)

2.3.1 Reazioni di produzione di idrogeno

Seguendo la via dell'acido acetico (Eq.2.10) la resa di produzione stechiometrica di idrogeno è pari a 4 moli di idrogeno per mole di glucosio mentre tramite butirato (Eq.2.11) di soli 2 moli di idrogeno per mole di glucosio. Realmente però le rese non superano i 2-2,4 moli di idrogeno per mole di glucosio (Levin et al., 2004) in quanto oltre a butirrico e acetico vengono prodotti altri acidi volatili come propionico, valerico, caproico, eptanoico e lattico (Fang et al., 2002).



Dalle precedenti equazioni 2.10 e 2.11 si evidenzia che la produzione di idrogeno si ottiene con la via che produce acido acetico, che però non è sempre indice di un'elevata efficacia di produzione di idrogeno in quanto la sua concentrazione può dipendere anche da un'elevata attività omoacetogenica consumatrice di idrogeno.

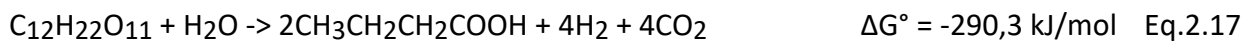
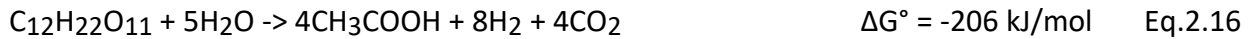
Alcune delle vie di degradazione portano comunque alla produzione di idrogeno ma con rendimenti più bassi pari a 2 moli di idrogeno per mole di glucosio, dovuti alla produzione contestuale di etanolo e acetato (Eq.2.12) (Li et al., (2007)), altre vie degradative non portano alla produzione di idrogeno ma solo lattato (Eq.2.13) o etanolo (Eq.2.14) (Khanal et al; (2003)) ed altre ancora invece comportano il consumo di parte dell'idrogeno prodotto con produzione di propionato (Eq.2.15).

Di seguito, in Tabella 2.1, vengono riportate le reazioni coinvolte nel processo di fermentazione del glucosio.

Tabella 2.1 Principali reazione biochimiche da fermentazione del glucosio

Reazione	Eq
Reazione con produzione di idrogeno:	
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2$	Eq.2.12
Reazione senza produzione di idrogeno:	
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + 2\text{CO}_2$	Eq. 2.13
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2$	Eq.2.14
Reazione con consumo di idrogeno:	
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$	Eq.2.15

Nel nostro caso il substrato di partenza della dark fermentation è il lattosio, composto da una molecola di glucosio e una di galattosio. In questo caso le reazioni che avvengono nel processo di fermentazione portano, via acido acetico (Eq.2.16), alla formazione di 8 moli di idrogeno per mole di lattosio consumata e, seguendo la via dell'acido butirrico (Eq.2.17), alla formazione di 4 moli di idrogeno per mole di lattosio consumata.



Rispetto alla teoria nella pratica le rese in termini di moli di idrogeno prodotte sono inferiori poiché alcune vie portano al consumo di idrogeno (produzione di propionato, produzione di metano da attività metanogena idrogenotrofa, produzione di acido acetico da attività omoacetogenica, rispettivamente Eq.2.18, Eq.2.19 ed Eq.2.20, Tabella 2.2) ed altre determinano un consumo del substrato, togliendolo dalla disponibilità dei batteri idrogeno-produttori, senza portare ad una effettiva produzione di idrogeno (produzione di solo lattato o di etanolo, rispettivamente Eq.2.21 ed Eq.2.22, Tabella 2.2).

Tabella 2.2 Principali reazioni biochimiche da fermentazione del lattosio (Yuan 2017)

Reazioni	Eq
Reazioni con consumo di idrogeno	
$4H_2 + C_{12}H_{22}O_{11} \rightarrow 4CH_3CH_2COOH + 3H_2O$	Eq.2.18
$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	Eq.2.19
$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$	Eq.2.20
Reazioni senza produzione di idrogeno	
$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow 4CH_3CHOHCOOH + CO_2$	Eq.2.21
$C_{12}H_{22}O_{11} + 3H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 4CO_2$	Eq.2.22

Di seguito viene riportato il processo di fermentazione del lattosio (Figura 2.4)

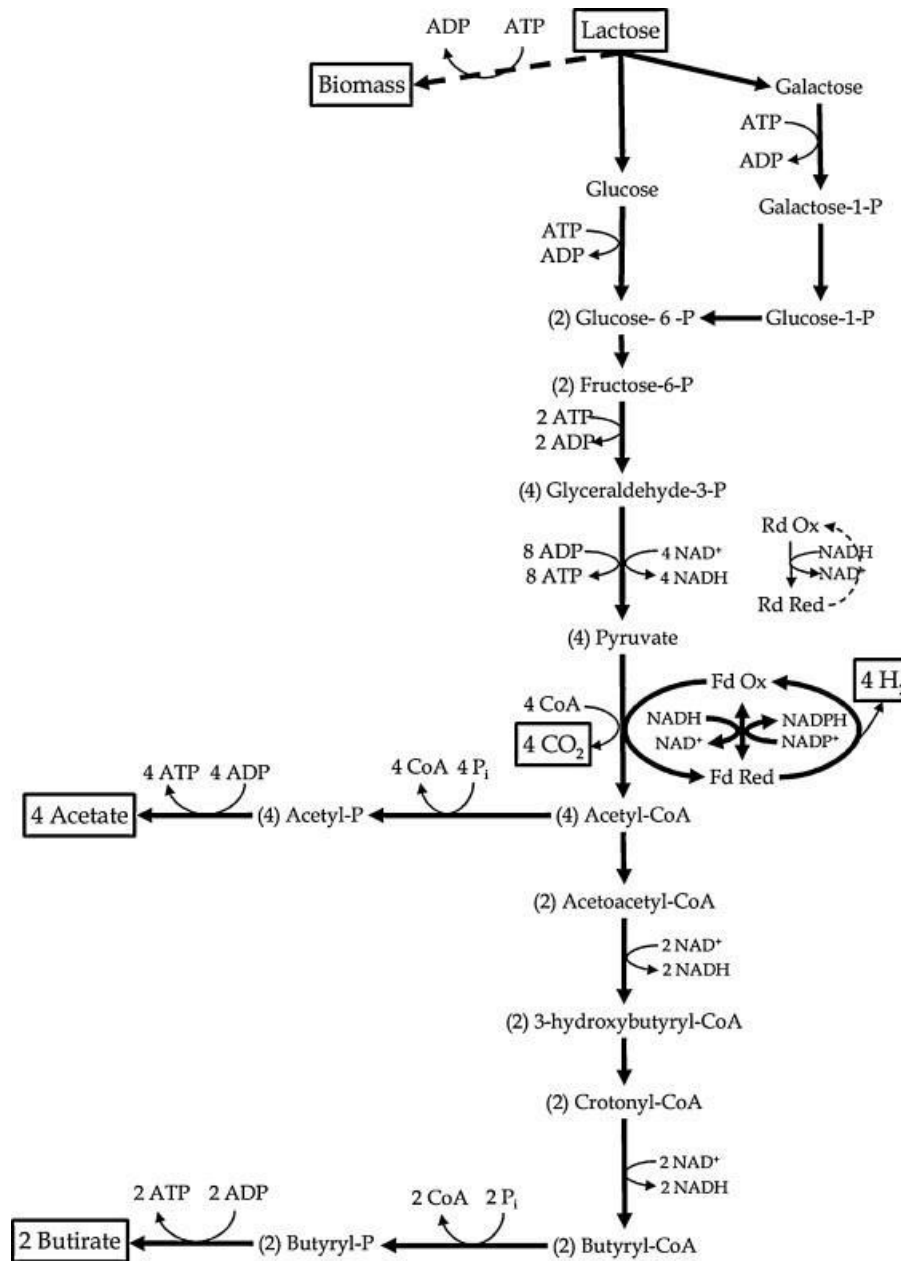


Figura 2.4 Dark fermentation del lattosio (Napoli et al., 2011)

2.3.2 Processi di consumo di idrogeno

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

I principali meccanismi coinvolti nei processi di riduzione dell'efficienza sono:

- metanogenesi idrogenotrofa dovuta ai batteri metanigeni
- omoacetogenesi dovuta ai batteri omoacetogeni
- produzione di acido lattico dovuta ai batteri lattici
- acetogenesi e solventogenesi dovuta ai solfato-riduttori

Metanogenesi idrogenotrofa

La metanogenesi idrogenotrofa risulta essere la fase a maggior consumo di idrogeno e quindi la principale regolatrice dell'efficienza della dark fermentation. È un processo che porta alla produzione di metano tramite la riduzione dell'anidride carbonica, utilizzando l'idrogeno molecolare come donatore di elettroni (Eq. 2.23), e costituisce l'ultima fase del processo di digestione anaerobica. I batteri metanigeni sono anaerobi obbligati, sono sensibili alle variazioni di pH e temperatura e sono in grado di operare in un range di pH limitato, compreso tra 6 e 8 (Van Ginkel et al., 2005)



I principali interventi per evitare il processo di produzione di metano, inibendo la metanogenesi, riguardano l'individuazione e la selezione dei valori ottimali dei parametri di processo, come pH, temperatura e HRT, le scelte relative all'inoculo del processo di fermentazione e ai pretrattamenti del substrato. In particolare, si adottano bassi valori di HRT e pH, temperature mesofile o termofile mentre il pretrattamento può essere di due tipologie: termico ad alta temperatura oppure chimico tramite l'utilizzo di sostanze inibenti.

Di seguito vengono riportati in Tabella 2.3 le principali tipologie di intervento per inibire la metanogenesi.

Tabella 2.3 Interventi finalizzati ad inibire la metanogenesi

Tipologie di interventi	Obiettivo	Azione	Durata
Pretrattamento fisico	Uccidere i metanigeni e mantenere i batteri produttori di idrogeno	Sviluppo di condizioni sfavorevoli ai metanigeni (temperatura e pH) non in grado di attuare meccanismi difensivi	Non duraturo
Pretrattamento chimico	Uccidere i metanigeni e mantenere i batteri produttori di idrogeno	Le sostanze chimiche dosate agiscono inibendo il trasferimento del gruppo metile, arrestando il processo prima della metanogenesi	Non duraturo
pH	Impedire la crescita dei metanigeni	Operare a pH acidi (< 6) permette di preservare i batteri idrogenotrofi ed inibire i metanigeni, operanti a pH > 6	Duraturo
Temperatura	Impedire lo sviluppo dei metanigeni	Agire in mesofilia (25-40°C) e termofilia (> 40°C)	Duraturo
HRT	Inibire i batteri metanigeni	Operare con bassi HRT impedisce la crescita dei batteri metanigeni, lenti a crescere, a differenza dei batteri idrogeno-produttori aventi velocità maggiori di crescita	Duraturo

La temperatura svolge un ruolo fondamentale nel processo di produzione di idrogeno in quanto agisce sulle velocità di biodegradazione, sul metabolismo batterico e sui meccanismi chimico-fisici. In relazione alla temperatura di lavoro esistono cinque tipologie di fermentazione: psicrofila (5-25°C), mesofila (25-40°C), termofila (40-65°C), termofila estrema (65-80°C) e ipertermofila (> 80°C). Adams e Mortenson (1984) hanno riscontrato un aumento della produzione specifica di idrogeno e della sua percentuale nel biogas prodotto all'aumentare della temperatura; a 55°C gli autori hanno ottenuto le produzioni migliori e la più alta percentuale di idrogeno, superiore al 60%.

L'attività dei batteri metanigeni, operando in un range di pH tra 6 e 8, risulta essere fortemente inibita per valori molto inferiori a 6, diventando altresì incapaci di crescere e produrre metano per valori di pH pari a 4,7 (Van Ginkel et al., 2005), diversamente dai batteri idrogenotrofi la cui attività è favorita per pH acidi. Valori ottimali di pH per la produzione di idrogeno sono compresi tra 5 e 6,5: in particolare è stato studiato che per ogni incremento di pH pari a 0,5 corrisponde un decremento

della produzione di idrogeno del 20% (Vasquez Valdez et al., 2009). In relazione agli acidi, la produzione di acido acetico è favorita a pH maggiori di 6,5 mentre quella di acido butirrico per pH inferiori a 6 (Fang e Liu 2002). La produzione di etanolo è massima per pH compresi tra 4,5 e 6 mentre quella di propionato è massima per pH compresi tra 5 e 6 (Hwang et al., 2004).

Anche il tempo di ritenzione idraulica risulta essere un parametro attraverso cui inibire i batteri metanigeni, favorendo l'arresto del processo ad acetogenesi: i batteri acetogeni sono caratterizzati da velocità di crescita pari a $0,083 \text{ h}^{-1}$ (Ueno et al., 1996; Chen et al., 2001), decisamente superiori rispetto a quelle dei metanigeni che invece risultano pari a $0,0167 \text{ h}^{-1}$ (Vasquez Valdez et al., 2008). La riduzione del tempo di ritenzione idraulica ha come obiettivo l'aumento delle velocità di dilavamento dei batteri: in tali condizioni si verifica un maggior dilavamento dei batteri metanigeni prima che essi possano crescere a sufficienza da produrre metano (Vasquez Valdez et al., 2009). La variabilità della produzione di idrogeno in funzione del tempo di ritenzione cellulare è stata analizzata e descritta anche da altri tre studi (Ueno et al., 1996, Lin et al., 1999; Han et al., 2004) caratterizzati da diverse tipologie di substrati e temperature: nonostante la diversità relativa alle differenti condizioni di lavoro si evidenzia una forte riduzione nella produzione di idrogeno con il ridursi dell'HRT.

Il pretrattamento termico funge da mezzo selezionatore dei batteri: in condizioni sfavorevoli determinati batteri sono in grado di sviluppare un meccanismo difensivo tramite la formazione di spore resistenti alle elevate temperature, pH acidi o alcalini. In particolare, i batteri omoacetogeni e i batteri idrogeno produttori, quali le specie *Clostridia* e *Bacillus*, sono in grado di produrre spore resistendo alle elevate temperature; al contrario i batteri lattici e metanigeni, non potendo formare meccanismi difensivi, risultano essere inibiti con temperature così elevate. Il pretrattamento termico dell'inoculo prevede un innalzamento della temperatura del substrato fino a 100°C per 15-20 minuti (Vasquez Valdez et al., 2009) in modo da eliminare tutti i batteri che non sono in grado di sopravvivere producendo spore. L'effetto del trattamento è duplice: da un lato elimina i batteri che non sono in grado di produrre spore mentre dall'altro lato seleziona le spore prodotte dai batteri idrogeno produttori che portano alla produzione di idrogeno al ripristinarsi delle condizioni favorevoli. Valori ottimali di temperatura per l'eliminazione dei batteri metanigeni risultano pari a 80°C per tempi di 3 ore (Vasquez Valdez et al., 2009).

Altri due studi relativi al pretrattamento termico sono stati condotti da Carrillo-Reyes et al. (2014a, 2014b): il primo esperimento è finalizzato a osservare la variazione della popolazione batterica nel reattore in seguito all'applicazione di differenti metodologie di riduzione della produzione di metano, mentre il secondo confronta l'effetto che diversi approcci hanno sulla riduzione ed inibizione della produzione di metano per via idrogenotrofa.

Il primo esperimento è stato condotto per un arco di tempo di 20 giorni in un reattore UASB in cui sono state costantemente monitorate le condizioni operative; il reattore è stato alimentato con siero di latte in polvere ed inoculato con fango anaerobico trattato termicamente mentre le analisi della biomassa e delle specie batteriche sono state eseguite attraverso analisi di DNA e DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Durante i 20 giorni la riduzione del pH, da 5,6 a 4,5, ha favorito lo sviluppo sia delle specie batteriche produttrici di idrogeno sia di quelle omoacetogeniche. L'aumento del carico organico, da 20 a 30 gCOD/L/d, ha invece favorito la selezione di batteri idrogeno produttori ma allo stesso tempo, il suo ulteriore aumento ha favorito la loro inibizione dovuta all'aumento della concentrazione di acidi indissociati. La produzione di metano è stata

completamente inibita solo dopo un secondo trattamento termico della biomassa, favorendo i batteri produttori di idrogeno ma anche quelli omoacetogeni.

Per il secondo esperimento è stato usato un reattore UASB alimentato con siero di latte in polvere e come inoculo un fango pretrattato termicamente. La riduzione del pH ad un valore di 4,5 ha determinato una riduzione della produzione di metano ma anche di idrogeno. L'aumento del carico organico da 20 a 30 gCOD/L/d ha permesso contemporaneamente di ridurre del 75% la produzione di metano e di incrementare del 172% quella di idrogeno. Per inibire completamente la produzione di metano è stato necessario l'applicazione di un secondo trattamento termico della biomassa presente nel reattore, ma questo metodo ha comportato il fermo dell'attività del reattore.

L'attività metanigena può essere bloccata anche tramite pretrattamento chimico utilizzando inibitori chimici come il 2-Bromoethanesulfonate (BES), l'acetilene e il cloroformio (Li e Fang., 2007), l'acido 2- Bromoethanesulfonate (BESA) e l'acido linoleico (Bundhoo et al., 2015).

Durante la fase finale della metanogenesi il gruppo metile legato dal coenzima M (CoM) viene ridotto a metano dal metil CoM reduttasi (MCR); il dosaggio di BES o BESA, simili al CoM, aiuta ad inibire il trasferimento del gruppo metile e quindi la riduzione a metano (Bundhoo et al, 2015).

Un confronto degli effetti che le diverse tipologie di pretrattamenti hanno sulla produzione di idrogeno, viene riportato nello studio di Kan (2013). Nella Figura 2.5 vengono riportati i diversi effetti dei possibili pretrattamenti: quello acido condotto a pH 3, basico a pH 10, termico, acido/termico e basico/termico. Rispetto al processo base di riferimento senza interventi (control), tutti i pretrattamenti hanno portato ad un differente aumento della produzione di idrogeno che è risultata essere massima per il semplice pretrattamento termico. Durante tutto l'arco della sperimentazione nulla è stata la produzione di metano.

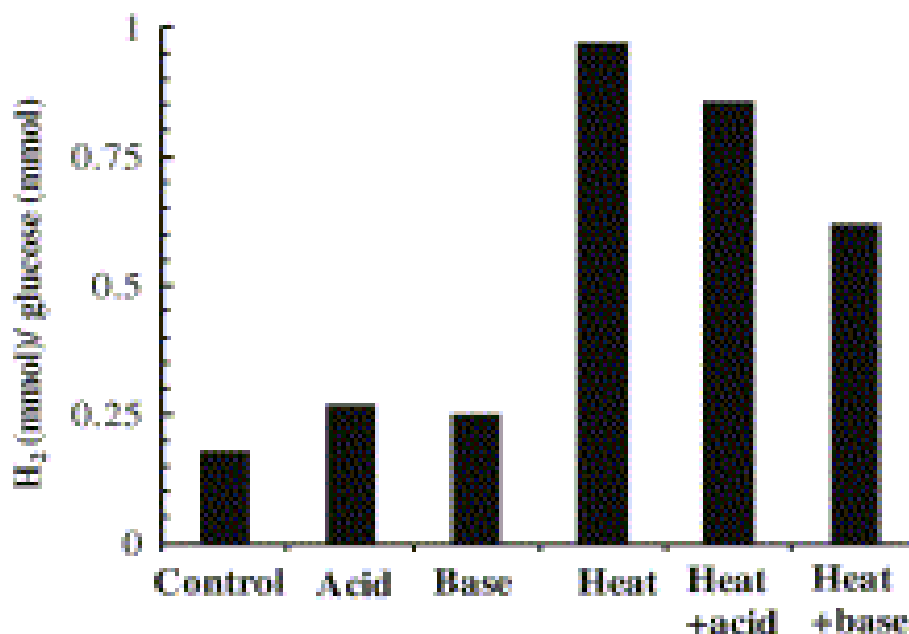


Figura 2.5 Effetto dei pretrattamenti sulla produzione di idrogeno (Kan et al., 2013)

Omoacetogenesi

L'omoacetogenesi è un processo che consiste nel consumare l'idrogeno precedentemente prodotto (Eq. 2.24).



I batteri omoacetogeni sono microrganismi strettamente anaerobi in grado di convertire ad acetato diverse tipologie di substrato inclusi idrogeno e CO₂; crescono rapidamente, hanno un metabolismo fortemente versatile (Schink et al., 1994) e a differenza degli altri batteri consumatori di idrogeno, quali lattici e metanigeni, quelli omoacetogeni non possono essere eliminati tramite trattamenti termici in quanto in grado di formare spore resistenti alle elevate temperature (Schink et al., 1997). Ai batteri omoacetogeni appartengono le seguenti specie: *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Butyrribacterium*, *Peptostreptococcus* e *Sporomusa* (Guo et al., 2006). La loro metabolica versatilità e la capacità di adattarsi a diverse tipologie di substrato li rende resistenti e forti competitori di idrogeno in qualunque ambiente anaerobico (Muller et al., 2003). La loro rimozione pertanto si basa sia sull'ottimizzazione dei parametri di processo sia tramite rimozione dell'anidride carbonica che va a costituire l'unica fonte di carbonio disponibile per produrre acetato.

Una metodologia di stima del consumo di idrogeno per via omoacetogenica è quella che lega tale parametro alla pressione parziale dell'idrogeno nello spazio di testa di un reattore (Cata Saady et al., 2013). Per un reattore con pressione nello spazio di testa pari a 1,02 bar, con percentuale di idrogeno nel biogas di 0,5% il processo di consumo di idrogeno per tale via risulta essere favorito per pressioni parziali superiori a 500 Pa.

Dinamarca et al (2011) ha condotto una serie di esperimenti finalizzati ad analizzare l'andamento della produzione di idrogeno: le sperimentazioni sono state condotte in un reattore CSTR, con temperatura di 35°C e HRT di 18 ore. I risultati di tutte le sperimentazioni sono stati analoghi: le produzioni di idrogeno dopo un picco iniziale sono diminuite costantemente fino ad annullarsi, le percentuali di idrogeno nel biogas prodotto sono passate da valori iniziali tra il 40 e il 50%, corrispondenti ad una resa di produzione tra 0,8 e 1,5 molH₂/mol glucosio, a valori finali del 2% corrispondenti a rese di produzione di idrogeno pari a 0,02 molH₂/mol glucosio. Le rese di produzione sono diventate nulle poche settimane dopo l'inizio degli esperimenti; la produzione di metano è risultata nulla simbolo dell'assenza di metanogenesi.

Produzione di acido lattico

I batteri lattici, la cui famiglia più numerosa è quella delle *Lactobacillaceae*, sono molto comuni nel processo di dark fermentation e possono inibire la resa di produzione di bioidrogeno e parzialmente (o completamente) il processo stesso di fermentazione. L'inibizione è dovuta sia alla loro spiccata attività antimicrobica, che porta alla formazione di perossido di idrogeno (Elsayed Elbeshbishya et al., 2017), sia all'acidificazione conseguente alla produzione di acido lattico (da degradazione competitiva del substrato). La fermentazione operata dai batteri lattici si distingue in fermentazione omolattica ed eterolattica: nella prima due molecole di piruvato che si sono formate tramite la glucolisi, vengono convertite in lattato; nella seconda una molecola di piruvato viene convertita in lattato mentre l'altra in etanolo e anidride carbonica.

Noike et al (2002), studiando gli effetti dell'inibizione da batteri lattici sul processo di fermentazione, registrano una forte inibizione del processo da batteri lattici causata da reazioni competitive: lo studio è stato condotto usando tre specie batteriche produttrici di idrogeno e due di acido lattico: i risultati hanno portato alla conclusione che la produzione di acido lattico 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 un effetto positivo dell'aggiunta di acido lattico che ha portato ad un aumento della produzione di idrogeno (Figura 2.6).

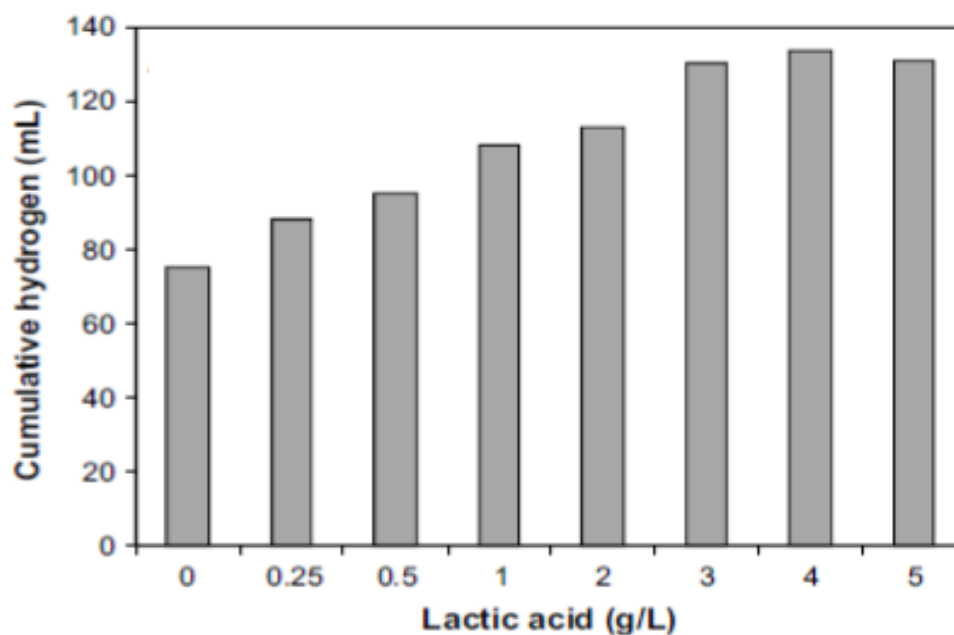


Figura 2.6 Effetto dell'aggiunta di acido lattico sulla produzione cumulativa di idrogeno (Baghchehsaraee et al., 2008)

Yang et al (2007), invece, scoprono un rapporto di proporzionalità diretta tra la produzione di idrogeno e una specifica popolazione batterica: i *Lactobacillus*. Gli autori concludono che i batteri appartenenti al genere *Lactobacillus* possano migliorare la resa di produzione di idrogeno tramite fermentazione del lattosio.

Da tale quadro si evidenzia, allo stesso tempo, una difficoltà nel definire univocamente il processo di produzione dell'acido lattico rispetto all'efficienza della dark fermentation, ma anche l'importanza di considerare le sostanze prodotte dalle diverse possibili specie di batteri lattici piuttosto che la semplice concentrazione di acido lattico.

Acetogenesi e solventogenesi

Durante la dark fermentation si originano anche sottoprodotti solubili come acidi organici (acido acetico, butirrico, propionico, lattico) e solventi come acetone o etanolo. La formazione di questi sottoprodotti è funzione diretta del percorso degradativo dei batteri, suddiviso tra acidogenesi (formazione di acidi organici) e solventogenesi (formazione di solventi), e indiretta dei parametri che regolano i processi e le fasi di degradazione batterica: pretrattamenti del substrato, valori di pH, temperatura e pressione parziale di idrogeno.

Nel caso dell'acidogenesi, gli acidi possono essere sia in forma dissociata che non dissociata ma in entrambi i casi inibenti: gli acidi dissociati, aumentando la forza ionica della miscela, causano la lisi delle cellule dei batteri idrogeno produttori, con conseguente passaggio alla solventogenesi; gli acidi non dissociati, invece, attraversando la membrana cellulare e dissociandosi a causa dell'elevato pH, determinano un aumento degli ioni H⁺ e, di conseguenza, uno squilibrio del pH tra l'interno e l'esterno della cellula che si ripercuote negativamente sull'attività dei microrganismi (Gugliandolo 2018).

Il ruolo del pH è molto importante in quanto, 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. Tramite fermentazione si generano idrogeno e acidi organici: se il pH non è adeguatamente controllato, l'accumulo di questi acidi causa una diminuzione del pH stesso rischiando di favorire la produzione di solventi e quindi il passaggio di fase alla solventogenesi, tipicamente per valori di pH inferiori o pari a 4,5 (Valdèz-Vazquez et al., 2009).

L'equazione 2.15 di Henderson Hasselbalch (Valdez-Vazquez et al., 2009) dimostra il legame pH-concentrazione di acidi organici non dissociati:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10}([\text{A}^-]/[\text{HA}]) \quad (\text{Eq. 2.15})$$

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

Da tale equazione si evince come la dipendenza aumenti per $\text{pH} < \text{pKa}$. Per evitare l'inibizione da elevata concentrazione di acidi indissociati, il pH dovrebbe assumere valori pari o superiori a 4,8, valore che corrisponde alla costante di dissociazione del butirrato (Valdez-Vazquez et al., 2009).

2.3.3 Parametri di processo

Temperatura

La temperatura è uno dei parametri più importanti della dark fermentation. L'attività batterica può essere svolta in condizioni psicrofile (5-25 °C), mesofile (5-40°C) e termofile (40-65°C): all'aumentare della temperatura aumenta anche l'attività enzimatica fino al livello ottimale, per poi diminuire in caso di eccessi ulteriori (Fabiano e 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 e Ataei, 2017). Nella fermentazione al buio, inoltre, la variazione della temperatura determina un cambiamento della comunità batterica (Bastidas et al., 2015) con il passaggio, ad esempio, dai batteri *Clostridium*, per temperature mesofile, ai *Thermoanaerobacterium* per temperature termofile (Karadag e Puhakka, 2010).

Un aumento della temperatura di processo determina inoltre un incremento sia dell'efficienza di degradazione del substrato sia della velocità con cui questa avviene: è stata infatti osservata una minor resa di idrogeno ed una minor frazione di idrogeno nel gas per temperature mesofile (Lin e Chang et al., 2004): questo può essere dovuto al fatto che i batteri termofili risultino essere meno inibiti dalla pressione parziale di idrogeno (Waligorska et al., 2012). Le temperature termofile garantiscono vantaggi legati alle migliori condizioni operative, quali la rimozione del COD influente, la velocità di crescita dei microrganismi e la possibilità di igienizzazione del materiale eliminando gli agenti patogeni (Kotsopoulos et al., 2006), ma hanno lo svantaggio di avere sia costi più elevati sia una certa instabilità di processo.

Anche Ziara et al (2018) hanno analizzato l'effetto della variazione della temperatura: gli autori hanno sperimentato due differenti temperature, 35 e 45°C, con differenti pH iniziali pari a 6,5, 7,5 e 8,5. La maggiore resa di produzione di idrogeno, pari a 0,85 mol H₂/mol lattosio consumato, è stata ottenuta alla temperatura di 45°C e con pH iniziale di 8,5. La riduzione del COD a 35°C è variata tra 21 e 30% con il massimo a pH di 8,5, mentre a 45°C la riduzione è oscillata tra 12 e 21% con il massimo ad un pH di 7,5.

pH

Il pH nel processo influisce sulla degradazione della sostanza organica dei microrganismi (quale l'enzima idrogenasi), sulla struttura delle comunità microbiche, sulle reazioni di formazione dei metaboliti e degli intermedi di reazione e quindi sui prodotti finali: questo parametro va quindi ad influire fortemente sulle rese di produzione dell'idrogeno. Valori di pH, per l'ottimizzazione della fermentazione al buio, si aggirano intorno a 5,5 (Dinamarca et al., 2011). Valori invece inferiori a 4,5 incentivano una produzione di solventi (Fang e Liu et al., 2002), come precedentemente detto.

L'influenza dei valori di pH sulle rese di processo risulta essere ancor più rilevante nel caso di processi in reattori batch: mentre nei processi in continuo il controllo sul pH può essere fatto costantemente in modo da avere valori ottimali, nei processi batch è possibile modificare univocamente il pH solo ad inizio prova (Li et al., 2008). Le conseguenti differenti rese di processo sono dovute all'insorgenza di possibili processi di acidificazione che determinano lo scadimento qualitativo dell'ambiente (inibizione acida) e il decadimento delle rese.

Tempo ritenzione idraulica (HRT)

Il tempo di ritenzione idraulico (HRT) viene definito come il tempo medio di permanenza del fluido entrante nel reattore. Questo parametro influenza fortemente la fase di idrolisi e gli intermedi generati e di conseguenza la produzione finale di idrogeno. L'HRT funge da parametro selezionatore della biomassa all'interno del reattore in quanto agisce sulle differenti velocità di crescita della biomassa idrolitica, acidogena e metanigena.

Un efficace controllo del tempo di ritenzione idraulica garantisce l'inibizione dell'attività degli organismi consumatori di idrogeno, in particolare dell'attività metanogenica: bassi valori di HRT comportano un dilavamento dei metanigeni, in quanto tali microrganismi crescono più lentamente dei produttori di idrogeno (Ghimire et al, 2015); è quindi necessario evitare di operare con HRT sia tanto bassi da causare il dilavamento della biomassa sia funzionali al grado di biodegradabilità del substrato. Il solo HRT non è in grado di bloccare l'attività metanogenica (Liu et al., 2008). I valori ottimali di HRT dipendono fortemente dalla tipologia di substrato utilizzato: nel caso del glucosio, in un reattore CSTR, un tempo di ritenzione idraulica molto basso, pari a 0,5 ore ha determinato una resa di produzione di idrogeno di 1,81 molH₂/mol glucosio (Show et al., 2007), mentre l'utilizzo del siero di latte in un reattore UASB, con HRT superiore e pari a 6 ore ha portato una resa di produzione di idrogeno ottimale di 0,36-0,38 LH₂/L/d (Carrillo-Reyes et al ., 2012).

Lin e Chang (1999), con temperatura pari a 35°C, HRT di 6 ore, pH 5,7 e utilizzando come substrato glucosio inoculato con fango anaerobico, hanno ottenuto rese di produzione pari a 1,7 molH₂/mol esosio. Risultati migliori sono stati ottenuti da Fang e Liu (2002): operando con le medesime condizioni operative relative a temperatura, HRT, pH ma utilizzando come substrato del glucosio inoculato con fango derivante da produzione di idrogeno, sono state raggiunte rese di produzioni superiori e pari a 2,1 molH₂/mol esosio. I migliori risultati in termini di rese di produzione di idrogeno

sono state ottenute da Van Ginkel e Logan (2005): con temperature di 30°C, pH 5,5, HRT di 10 ore e usando come substrato glucosio inoculato con terreno trattato termicamente, sono state ottenute rese pari a 2,5 molH₂/mol esosio.

In generale range di HRT ottimali per la produzione di bioidrogeno variano tra 6 e 12h (Bastidas et al., 2015).

Substrato

Nel processo di dark fermentation possono essere utilizzati diverse tipologie di substrati per la produzione di idrogeno. Tra le diverse tipologie di substrati, per la fermentazione al buio si trovano la frazione organica dei rifiuti municipali (Tawfik et al., 2012), rifiuti agricoli quali la biomassa lignocellulosica e reflui zootecnici (Kapdan et al., 2006). I criteri influenti nella scelta del substrato sono: contenuto di carboidrati, disponibilità e biodegradabilità. I substrati ricchi di carboidrati offrono le migliori produzioni di idrogeno, mentre quelli contenenti amminoacidi e proteine i meno adatti. Tra le diverse specie batteriche i *Clostridium* sono i più adatti alla produzione di idrogeno a partire dai carboidrati.

La frazione organica dei rifiuti municipali è particolarmente adatta per la fermentazione al buio in quanto caratterizzata da elevati contenuti di carboidrati rapidamente biodegradabili. Anche i rifiuti agricoli sono estremamente ricchi di carboidrati ma anche di materiali cellulósici limitanti il processo idrolitico: Ren et al (2006), hanno ottenuto ottime rese di idrogeno utilizzando come substrato la molassa; in condizioni mesofile (35°C) sono state raggiunte rese di produzione pari a 232 mLH₂/L/h.

Gli zuccheri semplici come glucosio, saccarosio e lattosio vengono usati per la produzione di idrogeno tramite dark fermentation a causa della loro elevata biodegradabilità (Xiao et al., 2013). Quemeneur et al. (2011), hanno studiato l'effetto di diverse tipologie di carboidrati, quali glucosio, fruttosio, saccarosio, maltosio e maltotriosio, sulle rese di produzione di idrogeno. I risultati hanno mostrato una riduzione delle rese di produzione di idrogeno all'aumentare della lunghezza della catena dei carboidrati con rese che sono passate da 1,82 ± 0,1 a 1,38 ± 0,12 molH₂/mol esosio-equivalente. Diversificate sono state anche le produzioni di acidi: acido acetico e butirrico sono risultati essere presenti usando tutte le tipologie di carboidrati con produzione pari a 290 ± 60 mol acetico/mol esosio-equivalente e 380 ± 90 mol butirrico/mol esosio-equivalente; le produzioni di acido caproico sono state comprese tra 10 e 40 mol caproico/mol esosio-equivalente ma solo usando bi e trisaccaridi. Elevate produzioni di etanolo sono state riscontrate passando dal maltotriosio mono e bisaccaride al rispettivo trisaccaride: esse sono passate da 40 ± 10 a 117,5 mol etanolo/mol esosio-equivalente.

Xiao et al (2010), hanno confrontato la produzione di idrogeno tra carboidrati e proteine, in particolare glucosio e peptone, in reattore batch a pH neutro. E' stato riscontrato come con il glucosio sia stato ottenuto il miglior rendimento di produzione di idrogeno, pari a 0,14 mL H₂/mg di glucosio, mentre attraverso le proteine quest'ultimo sia stato solo di 0,077 mL H₂/mg di proteine.

Il glucosio è risultato quindi essere il substrato migliore nonostante il rendimento ottenuto sia stato molto più basso rispetto alla resa teorica ottenibile a causa probabilmente delle condizioni operative, quale il pH neutro, non ottimali. Un'ulteriore causa delle minori produzioni è legata al sorgere, durante la fermentazione del peptone, del doppio processo di produzione e consumo di idrogeno a differenza della fermentazione del glucosio durante la quale gli autori hanno riscontrato solo il processo produttivo.

Carico organico ed effetto della concentrazione

La concentrazione gioca un ruolo fondamentale nella produzione di idrogeno: ogni tipologia di substrato è caratterizzata da valori ideali di concentrazione a cui poi corrisponde la massima resa di idrogeno ottenibile.

Kim et al (2006) hanno condotto un esperimento finalizzato alla valutazione della variazione nella produzione di idrogeno in relazione alla concentrazione di saccarosio alimentata. Lo studio è stato effettuato in un reattore CSTR, con temperatura di 35°C, miscelazione di 200 rpm, HRT di 12 ore e pH 5,4. La prima sperimentazione è stata effettuata con concentrazioni influenti di saccarosio pari a 30g COD/L: ad una prima fase di 10 giorni caratterizzata da rese di produzioni stabili e pari a 1,30 molH₂/mol esosio aggiunta, segue una seconda fase di 7 giorni in cui gli autori hanno assistito ad una forte riduzione delle produzioni di idrogeno accompagnata da una elevata variabilità nella degradazione del saccarosio e nella produzione di acidi organici. Una nuova condizione di stabilità viene raggiunta ad un mese dallo start up; in questo periodo gli autori hanno ottenuto rese di produzione di idrogeno leggermente inferiori, pari a 1,09 molH₂/mol esosio aggiunta, percentuali di idrogeno nel biogas prodotto del 62,5% ed efficienze di degradazione del saccarosio dell'88,3%. Riducendo la concentrazione in ingresso, portandola a 10g COD/L, gli autori hanno riscontrato una corrispondente riduzione delle rese di produzione di idrogeno sebbene l'efficienza di degradazione del saccarosio sia aumentata fino ad una percentuale del 97%. Raddoppiando la concentrazione del saccarosio in ingresso al reattore rispetto al valore iniziale, ovvero lavorando a 60g COD/L, gli autori hanno riscontrato, anche in questo caso, una diminuzione non solo delle percentuali e delle rese di idrogeno ma anche delle efficienze di degradazione del saccarosio.

Kyazze et al (2006) hanno riscontrato il medesimo andamento dei precedenti autori nelle rese di produzione di idrogeno al variare della concentrazione influente: passando da concentrazioni di saccarosio da 10 g/L a 50 g/L, le rese di produzione di idrogeno sono diminuite passando da valori di 1,7 ± 0,2 molH₂/mol esosio aggiunta a valori di 0,8 ± 0,1 molH₂/mol esosio aggiunta.

Un parametro correlato al substrato è l'OLR (Organic Loading Rate, misurato in [gCOD/L/d]): esso è il rapporto tra la concentrazione di substrato in ingresso e il tempo di ritenzione idraulica HRT (Eq. 2.16):

$$OLR = C_{\text{substrato,in}} / HRT \text{ (gCOD/l/d)} \quad \text{Eq 2.16}$$

La produzione di idrogeno risulta essere influenzata dal carico organico in ingresso; esso può essere aumentato riducendo l'HRT, mantenendo costante la concentrazione, oppure aumentando la concentrazione per un fissato HRT.

Van Ginkel e Logan (2005) hanno analizzato l'effetto del carico organico sulla produzione di idrogeno; passando da un carico organico di glucosio influente di 18,9 g/h ad uno di 0,5 g/h, lo studio ha evidenziato un aumento del rendimento di produzione, passato da 1,7 a 2,8 moli H₂/mole di glucosio.

Nutrienti

L'aggiunta di nutrienti, soprattutto azoto e fosforo, 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.

Nonostante l'azoto sia fondamentale per l'attività batterica è importante porre l'attenzione alle concentrazioni delle sue possibili forme, rappresentate da ammoniaca libera (NH₃) e ione ammonio (NH₄⁺): 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.

Likewise, Argun et al (2008) hanno studiato gli effetti dei rapporti C/N e C/P sulle produzioni di idrogeno: le sperimentazioni hanno determinato che le migliori produzioni, pari a 281 N mLH₂/g, sono state ottenute per rapporti C/N di 200 e C/P di 1000.

Lin e Lay (2004) hanno aumentato i tassi e le rese di produzione di idrogeno del 500% e dell'80% rispettivamente, già con un rapporto C/N di 47. O-Thong et al (2008) hanno ottenuto le migliori produzioni di idrogeno e tassi di rimozione del COD per rapporti C/N e C/P di 74 e 559 rispettivamente.

Per quanto riguarda invece i microelementi quali gli ioni metallici, elevate concentrazioni rischiano 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). Allo stesso tempo determinati metalli pesanti quali cadmio, zinco e cobalto possono inibire completamente l'attività dei batteri anaerobici. Concentrazioni invece di zinco, rame e cromo rispettivamente pari a 4.5, 6.5 e 60 mg/l, hanno portato ad una riduzione del 50% della produzione di idrogeno (Lin e Shei 2008).

Tra gli ioni metallici, la concentrazione dello ione Fe²⁺ è di primaria importanza in quanto necessario come ferredossina, coinvolta nel processo di ossidazione del piruvato ad Acetil coenzima A. Una concentrazione minima di ferro risulta fondamentale per lo sviluppo del processo e per la produzione di idrogeno, ma in concentrazioni elevate può diventare inibente, influenzando sul metabolismo e riducendo l'attività batterica (Bundhoo e Mohee 2016).

Karadag e Puhakka (2010) hanno studiato l'effetto degli ioni nichel e ferro sulla produzione di idrogeno; le sperimentazioni hanno evidenziato un aumento della produzione di idrogeno parallelamente all'aumento delle concentrazioni. I rendimenti maggiori sono stati pari a 1,13 moli H₂/mole di glucosio e a 1,40 moli H₂/mole di glucosio con concentrazioni rispettivamente di 50 mg/L di ferro e di 25 mg/L di nichel.

O-Thong et al (2008) hanno invece ottenuto le migliori produzioni di idrogeno per una concentrazione dello ione Fe²⁺ di 257 mgFe²⁺/L in condizioni termofile.

Pressione parziale dell'idrogeno

La pressione parziale di idrogeno in fase liquida è uno dei principali fattori che influenzano la produzione di idrogeno. Un'elevata pressione parziale tende ad inibire il processo in quanto il metabolismo porta alla produzione di lattato, etanolo, alanina e acetone (Levin et al., 2004), mentre la produzione aumenta al diminuire della pressione: basse pressioni facilitano infatti il trasferimento dell'idrogeno dalla fase liquida alla fase gas. Durante la fermentazione, l'idrogenasi è coinvolta nel processo di ossidazione e riduzione della ferredossina; elevate pressioni determinano alte concentrazioni di idrogeno in fase liquida creando condizioni favorevoli al processo di riduzione della ferredossina rispetto al processo di ossidazione, determinando minori produzioni di idrogeno (Ghimire et al., 2015).

Lee et al (2012) hanno studiato l'effetto della riduzione della pressione sulla produzione di idrogeno in un reattore CSTR; una riduzione della pressione ha determinato il raggiungimento di rese di produzione di idrogeno pari a 4,50 molH₂/mol saccarosio. Anche Mandal et al. (2006), hanno riscontrato un elevato aumento delle rese di produzione di idrogeno passando da una pressione parziale di 760 mm Hg a una di 380 mm Hg.

Nella digestione anaerobica la riduzione della pressione parziale di idrogeno e di anidride carbonica è effettuata dai batteri metanigeni tramite conversione a metano, mentre nella dark fermentation quest'ultima deve essere ridotta artificialmente riducendo la pressione nello spazio di testa del reattore oppure tramite diluizione con altri gas inerti (Ghimire et al., 2015).

Logan et al (2002) hanno analizzato l'influenza della riduzione della pressione sulle produzioni tramite due metodi: il primo prevedeva una riduzione della pressione a intermittenza (metodo Owen) e il secondo in continuo (metodo respirometrico). Sotto le medesime condizioni operative tramite il metodo respirometrico hanno ottenuto una produzione di idrogeno da glucosio superiore del 43%.

2.4 Siero di latte

Il siero di latte, principale sottoprodotto dell'industria casearia, è generato dalla separazione del latte dalla cagliata. Si presenta di color giallastro, costituisce il 90% del volume iniziale del latte e contiene ancora circa il 55% dei nutrienti iniziali (Siso et al., 1996). E' costituito principalmente dagli elementi solubili che non partecipano al processo di coagulazione quali proteine, lattosio, grassi, sali minerali e alcune vitamine.

Le caratteristiche del siero (Figura 2.7) variano in funzione della razza allevata, del tipo di alimentazione, della stagione in cui viene prodotto, della lattazione e del tipo di lavorazione. In funzione di quest'ultima si distinguono due tipologie di siero: uno acido con pH inferiore a 5 e uno dolce avente un pH tra 6 e 7.

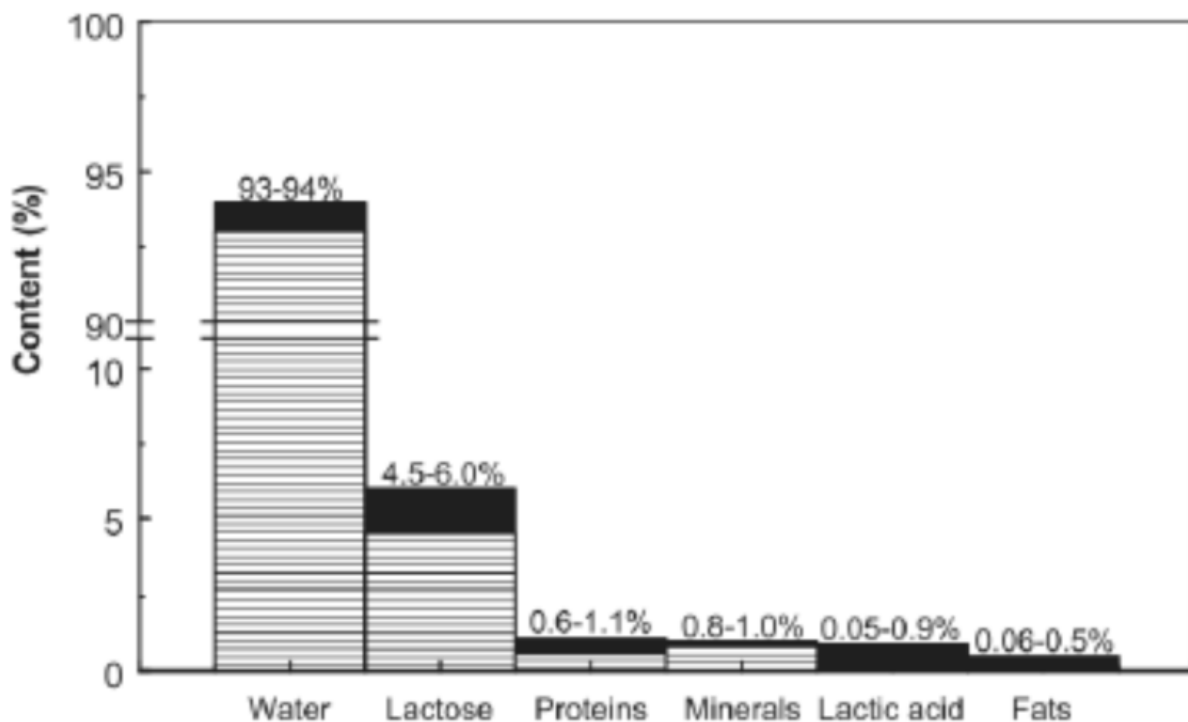


Figura 2.7 Composizione siero di latte (Prazeres et al., 2012)

Il carico organico, espresso in termini di BOD, varia tra 27 e 60 g/L mentre in termini di COD tra 50 e 102 g/L (Prazeres et al., 2012). Si hanno inoltre buoni quantitativi di sostanze quali urea, acido citrico, acido urico e vitamine del gruppo B. Le caratteristiche di natura organica e inorganica del siero determinano l'impossibilità di un suo sversamento diretto senza pretrattamenti, a causa delle possibili conseguenze ambientali quali problemi di eutrofizzazione, dovuti agli elevati contenuti di azoto e fosforo, consumi di ossigeno, tossicità (Prazeres et al., 2012) e impermeabilizzazione del suolo dovuto al suo contenuto solido.

Da tali problematiche, negli ultimi cinquant'anni, si sono sviluppate tecniche di valorizzazione del siero, raggruppabili in due categorie: i trattamenti finalizzati alla valorizzazione del contenuto energetico del siero da una parte, quale la digestione anaerobica, e quelli volti al recupero e alla valorizzazione di alcune componenti quali le siero-proteine.

Di seguito viene dapprima riportata una tabella con le caratteristiche in termini di concentrazioni medie del siero di latte (Tabella 2.4) e poi, dallo studio di Yuan (2017), due tabelle relative agli studi di fermentazione biologica del siero di latte in reattori in continuo (Tabella 2.5) e in reattori batch (Tabella 2.6).

Tabella 2.4 Concentrazioni medie siero di latte

pH	Lattosio (g/L)	Proteine (g/L)	Lipidi (g/L)	BOD5 (g/L)	COD (g/L)	SST (g/L)	TKN (g/L)	N-NH4 ⁺ (mg/L)	Studio
7,0 ± 2,0	-	-	-	0,9 ± 0,31	1,62 ± 0,56	0,26 ± 0,18	0,11 ± 0,08	8,5 ± 6,3	Fang et al., 1991
5,92	44,37 ± 0,88	9,06	-	-	71,41	-	1,61 ± 0,11	161 ± 1	Yang et al., 2003
-	16,35 ± 0,71	1,88 ± 0,08	-	-	19,73 ± 0,62	1,12 ± 0,07	0,34 ± 0,02	-	Lee et al., 2006
4,9 ± 0,3	45,9 ± 0,88	2,71 ± 0,05	9,44 ± 1,14	37,7 ± 2,8	68,6 ± 3,3	1,35 ± 0,06	1,12 ± 0,01	-	Saddoud et al., 2007)
4,0-4,6	0,178-0,182	(938-947) *10 ⁻⁶	1,83-3,76	10-12,5	8,8-25,6	1,6-4,8	0,31-0,36	52-71	Rivas et al., 2010

Tabella 2.5 Fermentazione del siero di latte in reattori in continuo (Yuan 2017)

Substrato (g COD/L)	Inoculo	Tipo Reattore	T (°C)	pH	OLR (g COD/L/d)	HRT (h)	Rendimento molare (mole H ₂ /mole lattosio)	Studio
CW grezzo	Fango anaerobico riscaldato	CSTR	55	5,5	21;35;45	24;48;84	1,86-13,62	Azbar et al (2009c)
CW grezzo	Fango anaerobico riscaldato	CSTR	55	5,5	30	24	1,8-5,1	Azbar and Cetinkaya Dokgoz (2010)
CW in polvere	Fango anaerobico riscaldato	CSTR	37	5,9	95-163	3,5-6	1,13-2,82	Cota-Navarro et al (2011)
CW in polvere	Fango anaerobico riscaldato	CSTR	37	5,9	92,4-184,4	4;6;10	1,0-2,8	Davila-Vazquez et al (2009)
CW grezzo	Indigeno	CSTR	35	5,2	61	24	1,8	Antonopoulou et al (2008)
CW grezzo	Indigeno	CSTR	35	5,2	60	24	1,56	Venetsaneas et al (2009)
CW grezzo	Indigeno	CSTR	35	5,2	53,3	10-24	1,3	Stamatelatou et al (2011b)
CW in polvere	Fango anaerobico	CSTR	35	4,0-5,0	10-14	18-24	0,005-0,9	Yang et al (2007)
UF CW	Fango anaerobico riscaldato	UASB	35	5,7-5,8	20-35	24	2,1	Kisielewska et al (2013)
CW grezzo	Fango anaerobico	UASB	30	5,0	10;20	12;24	NA; 0,061	Castelló et al (2009)
CW in polvere	Fango anaerobico riscaldato	UASB	22-25	5,9	5-20	6-24	NA	Carrillo-Reyes et al (2012)
CW in polvere	Fango anaerobico 60riscaldato	UASB	35	5-5,6	20-48	3-8	NA	Carrillo-Reyes et al (2014)
CW	Fango anaerobico riscaldato	CFTB	60	5,5	18-24	10-20	3,02-3,8	Martinek et al (2013)
CW in polvere	CW grezzo a contatto con l'aria	UAFBR	30	4,0-5,6	22-37	24	0,05-0,67	Perna et al (2013)
CW in polvere + glucosio	Fango anaerobico riscaldato	AFBR	30	6,0	20	6	0,74-1,27	Rosa et al (2014a)
CW in polvere	Fango anaerobico riscaldato	AFBR	30	4-4,5	30-120	1-4	0,44-1,21	Rosa et al (2014b)
CW in polvere	Fango anaerobico	PBR	35	4,5-5,5	6,3-18,8	24-48	0,3-0,5	Fernandez et al (2014)

Tabella 2.6 Fermentazione del siero di latte in reattori Batch (Yuan 2017)

Substrato (g COD/L)	Inoculo	T (°C)	pH iniziale	Rendimento molare (mole H ₂ /mole lattosio)	Studio
CW grezzo	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> ATCC 27021	30	5-10	3,03	Ferchichi et al (2005)
CW in polvere	<i>Escherichia coli</i> W3110 (WT)	37	7,5	2,74	Rosales-Colunga et al (2010)
CW grezzo	<i>Enterobacter acerogenes</i> MTCC 2822	30	8	2,04	Rai et al (2012)
CW in polvere	<i>Escherichia coli</i> hycA, lacI (WDHL)	37	5,5-6,5	0,66-1,78	Rosales-Colunga et al (2013)
CW in polvere	<i>Rahnella aquatilis</i> 9	20	7,11	-	Debowski et al (2014)
CW grezzo	Fango anaerobico	27	7	4,13	Romão et al (2014)
UF CW	Fango anaerobico riscaldato	35	5-5,5	3,6	Teli et al (2014)
CW grezzo	Fango anaerobico riscaldato	36	5,5	3,5	Azbar et al (2009a)
CW in polvere	Fango granulare anaerobico riscaldato	37	7,5	3,1	Davila-Vazquez et al (2008)
CW in polvere	Fango granulare anaerobico riscaldato	37	5	1,8	Davila-Vazquez et al (2011)
CW grezzo	Fango granulare anaerobico riscaldato	36;55	5,5;4,5	1,75;1,53	Azbar et al (2009b)
CW in polvere	Fango anaerobico	15	4,0-4,5	1,12	Lima et al (2016)
CW in polvere	Fango anaerobico	30	-	0,6	Lima et al (2015)
CW in polvere	Fango anaerobico riscaldato	55	7	0,52	Kargi et al (2012)
CW grezzo	Indigeno; fango attivo riscaldato	NA	5,5-8,5	NA	De Gioannis et al (2014)
CW grezzo pretrattato	Fango anaerobico	36	10	1,0-3,3	Seo et al (2015)
CW filtrato su osmosi inversa	Fango anaerobico	35	-	-	Moreno et al (2015)

2.5 Dark fermentation di siero di latte

Il siero di latte costituisce un abbondante refluo di scarto dell'industria casearia e, sia per le sue caratteristiche sia per l'impossibilità di smaltirlo direttamente in ambiente, è stato studiato come possibile alimento per digestori anaerobici classici ma anche per digestori finalizzati alla produzione di bioidrogeno. Nel caso della dark fermentation le rese effettivamente ottenute vengono poi confrontate con quelle teoriche, pari a quattro moli di idrogeno per mole di lattosio, ottenibile solo nel caso in cui i sottoprodotti finali siano butirrato e acido acetico.

Vengono riportati di seguito (Tabella 2.7), da letteratura, i dati di produzione di bioidrogeno in funzione delle tipologie di reattore (batch, UASB e CSTR), delle condizioni operative (pH, temperature e HRT) e delle tipologie di siero (classico, diluito e in polvere).

Tabella 2.7 Riassunto delle sperimentazioni di dark fermentation condotte con siero di latte (CW), siero di latte diluito (CWD) e siero di latte in polvere (CWP); %DS è la percentuale di degradazione del substrato

Matrice	Reattore	pH	Temperatura (°C)	HRT (h)	%DS	%H ₂ v/v	Resa molare di idrogeno HMY	Riferimento
CWD	Batch	6	30	50-52	97	87,5	2,7 mol/mol lattosio	Ferchichi et al., 2005
CWP	Batch	7,5	37	280	91	-	2,74 mol/mol lattosio	Rosales-Colunga et al., 2010
CWD	CSTR	5,5	55	84	90	42	22 mmol/g COD	Azbar et al., 2009
CWP	CSTR	5,9	37	6	-	49-58	2,1-2,8 mol/mol lattosio	Davila-Vazquez et al., 2009
CW	CSTR	5,2	35	24	86	23,8	0,78 mol/mol lattosio	Venetsaneas et al., 2009
CW	CSTR	5,5	55	24	-	40-60	1,8-5,1 mol/mol lattosio	Azbar et al., 2010
CWD	UASB	5	30	12	-	20-30	-	Castello et al., 2009
CW + fango inoculato	Batch	5,5 e 7,0	-	-	-	-	61 e 371 L H ₂ / TOC siero	Akhlaghi et al., 2017
CW	ASTBR	-	25	24			1,4 ± 0,7 mol/ mol lattosio	Zaiat et al., 2019

La maggior parte delle prove è stata condotta in condizioni mesofile e pH tra 5-5,5. Le rese per i processi batch variano tra 50-90%, mentre tra 20-60% per le altre tipologie impiantistiche.

In generale si riscontrano elevate degradazioni del COD (90% circa) e degli zuccheri (tra 86 e 97%). Le rese di produzione di idrogeno variano mediamente tra 2 e 2,8 moli di idrogeno per mole di lattosio degradata.

Nonostante le elevate degradazioni, il refluo del processo non può essere comunque scaricato direttamente in ambiente a causa della produzione, contestuale all'idrogeno, di acidi grassi volatili in alte concentrazioni (Prazeres et al., 2012).

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

In questo capitolo vengono riportati la struttura e il funzionamento dell'impianto pilota e le analisi effettuate. Inizialmente vengono descritti gli strumenti e i materiali usati nell'attività di laboratorio e successivamente sia i parametri analizzati (paragrafo 3.3.2) sia quelli produttivi (paragrafo 3.3.3).

3.1 Introduzione

L'attività sperimentale è finalizzata all'ottimizzazione della produzione di bioH₂ tramite il processo di dark fermentation usando come alimento il siero di latte deproteizzato.

Nel suo complesso il lavoro in laboratorio prevede la gestione e il monitoraggio del reattore nonché l'analisi dei principali parametri di interesse del processo.

La fase di gestione comprende la preparazione dell'alimento, delle soluzioni di micronutrienti, della soda, lo smaltimento dell'effluente, il prelievo e le analisi del mixed liquor, del siero di latte e del biogas e la raccolta dei dati relativi alla pressione tramite il manometro keller. Le analisi sulla composizione e produzione di biogas sono state effettuate tramite gascromatografia: tramite connessione LAN è possibile collegare il gascromatografo ad un computer sul quale, grazie al software SOPRANE, viene effettuata la lettura della composizione del biogas. Tramite foglio di calcolo vengono poi rilevate le percentuali di idrogeno, anidride carbonica e metano. Quelle di idrogeno, al contrario, sono disponibili solo dal giorno 31 dovute al non funzionamento del gascromatografo. Inoltre, sono necessarie alcune operazioni straordinarie quali la pulizia dei tubi, la sostituzione di componenti o la sostituzione delle bombole di azoto del reattore e del gascromatografo.

3.2 Materiali

Di seguito vengono descritti l'impianto pilota usato per la sperimentazione del processo di dark fermentation e le matrici liquide usate durante lo studio: il siero di latte e l'alimento.

3.2.1 Impianto pilota

La sperimentazione e quindi lo studio del processo di dark fermentation è avvenuta all'interno del Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale (DICA). È stato utilizzato un impianto pilota (Figura 3.1) posto nel laboratorio di ingegneria ambientale (LIA) e il processo è stato condotto in continuo in un reattore completamente miscelato (CSTR) per una durata complessiva di 9 mesi.

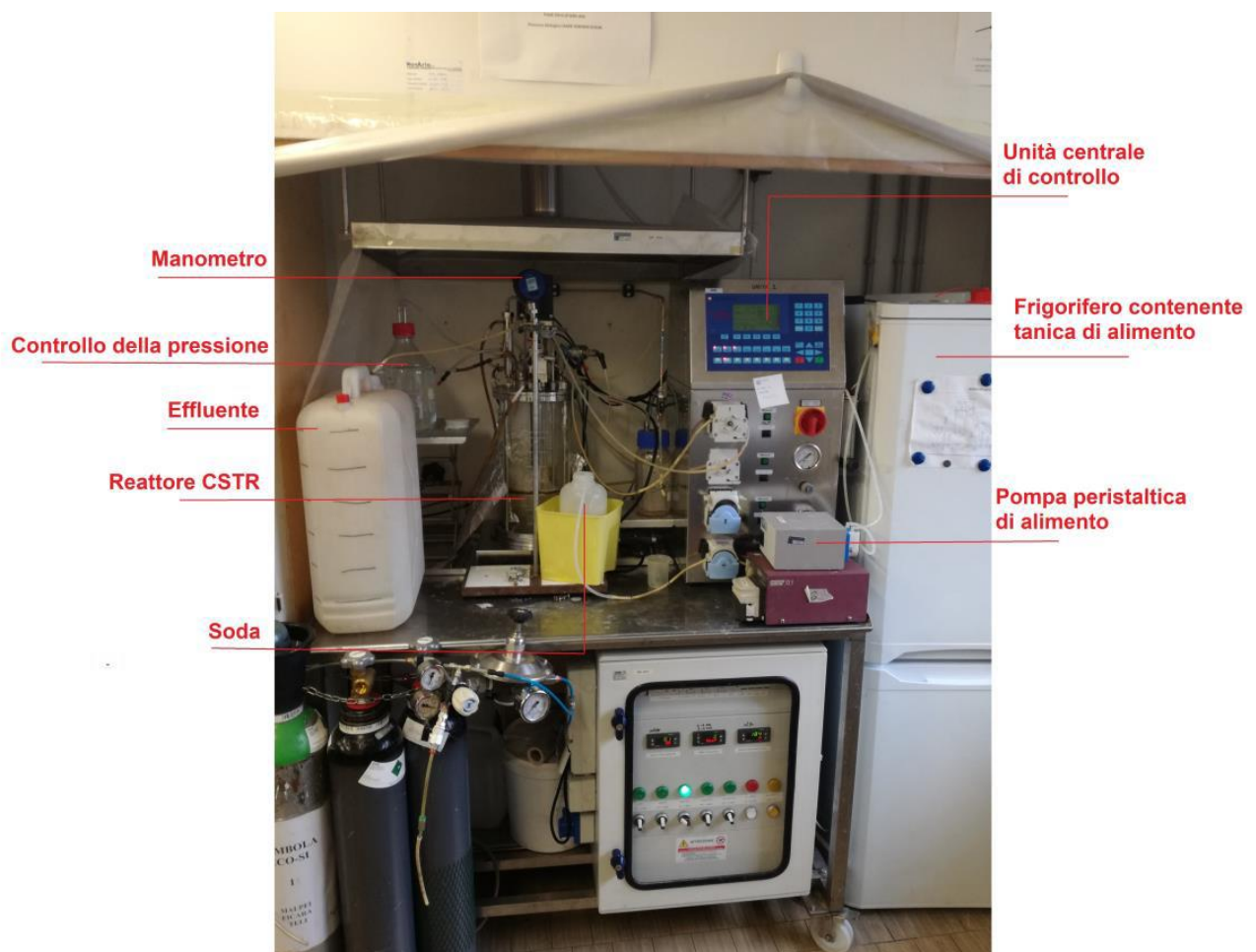


Figura 3.1 Impianto pilota e principali componenti

L'impianto pilota è costituito da un reattore cilindrico graduato in vetro (V utile = 10 L) dove avviene il processo, collegato a due taniche ($V = 30$ L), contenenti l'effluente e l'influente. Quest'ultimo è mantenuto nel frigorifero a fianco del reattore. Vi è poi una unità centrale di controllo, che permette di impostare e regolare il funzionamento dei diversi apparati (3 pompe per effluente, influente e soda, 1 mixer) e di acquisire i segnali e le misure delle sonde installate.

Il reattore è miscelato grazie ad un agitatore meccanico, immerso fino ad 1 litro dal fondo e dotato di 4 pale. Nel corso della sperimentazione ha operato a RPM di 200.

In testa al reattore è situato il manometro digitale Keller attraverso il quale vengono raccolti in continuo i dati di pressione. Il manometro è collegato ad un PC e i dati di pressione registrati vengono scaricati e salvati sullo stesso PC su cui è installato il software Logger 5 per la gestione dei dati di pressione e la loro conversione in dati di portata prodotta.

L'impianto pilota è posizionato sotto cappa per motivi di sicurezza legati a perdite/o fuoriuscite di gas. La pressione nel reattore oscilla tra 3 mbar e 13 mbar: una volta raggiunto il massimo valore possibile, tramite uno sfiato, il biogas viene rilasciato e la pressione ritorna al valore minimo. Il biogas prodotto si accumula in testa al reattore e viene rilasciato in atmosfera previa condensazione dell'umidità. Più precisamente, la linea gas in uscita dal reattore è costituita da un tubo collegato prima ad una bottiglia per la raccolta dei campioni di gas effluente, e poi alla cappa di uscita.

Nella parte superiore del reattore sono presenti le sonde di misura del pH, della temperatura.

Il controllo del pH è operato mediante dosaggio di soda (NaOH 3M), attraverso una pompa peristaltica. IL set point di pH, regolabile dal pannello di controllo, è stato posto durante la sperimentazione al valore di 5.5.

Le pompe peristaltiche in alimento ed effluente operano con una portata di 8 L/d: mentre la pompa in alimento viene impostata con una tale portata, la portata della pompa effluente è regolata in funzione di un sensore di livello posto nel reattore, che mantiene costante il livello del liquido al suo interno.

Il riscaldamento del reattore avviene mediante un sistema di riscaldamento elettrico a piastra, che è posto alla base del reattore, e di raffreddamento con acqua di rete.

La temperatura è stata mantenuta circa costante al valore di 36°C tramite regolazione dei suddetti sistemi, sempre attraverso il pannello di controllo.

L'effluente prodotto giornalmente viene raccolto in apposite taniche, stoccato come rifiuto (digestato CER 190606) e inviato a smaltimento.

Uno schema funzionale è riportato in Figura 3.2.

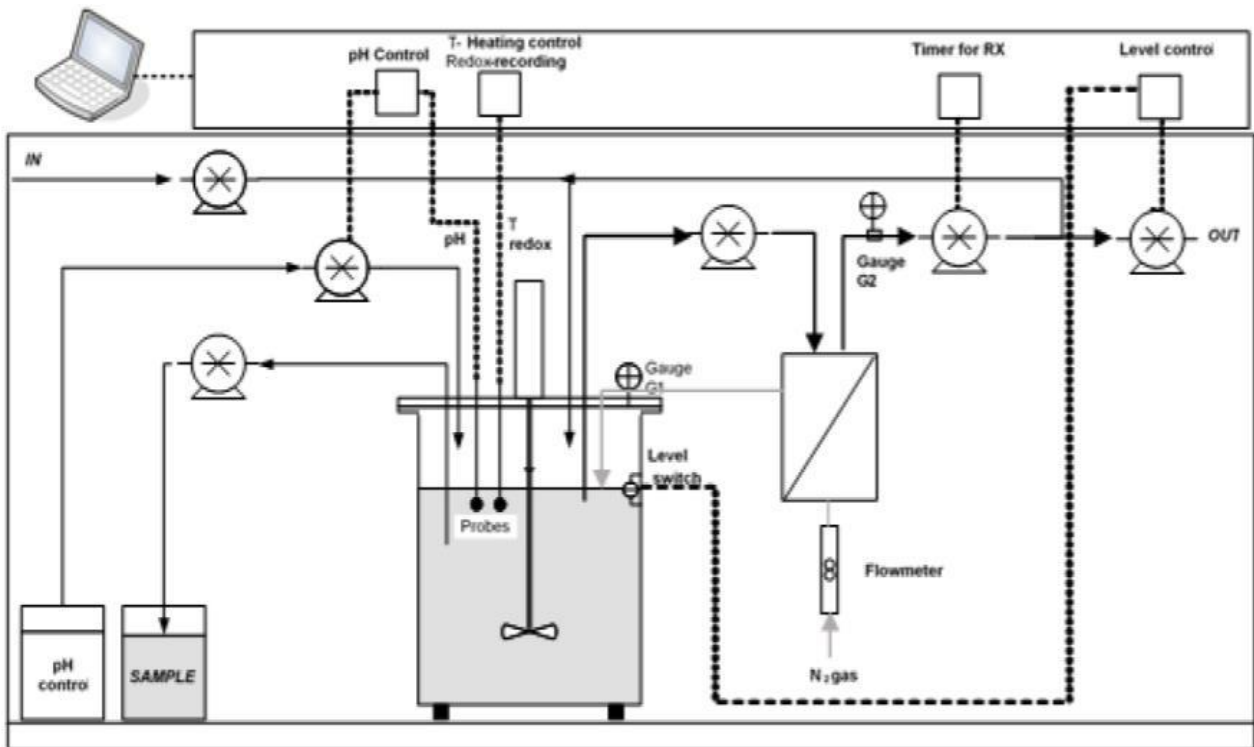


Figura 3.2 Schema funzionale dell'impianto pilota

3.2.2 Matrici liquide

Siero di latte ed alimento

Il siero di latte per preparare l'alimento è stato prelevato in forma liquida ogni tre mesi dalla ditta SERUM ITALIA (BS) e tenuto nella cella frigorifera del laboratorio LIA. Prima del suo utilizzo vengono effettuate analisi relative al COD solubile, solidi sospesi totali e volatili, azoto totale e ammoniacale.

Si tratta di siero prima sottoposto a ultrafiltrazione per la rimozione delle proteine, allontanate con il concentrato, e successivamente sottoposto a concentrazione tramite osmosi inversa (Figura 3.3).

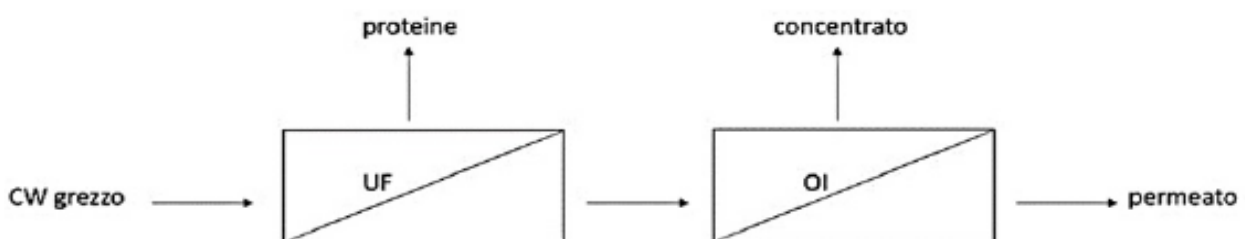


Figura 3.3 Processo di formazione del siero di latte permeato concentrato

In Tabella 3.1 vengono riportate le caratteristiche del siero di latte usato per la sperimentazione, confrontandole con quelle del siero tal quale. Nel siero impiegato si osservano concentrazioni maggiori di COD, inferiori di SST e rapporti COD/N molto più alti, a conferma della concentrazione subita, insieme con la separazione delle proteine, non completa comunque. La presenza di SST può attribuirsi ad una non completa reiezione da parte della membrana UF o a trasformazioni/coagulazioni avvenute successivamente.

Tabella 3.1 Caratteristiche siero di latte

Parametri misurati	Siero tal quale (Ghaly e Kamal 2004)	Siero permeato concentrato usato nello studio
COD (g/L)	74,2	152 ± 0,88
Azoto totale (mg/L)	1490	572 ± 0,34
Azoto ammoniacale (mg/L)	170	79 ± 0,19
Solidi sospesi totali (SST) (g/L)	22,15	2,95 ± 0,03
COD/N	49,8	265,7
COD/SST	25,15	51,5

La preparazione dell'alimento è stata effettuata tre volte la settimana, mediante diluizione con acqua del siero ed aggiunta di soluzioni di macro e micronutrienti. I dosaggi sono riportati in Tabella 3.2, con riferimento ad un batch di 18L di alimento e in Tabella 3.3, in percentuale. I dosaggi vengono effettuati con l'obiettivo di avere in ingresso al reattore un COD pari a 10 g/L, azoto totale pari a 150 mg/L. I micronutrienti vengono preparati mensilmente in forma di soluzioni concentrate la cui composizione viene riportata nella Tabella 3.4 e Tabella 3.5. L'alimento viene preparato in una tanica da 30L, tenuto in frigorifero e alimentato al reattore tramite pompa peristaltica.

Tabella 3.2 Composizione 8 litri di alimento rappresentativi di 24h di funzionamento del reattore

Sostanza	Quantitativo
H2O	7,3224 L
Siero di latte	0,5070 L
Soluzione 1	0,1373 L
Soluzione 2	0,0333 L
Cloruro d'ammonio NH4Cl	3,314 g

Tabella 3.3 Composizione percentuale alimento di partenza

Composizione del 31/01/2019	Sostanze
Acqua	91,53 %
Siero di latte	6,34 %
Soluzione 1	1,72 %
Soluzione 2	0,42 %
Cloruro di ammonio (NH ₄ Cl)	1,243 g (per 3L)

Tabella 3.4 Caratteristiche soluzione 1 di micronutrienti

Composto	Concentrazione (mg/L)
CuSO₄ 5H₂O	5
ZnCl₂	0,75
MnSO₄ H₂O	9,2
CoCl₂ 6H₂O	2,6
FeSO₄ 7H₂O	35,5
Na₂MoO₄ 2H₂O	12,5
MgCl₂ 6H₂O	100

Tabella 3.5 Caratteristiche soluzione 2 di micronutrienti

Composto	Concentrazione (mg/L)
KH₂PO₄	100

3.3 Metodi

Le condizioni operative del reattore, mantenute costanti durante la sperimentazione, ad eccezione della temperatura, vengono riportate nella Tabella 3.6.

Tabella 3.6 condizioni operative

Portata in ingresso (Q_{in})	8 L/d
Volume totale reattore	10 L
Volume mixed liquor	3 L
Temperatura (fasi mesofile/fase termofila)	36/50 °C
pH	5,5
Miscelazione	200
Tempo di residenza idraulico (HRT)	9 h

3.3.1 Piano sperimentale

Il reattore è stato mantenuto in funzione per 201 giorni effettivi. Per tutta la sperimentazione sono state condotte analisi di COD solubile (g/L), azoto totale (mgN/L), azoto ammoniacale (mgNH₄/L) sia dell'influyente che dell'effluente. Inoltre, sono stati analizzati sull'alimento e sull'effluente i solidi sospesi totali (gSST/L) e volatili (gSSV/L). Infine, quotidianamente, sono state effettuate misure della produzione di biogas e, a partire dal giorno 31, sua caratterizzazione tramite gascromatografo. Tipologia e frequenza programmata delle analisi vengono riportate nella Tabella 3.7. Come nel seguito descritta, guasti o malfunzionamenti di alcuni strumenti di analisi non hanno sempre consentito di rispettare il piano di analisi programmato.

Tabella 3.7 Misurazioni effettuate e relative frequenze

Parametro misurato	Campione	Frequenza
COD	Alimento ed effluente	Tre volte la settimana
Solidi sospesi totali	Alimento ed effluente	Tre volte la settimana
Solidi sospesi volatili	Alimento ed effluente	Tre volte la settimana
Idrogeno	Biogas	Giornalmente
Azoto totale	Alimento ed effluente	Una volta la settimana
Azoto ammoniacale	Alimento ed effluente	Una volta la settimana

La sperimentazione è stata suddivisa in quattro periodi in virtù sia delle condizioni che si sono verificate durante la sperimentazione, sia della variazione della temperatura di esercizio, portata nell'ultima fase a valori di termofilia. Come nel seguito descritto, le diverse fasi sono state anche caratterizzate da diverse modalità di avvio ed inoculo.

Periodo 1 (31/01/2019 – 17/04/2019)

Il reattore è stato mantenuto in funzione complessivamente per 78 giorni durante i quali non si sono registrati problemi di funzionamento. Il reattore è stato inoculato con 3L di alimento, dopo 3 ore è stata avviata l'alimentazione. A causa della presenza delle vacanze di Pasqua, al termine di tale periodo, la sperimentazione è stata interrotta per 15 giorni. Per fermo dello strumento di misura relativo, le analisi del contenuto di H₂ nel biogas sono disponibili solo dal giorno 31.

Periodo 2 (09/05/2019 – 05/07/2019)

Durante questi due mesi i giorni effettivi di corretto funzionamento del reattore sono soltanto 24 a causa di problemi di innesco del processo, di rottura del sensore della sonda della temperatura con conseguenti condizioni operative non ottimali, di salti della corrente nel laboratorio che interrompevano sia il riscaldamento che il funzionamento delle pompe e di formazione di granuli nel reattore.

Per queste ragioni, all'interno di questo periodo della durata complessiva di 2 mesi, si sono individuati due periodi di funzionamento contraddistinti da condizioni operative stabili e analoghe al periodo 1: rispettivamente dal giorno 90 al giorno 134 (45 giorni) di cui 16 di analisi e dal giorno 144 al giorno 157 (14 giorni) di cui 8 di analisi.

Il riavvio del reattore è stato effettuato con 3L di alimento costituito, per il 50% dal mixed liquor del precedente periodo, conservato in frigorifero e per l'altro 50% dall'alimento standard di Tabella 3.3. Dopo una settimana, osservato che in queste condizioni il processo non era partito, il reattore è stato fermato e riavviato con un nuovo alimento costituito da 300 mL del precedente inoculo e 2,7 L di alimento standard. Anche in questo caso però il processo biologico non si è avviato e il reattore è stato quindi fermato al giorno 4 e reinoculato con 3 L di alimento standard.

Periodo 3 (26/08/2019 – 18/10/2019)

Il terzo periodo ha una durata effettiva di 48 giorni ininterrotti di funzionamento del reattore, il quale è stato avviato con 3L di alimento standard. Durante tale periodo sono state costantemente monitorate le produzioni di biogas e di idrogeno, senza problemi legati alla disponibilità del gascromatografo, a differenza del periodo 1. In questo periodo non si è verificato lo sviluppo di granuli all'interno del reattore.

Periodo 4 (20/10/2019 – 11/12/2019)

Il quarto periodo ha una durata complessiva di 51 giorni; a differenza dei tre precedenti è stato condotto in condizioni termofile. L'inoculo di questo periodo è il medesimo del precedente periodo. Anche questo periodo, come il secondo, può essere diviso in due parti: la prima della durata di 20 giorni durante la quale si è operato con una temperatura pari a 55°C e la seconda di 31 giorni in cui si è operato a 50°C.

Durante il primo periodo ($T = 55^{\circ}\text{C}$), il reattore ha presentato diverse problematiche di funzionamento legate a salti di corrente e rottura del sensore della sonda della temperatura, che ha portato al crollo della temperatura a 15°C , con conseguente disturbo del processo biologico e necessità di riavvio. Il riavvio è stato effettuato con 3L di nuovo alimento, ad una temperatura leggermente inferiore (50°C) per evitare nuove problematiche legate al sensore della temperatura. In tali condizioni non si sono verificati problemi tecnici legati a salti di corrente o rotture di sensori, ma problemi legati alla corretta produzione di idrogeno. Una prima motivazione è stata ipotizzata nella difficoltà da parte dei batteri di acclimatarsi alle nuove condizioni: è stata pertanto provata la via dell'inoculo di 100 mL di fango termofilo nel reattore. La via dell'inoculo non ha dato esiti positivi in quanto per 10 giorni le produzioni non hanno subito variazioni di rilievo. La seconda strada ipotizzava invece come possibile spiegazione delle basse produzioni, una concentrazione di micronutrienti nell'alimento eccessivamente bassa. È stata pertanto raddoppiata la concentrazione dei micronutrienti: anche in questo caso, dopo 6 giorni di funzionamento, le produzioni sono risultate essere solo leggermente superiori alle precedenti.

Di seguito vengono riportate le condizioni operative di tutte le fasi (Tabella 3.8).

Tabella 3.8 Condizioni operative dei quattro periodi

Periodo	Durata (d)	Miscelazione (rpm)	pH	HRT (h)	Temperatura °C
Periodo 1	78	200	5,5	9	36
Periodo 2	59	200	5,5	9	36
Periodo 3	48	200	5,5	9	36
Periodo 4	51	200	5,5-6	9	55-50

3.3.2 Analisi e misure

COD

Il COD (Chemical Oxygen Demand) rappresenta la quantità di ossigeno necessaria per la completa ossidazione per via chimica dei composti organici e inorganici presenti in un campione; viene espresso in termini di mgO_2/L . In laboratorio le misure di COD sono state effettuate, tramite i kit LCK 914 (5-60 g/L O_2) e LCK 514 (100-2000 mg/L O_2), sull'effluente, sull'influente e sul siero di latte filtrati, sia all'apertura di una nuova tanica ma anche a metà tanica per verificare che le caratteristiche del siero rimanesero stabili controllando l'insorgenza di eventuali processi biologici indesiderati e ottenendo risultati quanto più precisi possibili.

Solidi sospesi totali e volatili

Per solidi sospesi totali si intende quella parte di materiale presente in sospensione in un campione separabile tramite filtrazione. Le analisi sono state effettuate secondo il metodo IRSA usando filtri in vibra di vetro GFC, con diametro dei pori di 1,2 micrometri. In entrambi i casi la misura finale è la media tra due misure per ciascuna delle quali si è usato, per la filtrazione, un volume di campione pari a 20mL. I solidi sospesi volatili sia sul campione che sul siero di latte sono stati ricavati ponendo i campioni all'interno della muffola a 550°C.

Azoto totale e ammoniacale

Le misure di azoto totale e ammoniacale sono state effettuate una volta la settimana sia sull'effluente che sull'influente; per il primo si è usato il kit LCK 238 (5-40 mg/L) mentre per il secondo il kit LCK 303 (2,5-60 mg/L).

Biogas: portata e composizione

Il biogas viene raccolto in un'apposita bag tramite un tubo collegato alla bottiglia di raccolta; il campionamento prevede una prima fase di insufflazione di azoto nella bag, tramite apposita bombola, per garantire una corretta diluizione del biogas, permettendone la lettura al gascromatografo.

L'analisi del biogas viene effettuata tramite gascromatografo (MICROGC 3000, Agilent Technologies, Germania) utilizzando una colonna Molsieve column (Molsieve 10m/PPU 3m Gc, temperatura 90°C e pressione 15 psi) ed Argon come gas vettore. Lo strumento è costituito da due colonne analitiche: una a setacci per l'individuazione di N₂, O₂, CH₄, H₂ ed una polimerica per CO₂ e N₂O. Tramite connessione LAN è possibile collegare lo strumento ad un PC su cui è installato il software Soprane (sviluppato da SRA) per la gestione del dispositivo e la raccolta dei dati. Le letture di composizione del biogas sono state fatte in doppio con conseguente adozione del valor medio per il calcolo della portata. Le percentuali di interesse dei gas sono quelle di H₂, CO₂ e CH₄. Generalmente tutto il periodo mesofilo è caratterizzato da percentuali molto simili di H₂ (50-55%) e CO₂ (50-45%). Sempre nulla è risultata essere la presenza di metano, sintomatica dell'assenza nel reattore di metanogenesi.

Quantitativamente la produzione di biogas viene calcolata a partire dai dati di pressione registrati dal manometro Keller (Figura 3.4), posto in testa al reattore, e scaricati su pc utilizzando il software Logger 5, sviluppato da Keller Druck, attraverso il metodo di Teli (2015).

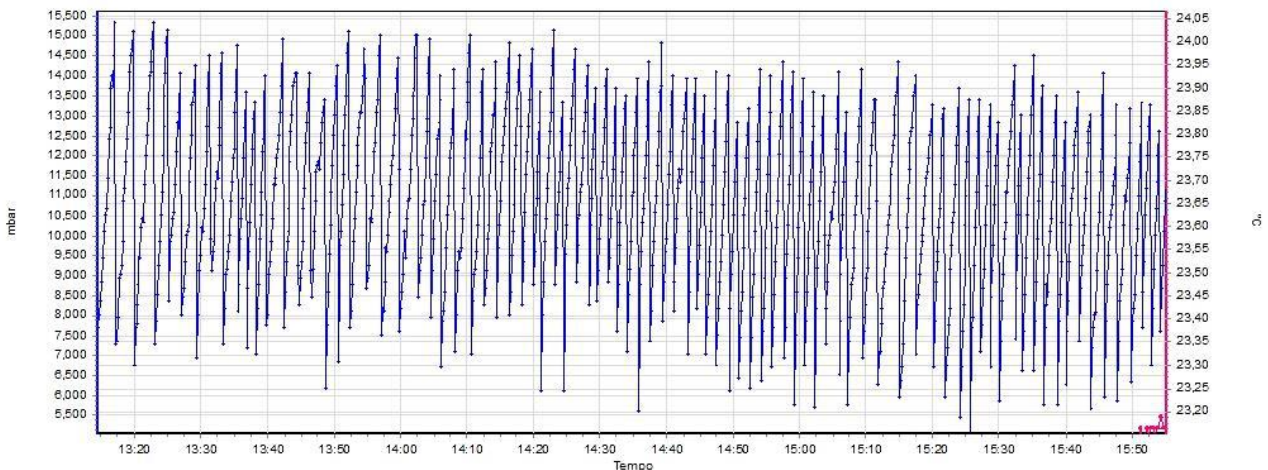


Figura 3.4 Curva di pressione nel reattore

Sull'asse delle ascisse viene riportato l'intervallo temporale in termini di ore, mentre sull'asse delle ordinate la pressione, in mbar, registrata dal manometro.

Il grafico descrivente la curva di pressione è caratterizzato dall'alternarsi di massimi e minimi, quest'ultimi dovuti allo sfiato conseguente al raggiungimento della massima pressione. In queste tipologie di grafici due sono gli aspetti principali da analizzare: la pendenza delle curve e la distanza tra due massimi successivi. Questi due parametri sono degli indicatori del livello di intensità dell'attività batterica e indirettamente del volume di biogas e di idrogeno prodotti.

In particolare, la distanza indica l'arco temporale intercorrente tra i massimi: quindi più gli intervalli sono brevi, ovvero maggiore è la vicinanza tra i picchi, maggiore è la pendenza delle curve e maggiore sarà la produzione di biogas nell'unità di tempo. Successivamente tramite foglio di calcolo le curve di pressione sono trasformate in curve di volume, sulla base della legge dei gas perfetti, e tramite il software Matlab viene ricavata la produzione di biogas in termini di litri normali giorno.

Acidi volatili

Gli acidi volatili (acetico, propionico, butirrico, isobutirrico ed etanolo) vengono analizzati nel laboratorio "A.Rozzi", sito al Polo di Cremona, sul COD solubile effluente prelevato tre volte la settimana, filtrato con filtri in acetato con pori di 0,45 micrometri e conservato in freezer nel laboratorio LIA. Le analisi vengono fatte ogni due mesi circa su una serie di campioni scelti in funzione delle differenti condizioni operative (temperatura, pH, presenza di granuli nel reattore) o in concomitanza di problematiche legate a basse produzioni di biogas e idrogeno, pH o temperature non ottimali.

Dalle analisi, tramite i rapporti di equivalenza, vengono ricavati i dati di concentrazione, in termini di COD, di tali acidi all'interno del COD solubile effluente.

3.3.3 Elaborazioni dei dati

I dati analitici e le misure raccolte sono stati utilizzati per calcolare per ottenere i parametri di funzionamento e le rese secondo quanto nel seguito viene indicato.

Produzione di biogas

La produzione di biogas è stata calcolata giornalmente partendo dai dati di pressione scaricati dal keller. il volume di biogas prodotto in un determinato arco temporale (Eq 3.1) risulta essere:

$$Q_{\text{biogas}} = V_{\text{gas}} / t \quad \text{Eq 3.1}$$

Dove:

- Q_{biogas} è la portata di biogas prodotta (NL/h)
- V_{gas} è il volume cumulato di biogas prodotto nell'unità di tempo calcolato tramite Matlab a partire dai dati scaricati dal Keller

Produzione di idrogeno

La portata di idrogeno viene calcolata, tramite Eq 3.2, nota la percentuale di idrogeno nel flusso di biogas prodotto.

$$Q_{\text{H}_2} = Q_{\text{biogas}} * \text{H}_2\% \quad \text{Eq 3.2}$$

Dove:

- Q_{H_2} è la portata di idrogeno prodotta (NL H₂/h)
- $\text{H}_2\%$ è la percentuale di idrogeno presente nel biogas prodotto e analizzato

Rendimento molare specifico

Il rendimento molare specifico di produzione di idrogeno (HMY) viene definito dal rapporto tra moli di idrogeno prodotte per moli di lattosio in ingresso al reattore (Eq 3.3):

$$HMY = (Q_{H_2}/22,4) / (C_{lattosio,in} * Q_{in}/MW_{lattosio}) \quad \text{Eq 3.3}$$

Dove:

- HMY è il rendimento molare di produzione di idrogeno (moli H₂/moli lattosio)
- C_{lattosio,in} è la concentrazione del lattosio in ingresso al reattore (g/L)
- Q_{H₂} è la portata di idrogeno (NL H₂/h)
- 22,4 è il volume molare (NL/mole)
- Q_{in} è la portata in ingresso (L/h)
- MW_{lattosio} è il peso molecolare del lattosio (g/mole)

Tasso di crescita cellulare

Il tasso di crescita cellulare lordo esprime quanto substrato viene consumato dai batteri per la loro crescita, quindi quanto substrato è andato a costituire nuova biomassa (sintesi cellulare).

Viene espresso come il rapporto tra la biomassa, in termini di SSV, uscente dal sistema e il substrato rimosso dal sistema stesso nello stesso intervallo di tempo (Eq 3.4).

$$Y = SSV/COD_{rimosso} \quad \text{Eq 3.4}$$

Dove:

- Y è il tasso di crescita cellulare (gSSV/gCOD_{rimosso})
- COD_{rimosso} è il substrato rimosso giornalmente (gCOD_{rimosso}/g)
- SSV sono i solidi sospesi volatili giornalieri (gSSV/d)

Bilancio di massa del COD

Il bilancio di massa sul COD viene calcolato su base giornaliera.

Il COD totale in uscita, che deve essere per il principio di conservazione uguale al COD influente totale, risulta essere costituito da tre termini: COD corrispondente all'idrogeno in uscita, COD legato ai solidi sospesi volatili in uscita (inclusi i batteri cresciuti) e COD solubile. In Tabella 3.9 sono riportati i coefficienti assunti, calcolati per via stechiometrica ed assumendo per gli SSV in uscita la seguente formula (Eq 3.5):

$$\text{COD}_{\text{ssv}} = \text{SSV}_{\text{out}} * \text{Q}_{\text{out}} * \text{COD}_{\text{eq,ssv}}$$

Dove

- COD_{ssv} è il COD equivalente ai solidi sospesi volatili (gCOD/d)
- SSV_{out} sono i solidi sospesi volatili in uscita (g/L)
- Q_{out} è la portata effluente giornaliera pari a 8 L/d
- $\text{COD}_{\text{eq,ssv}}$ è una costante pari a 1,42 gCOD/gSSV che rappresenta il COD equivalente ai solidi sospesi volatili

Il bilancio viene riportato nella seguente equazione (Eq 3.6):

$$\text{COD}_{\text{in}} = \text{COD}_{\text{H}_2} + \text{COD}_{\text{ssv}} + \text{COD}_{\text{out,sol}} \quad \text{Eq 3.5}$$

Dove:

- COD_{in} è il COD in ingresso al reattore (gCOD/d) comprendente le parti solubili e sospese. Il COD del sospeso influente è stato effettuato su un campione precedentemente filtrato
- COD_{H_2} è il COD equivalente all'idrogeno prodotto (gCOD/d)
- COD_{ssv} è il COD equivalente ai solidi sospesi volatili (gCOD/d)
- $\text{COD}_{\text{out,sol}}$ è il COD solubile in uscita dal reattore (gCOD/D)

L'analisi del bilancio di massa risulta importante per verificare l'assenza di errori durante le analisi e le misurazioni dei vari componenti.

È stato inoltre effettuato un ulteriore bilancio di massa solo sul COD solubile effluente (Eq 3.6) finalizzato ad analizzare gli acidi organici volatili (etanolo, acetico, butirrico, isobutirrico e propionico) costituenti il COD stesso, tutti espressi in termini di COD equivalente (Tabella 3.9).

$$\text{COD}_{\text{out,sol}} = \text{COD}_{\text{eta}} + \text{COD}_{\text{aa}} + \text{COD}_{\text{iso}} + \text{COD}_{\text{pr}} + \text{COD}_{\text{but}} \quad \text{Eq 3.6}$$

Dove:

- COD_{eta} è la frazione di COD relativa all'etanolo (gCOD/d)
- COD_{aa} è la frazione di COD relativa all'acido acetico (gCOD/d)
- COD_{iso} è la frazione di COD legata all'isobutirrico (gCOD/d)
- COD_{pr} è la frazione di COD legata al propionico (gCOD/d)
- COD_{but} è la frazione di COD legata al butirrico (gCOD/d)

L'eventuale non chiusura del bilancio di massa del COD solubile implica la presenza di ulteriori acidi oppure di lattosio.

Sostanza	COD equivalente (gCOD/g)
Acido acetico	1,07
Etanolo	2,08
Acido butirrico	1,82
Acido isobutirrico	1,82
Lattosio	1,12
Acido propionico	1,51
Solidi sospesi volatili	1,42
H₂	8

Tabella 3.9 COD equivalenti per la verifica del bilancio di massa

CAPITOLO 4

RISULTATI

Nel seguente capitolo vengono analizzati i periodi nei quali è stata suddivisa la sperimentazione: dapprima si riportano i risultati ottenuti in laboratorio e successivamente ne viene fornita una discussione confrontando i risultati con la letteratura e con quelli di studi precedenti. L'intero periodo di lavoro sperimentale è stato come già precisato nel Capitolo 3 suddiviso in quattro periodi: il primo e il terzo caratterizzati da identiche condizioni operative, il secondo caratterizzato dalla presenza di granuli nel reattore e infine il quarto periodo, in cui si è alzata la temperatura di processo con lo scopo di studiare e valutare l'effetto della variazione di temperatura sulle produzioni di biogas, sulle rese di produzione di idrogeno e sui tassi di crescita cellulari.

4.1 Periodo 1 (31/01/2019 – 17/04/2019)

4.1.1 Risultati e discussione

Il periodo 1 è durato 78 giorni, al termine dei quali il reattore è stato fermato per le festività pasquali. È stato caratterizzato (Figura 4.1) da produzioni di biogas oscillanti tra 0,7 e 1,3 NLbiogas/h con il massimo, raggiunto il giorno 74, pari quasi a 1,5 NLbiogas/h. La prima parte, fino al giorno 12, è caratterizzata da produzioni inferiori alla media, con valori compresi tra 0,3 a 0,9 NLbiogas/h dovuti all'acclimatazione batterica. L'ultima parte, dal giorno 71, invece presenta la maggiore variabilità con valori oscillanti tra 0,3 a 1,5 NLbiogas/h.

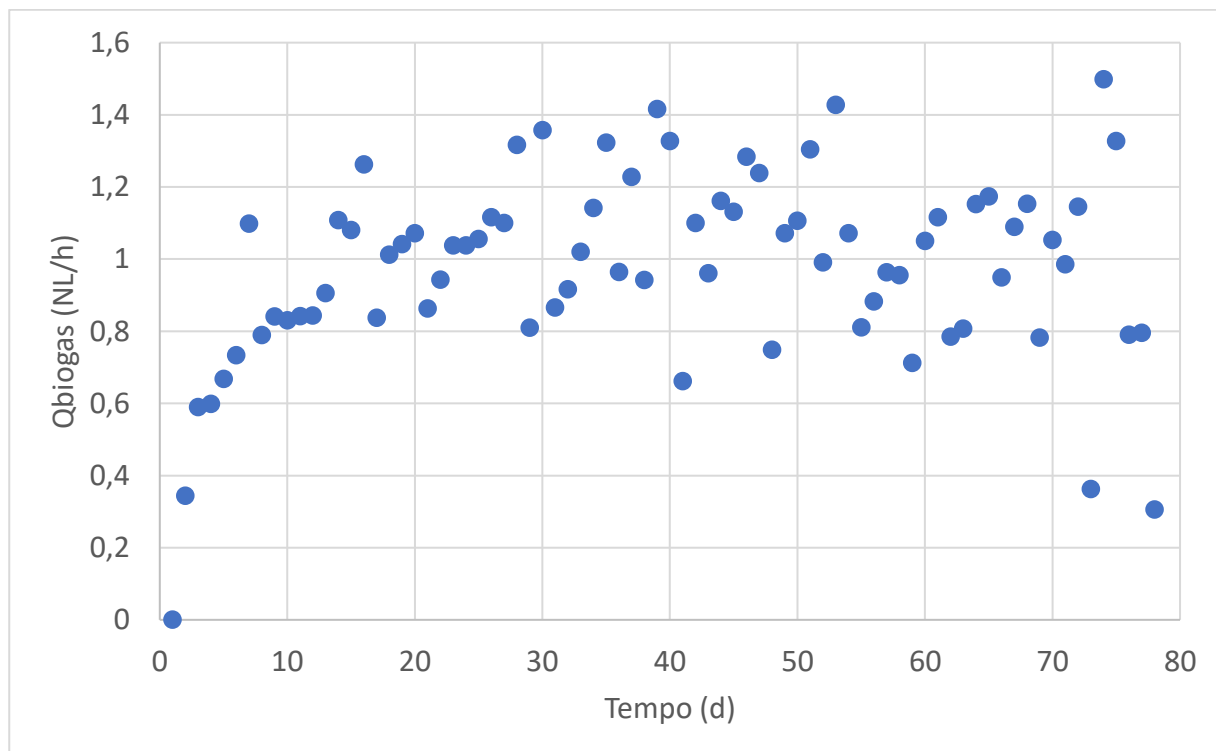


Figura 4.1 Produzioni di biogas e di idrogeno periodo 1

La disponibilità dei dati di produzione dell'idrogeno è a partire dal giorno 31, a causa di malfunzionamenti del gascromatografo. La composizione del biogas in uscita (Figura 4.2) per tutto il periodo risulta essere composta da idrogeno e anidride carbonica. L'andamento delle percentuali risulta essere variabile per tutto il periodo: la prima parte, dal giorno 31 al giorno 44, la percentuale di anidride carbonica è risultata superiore rispetto a quella dell'idrogeno. La parte centrale invece, fino al giorno 71, evidenzia un andamento complessivamente opposto, in cui le percentuali di idrogeno variano tra il 50 e 55% mentre quelle di anidride carbonica tra il 50 e il 45%. Gli ultimi giorni del periodo 1 ripresentano l'andamento dei primi giorni con percentuali di anidride carbonica superiori a quelle di idrogeno.

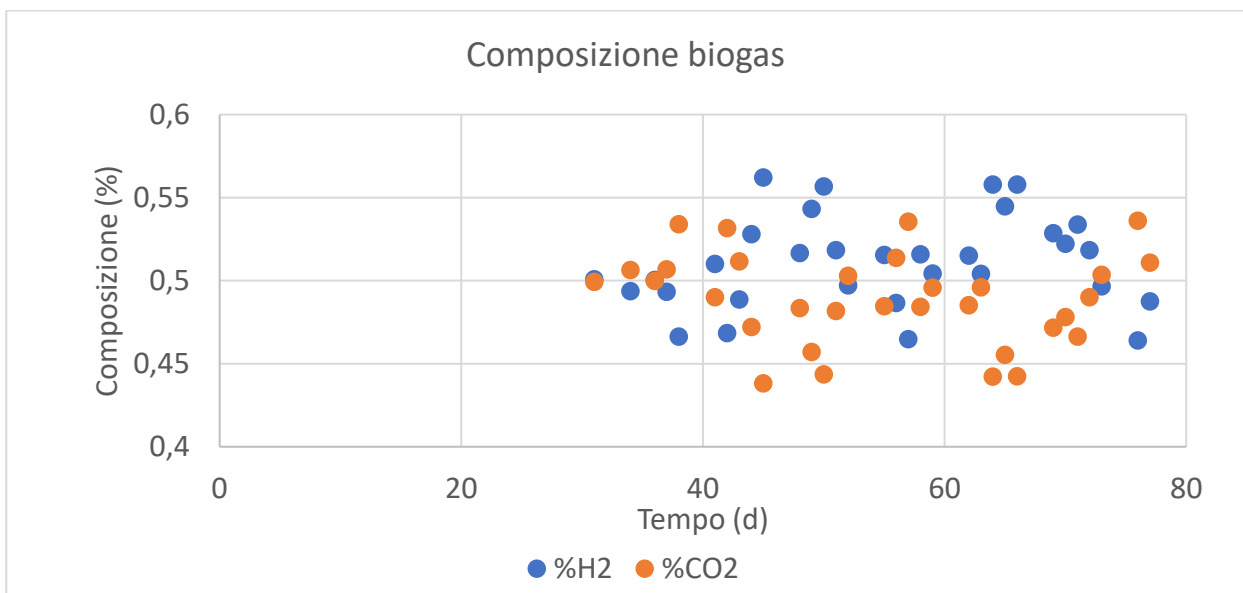


Figura 4.2 Composizione del biogas periodo 1

Le produzioni di idrogeno, riportate in Figura 4.3, seguono comunque quelle del biogas, rappresentando come media e deviazione rispettivamente il 51% e 0,023 del biogas stesso. Il periodo 1 è caratterizzato dalle migliori produzioni rispetto a tutti gli altri periodi: si sono ottenuti infatti valori compresi tra 0,4 e 0,7 NLH₂/h, e in generale costantemente inferiori a 0,8 NLH₂/h con il massimo di produzione pari a 1,24 NLH₂/h. Le produzioni di biogas e di idrogeno presentano un andamento parallelo, e in questo caso costante, nel tempo non essendo state variate le condizioni operative e non presentando il reattore problemi di funzionamento.

Le produzioni di idrogeno sono costantemente superiori a 0,5 NL₂/h, valori equivalenti o superiori, a parità di caratteristiche del siero utilizzato, rispetto a quelli di tesi precedenti, dove le produzioni risultavano essere inferiori a 0,35 NL₂/h (Gugliandolo 2017) o mediamente pari a 0,5 NL₂/h (Zappulla 2018).

Le rese di rimozione del COD (Figura 4.3) presentano forti oscillazioni e risultano comprese tra valori di poco superiori allo 0 fino a circa il 30%. Risultano sempre superiori al 15% nella prima e nell'ultima parte con diversi massimi eccedenti il 20%, specialmente al termine del periodo, mentre presentano una forte diminuzione nella fase centrale (dal giorno 24 al giorno 38), per una durata complessiva di 20 giorni circa, durante la quale si ha una rimozione sempre inferiore al 13%. Durante tale periodo non era disponibile la composizione del biogas.

Contrastanti risultano essere gli andamenti delle produzioni di idrogeno e del COD rimosso (%): invece di avere un andamento parallelo, dalla Figura 4.3 si evince una perdita del parallelismo per tutto il periodo. A partire dal giorno 31 mentre la percentuale di rimozione aumenta costantemente, altrettanto non si verifica per la portata di idrogeno la quale si assesta su valori costanti come probabile diretta conseguenza delle necessità energetiche dei batteri: le condizioni di stress a cui sono sottoposti i batteri determinano un parziale utilizzo del COD rimosso per la loro crescita.

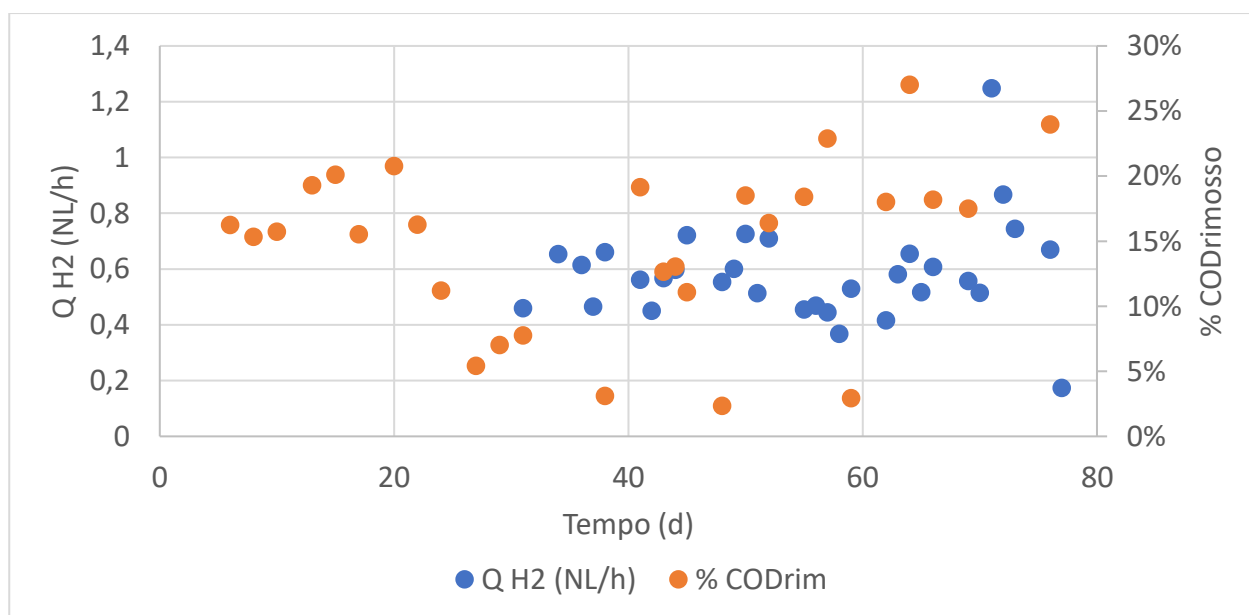


Figura 4.3 Produzione di idrogeno e percentuale di rimozione del COD periodo 1

Le rese di produzione di idrogeno del periodo 1 sono riportate in Figura 4.4 e mostrano valori compresi per tutto il periodo tra 3 e 4 moli H₂/moli lattosio, con un picco iniziale pari a 6,87 moli H₂/moli lattosio, dovuto probabilmente ad un errore di misura, e una forte decrescita finale fino a rese inferiori a 1 moli H₂/moli lattosio.

Le rese di produzione di idrogeno mostrano lo stesso andamento nel tempo delle portate di idrogeno: il medesimo andamento è stato confermato dallo studio precedente (Gugliandolo 2017). A differenza sia di quest'ultimo studio, in cui le rese di produzione oscillavano tra 1 e 1,5 moli H₂/moli lattosio, sia della letteratura, in cui si riportano per una temperatura leggermente inferiori e pari a 30°C rese di produzione di idrogeno pari a 1,41 moli H₂/moli lattosio (Ferchichi et al., 2005), in questo caso i valori raddoppiano o triplicano oscillando tra 3 e 4 moli H₂/moli lattosio: questa differenza può essere in parte dovuta alle maggiori produzioni di idrogeno rispetto ad alcune tesi precedenti (Gugliandolo 2017).

Le rese, viceversa, mostrano un andamento discordante rispetto alle percentuali di rimozione del COD: mentre le rese risultano essere costanti per tutto il periodo, le rimozioni presentano un andamento generalmente crescente. Questa diversità può essere dovuta al fatto che parte del COD rimosso dai batteri si sia tradotto in idrogeno prodotto ma usato dai batteri per il proprio sviluppo.

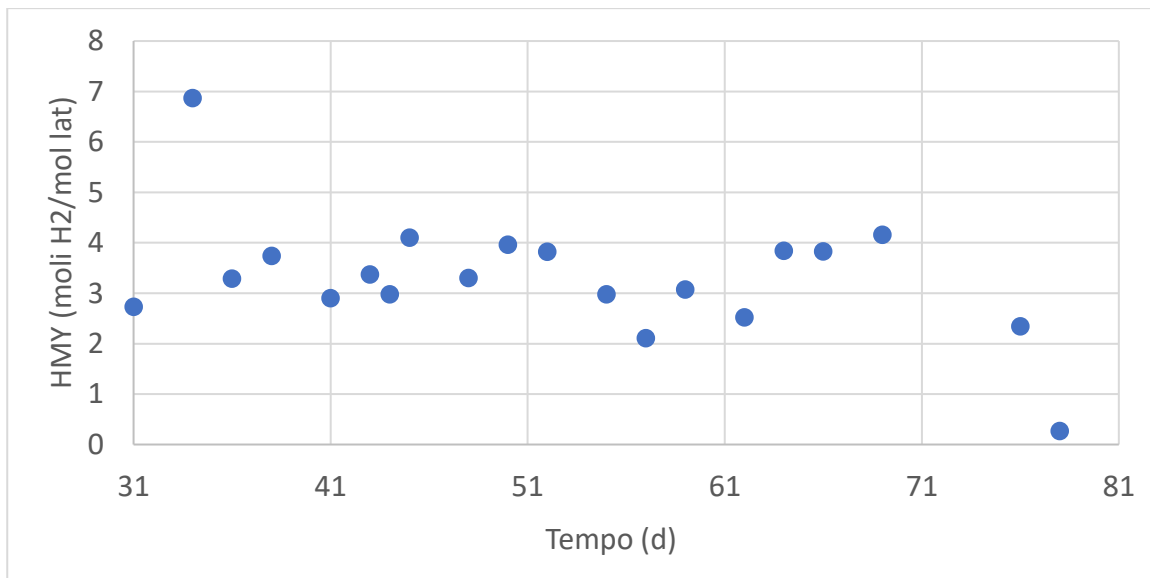


Figura 4.4 Resa di produzione di idrogeno del periodo 1

L'andamento della concentrazione di solidi sospesi volatili nel tempo (Figura 4.5) mostra valori costanti per quasi tutto il periodo e in particolare compresi tra 0,7 e 0,9 gSSV/L. Dalle misurazioni effettuate negli ultimi giorni del periodo si evince invece il raggiungimento del massimo delle concentrazioni, pari a 0,9 gSSV/L, e del minimo nei giorni seguenti, pari a 0,5 gSSV/L.

La concentrazione dei SSV si assesta per tutto il periodo su valori di poco inferiori a 1 gSSV/L; tali concentrazioni risultano essere in linea con i precedenti studi (Zappulla 2018, Tugui 2017), in cui si erano riscontrate concentrazioni oscillanti tra 0,6 e 1,2 gSSV/L.

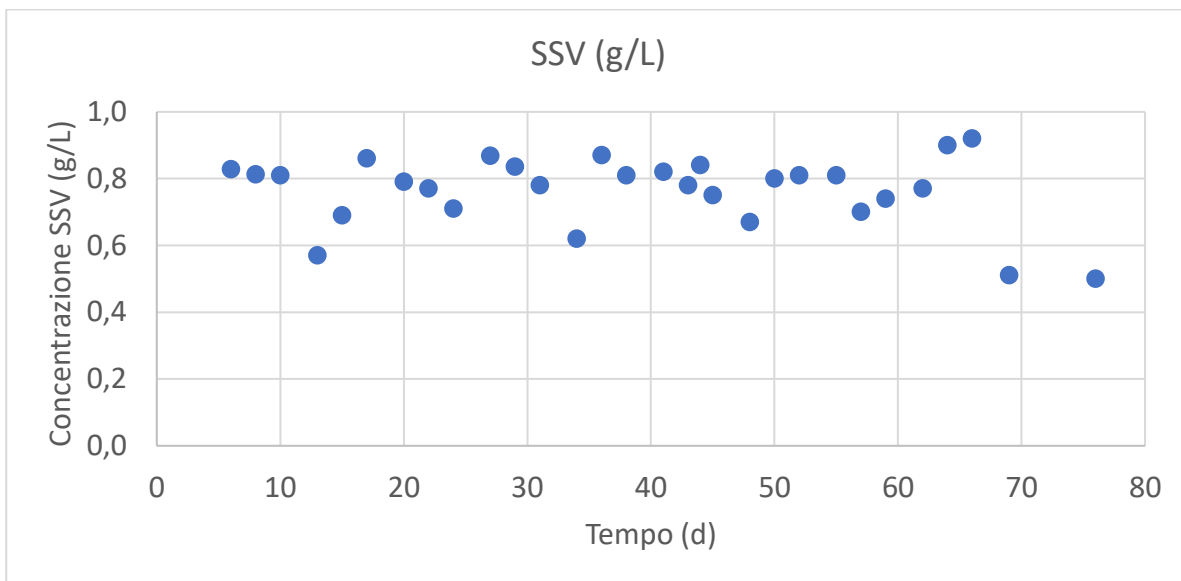


Figura 4.5 Concentrazioni SSV nel periodo 1

Rappresentando in Figura 4.6 la correlazione tra la cumulata degli SSV formati e uscenti dal reattore e la cumulata del COD rimosso, si trova un andamento prossimo al lineare, nel quale si individuano però 3 tratti a pendenze un po' diverse, pur risultando la correlazione ottenuta con una unica retta caratterizzata da R^2 prossimo a 0,98. L'andamento complessivo può essere suddiviso in 3 parti: una prima caratterizzata da punti che si dispongono nell'immediato intorno della retta, una seconda parte con punti posti al di sotto e al di sopra della retta dovuti a elevate efficienze di rimozioni del COD e minori concentrazioni di SSV o viceversa e una terza con punti leggermente sopra o sotto alla retta ma con differenze inferiori rispetto alla seconda parte.

La prima parte presenta un coefficiente angolare circa pari a 0,995 quindi molto vicino all'unità da cui si evince come quasi la totalità dei SSV formati derivi dal COD rimosso.

La parte centrale è caratterizzata da punti che si trovano sia sopra sia sotto la retta sintomo di efficienze minori e maggiori concentrazioni di SSV e viceversa; in questa parte centrale il coefficiente risulta essere inferiore a quello complessivo e pari a 0,865.

L'ultima parte presenta un coefficiente migliore della seconda parte in quanto caratterizzata da punti che si dispongono intorno alla retta; il coefficiente angolare risulta essere pari a 0,93.

Il coefficiente angolare complessivo, che rappresenta il tasso di crescita lordo, risulta prossimo a 0,6 gSSV/gCODrimosso; il tasso della prima parte risulta pari a 0,45 gSSV/gCODrimosso, quello della seconda di 0,587 gSSV/gCODrimosso mentre quello della terza parte prossimo a 0,6 gSSV/gCODrimosso. I tassi di crescita cellulare risultano pertanto essere eccessivi per i batteri per i quali, in letteratura, valori ideali vengono individuati tra 0,14 e 0,17 gSSV/gCODrimosso (Speece et al., 1996).

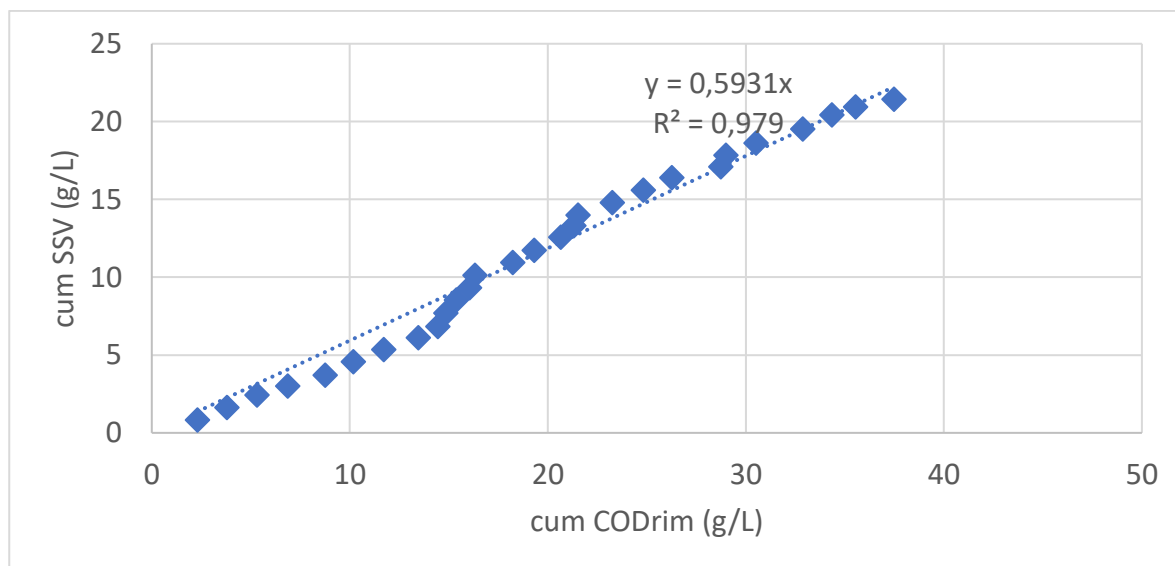


Figura 4.6 Correlazione COD rimosso cumulato e SSV cumulati nel periodo 1

Il bilancio di massa sul COD (Figura 4.7) viene effettuato tramite l'equazione descritta nel Capitolo 3 (paragrafo 3.7).

Nella Figura 4.7:

- COD_{in} rappresenta il carico giornaliero di COD in ingresso al reattore
- COD_{out} rappresenta il carico di COD solubile uscente
- COD_{vss} rappresenta il carico di COD giornaliero legato ai solidi sospesi volatili
- COD_{H₂} rappresenta il carico giornaliero di COD equivalente all'idrogeno prodotto

L'intera colonna rappresenta invece il COD_{out,tot}, ovvero il carico complessivo giornaliero di COD uscente dal sistema (ossia la somma delle tre componenti: solubile, idrogeno, SSV).

Il bilancio è stato fatto soltanto a partire dal giorno 31, data a partire dalla quale è stato possibile usare il gascromatografo calcolando il COD equivalente all'idrogeno prodotto. È stato considerato accettabile un errore massimo tra COD in ingresso e COD totale effluente pari a ±10%; l'errore è stato calcolato come segue (Eq. 4.1):

$$\text{ERRORE} = (\text{COD}_{\text{in}} - \text{COD}_{\text{out,tot}}) / \text{COD}_{\text{in}} \quad \text{Eq. 4.1}$$

I bilanci del periodo 1 sono buoni, infatti il 72% dei bilanci stessi presenta una chiusura inferiore al 10%. Migliori risultati sono stati ottenuti per la terza fase durante la quale solo un bilancio non ha rispettato la chiusura del 10% mentre il 94% ha rispettato tale intervallo, con numerosi bilanci caratterizzati da errori inferiori anche al 5%.

Mediamente il primo periodo presenta una non chiusura media del bilancio del -6,77%.

Le concentrazioni di COD solubile effluente (COD out) risultano essere per tutto il periodo i valori più elevati; la prima parte, fino al giorno 59, risulta essere caratterizzata dai valori più elevati i quali risultano essere sempre maggiori di 60 gCOD/d ad eccezione del giorno 55. La seconda parte invece presenta costantemente valori inferiori e mai superiori a 50 gCOD/d ad eccezione dell'ultima misurazione. Le altre due componenti del COD, quella legata ai SSV e all'idrogeno, risultano essere sempre decisamente più basse rispetto al COD solubile effluente ma simili tra loro; i loro valori oscillano tra 5 e 10 gCOD/d per tutto il periodo 1.

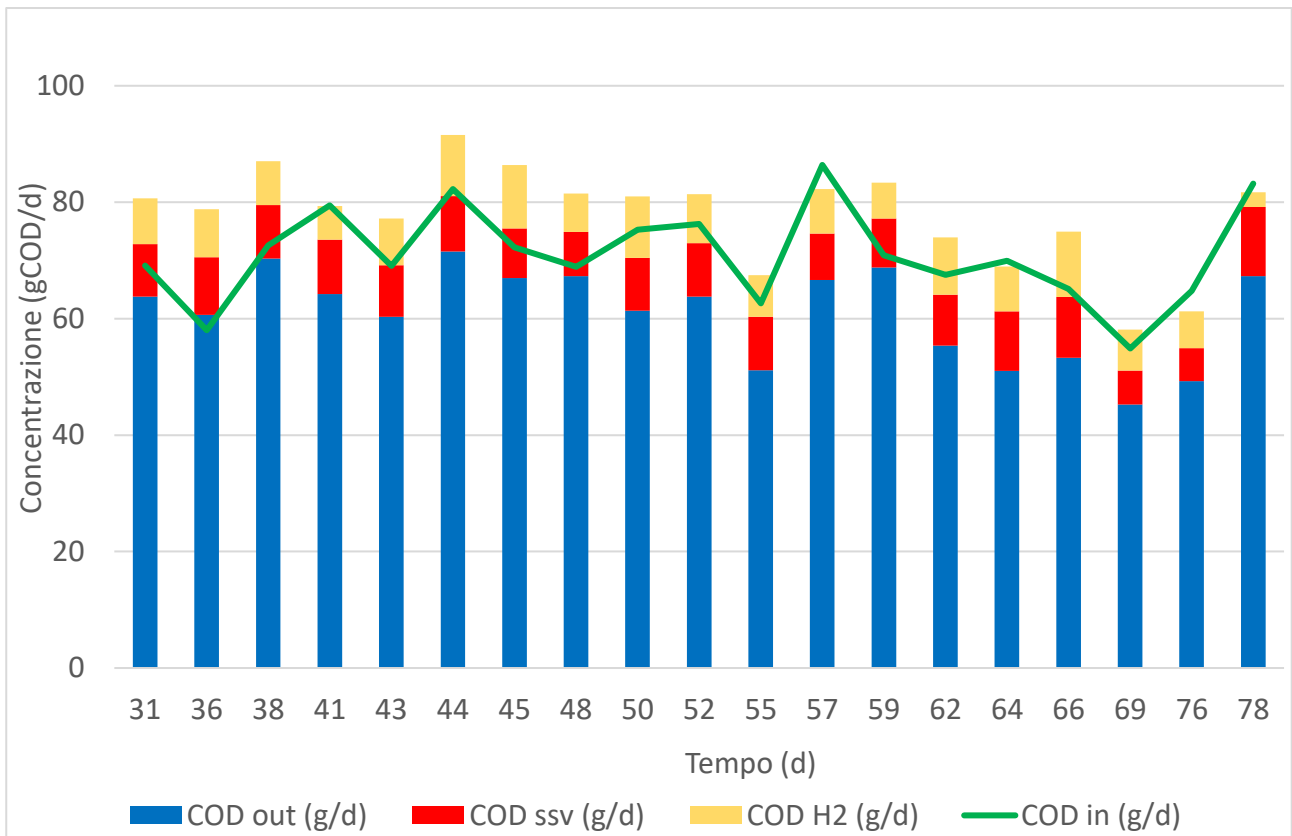


Figura 4.7 Bilancio di massa del COD periodo 1

Le concentrazioni degli acidi volatili vengono mostrate in Figura 4.8.

Il primo periodo è caratterizzato da concentrazioni di etanolo che vanno a costituire spesso anche più del 50% del totale del COD solubile, con valori spesso superiori a 25 gCODeq/d. Valori molto inferiori alla media sono stati ottenuti soltanto nei giorni 41, 66 e 69 a cui non sono corrisposte produzioni e rese di produzioni di idrogeno maggiori; dalla letteratura infatti ad una riduzione dell'etanolo è associata un aumento delle produzioni di idrogeno.

Le concentrazioni di acido acetico risultano essere leggermente superiori a 10 gCODeq/d per tutto il periodo. Opposto è l'andamento delle concentrazioni dell'acido butirrico: il primo periodo è caratterizzato da valori medi intorno ai 7 gCODeq/d con un raddoppio nella parte finale conseguente alla diminuzione dell'etanolo. Le concentrazioni di acido propionico e isobutirrico risultano essere quasi nulle in tutti i campioni analizzati.

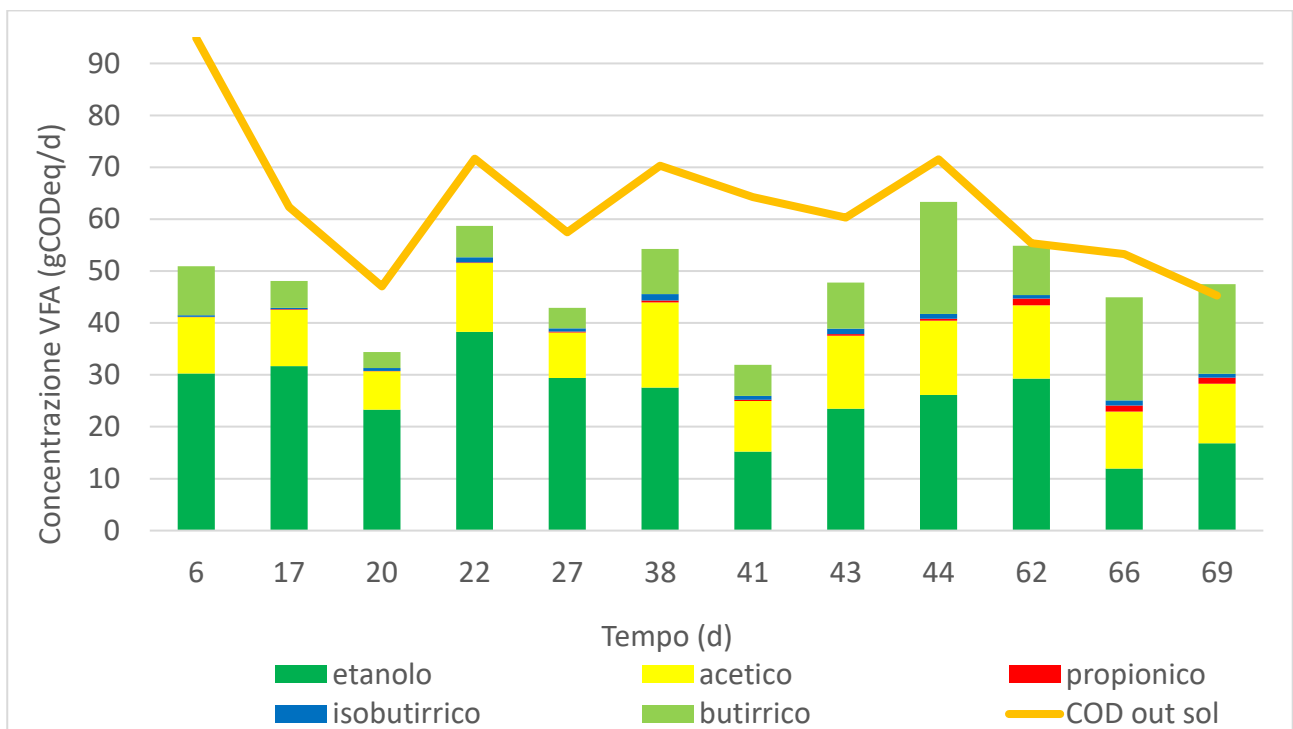


Figura 4.8 Concentrazione del COD solubile effluente

4.2 Periodo 2 (29/04/2019 – 05/07/2019)

4.2.1 Risultati

All'interno del periodo 2 possiamo distinguere due fasi, la prima della durata di 45 giorni (dal giorno 90 al giorno 134) e la seconda di 14 giorni (dal giorno 144 al giorno 157); il reattore è stato fermato il giorno 134 causa sostenimento esami e poi il giorno 157 per la presenza di granuli nel reattore. Per quanto riguarda la produzione di biogas (Figura 4.9) nella prima fase è stata compresa tra 0,4 e 0,6 NLbiogas/h con picchi superiori a 0,6 NLbiogas/h; nella seconda i valori sono siti tra 0,25 e 0,35 NLbiogas/h con un minimo inferiore a 0,2 NLbiogas/h nella prima parte e un massimo al termine pari quasi pari a 0,4 NLbiogas/h.

Le produzioni complessive di biogas risultano decisamente inferiori e maggiormente variabili rispetto al primo periodo: non si superano infatti mai gli 0,8 NL/h a differenza del primo periodo in cui, ad esclusione della fase iniziale di acclimatazione e di quella finale, le produzioni erano doppie. In comune con il primo periodo risulta essere l'andamento: anche in questo periodo, specialmente per la prima fase, si registra un forte aumento della produzione, che in questo caso è passata da 0,1 a 0,72 NL/h in una settimana, seguito da una riduzione finale. Anche nello stesso periodo 2, tra le due fasi, vi è una netta differenza di produzioni: per le produzioni di biogas, la prima fase è caratterizzata da produzioni quasi sempre superiori, ben 11 volte oltre gli 0,4 NL/h valore che nella seconda fase non viene mai oltrepassato.

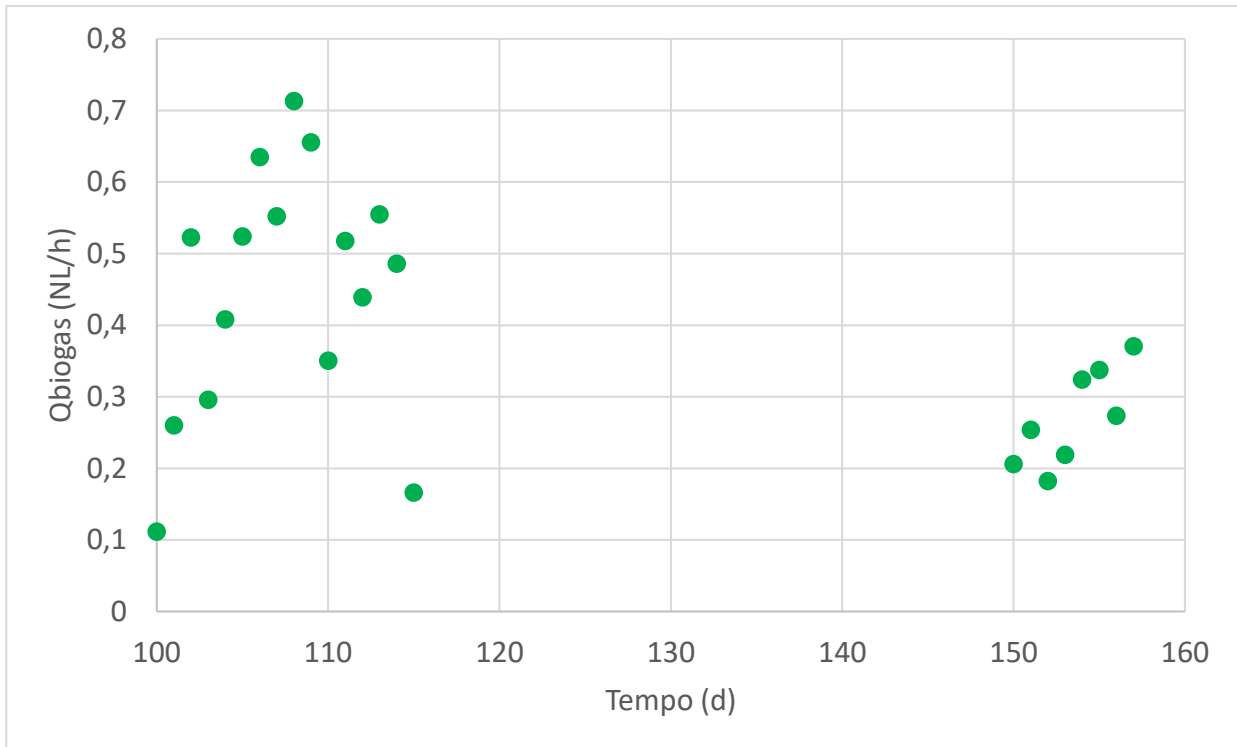


Figura 4.9 Produzioni di biogas e di idrogeno periodo 2

La composizione del biogas per tutto il periodo 2 risulta essere identica, con le percentuali di idrogeno sempre inferiori a quelle di anidride carbonica e rispettivamente oscillanti tra 45-50% e tra 50-55%.

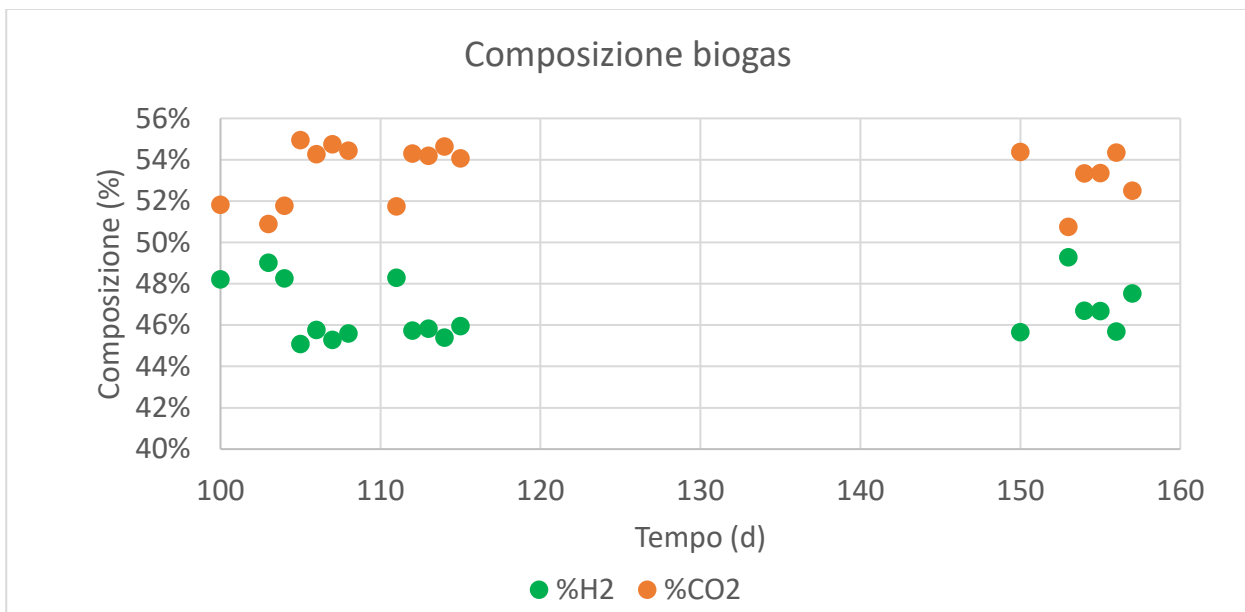


Figura 4.10 Composizione biogas periodo 2

La produzione di idrogeno del periodo 2 (Figura 4.11) mostra andamenti simili tra le due fasi: la prima è caratterizzata da un rapido aumento a cui fa seguito un'altrettanta rapida diminuzione, mentre la seconda mostra un aumento e una riduzione delle produzioni di minore entità. Le produzioni di idrogeno della prima fase si assestano tra 0,2 e 0,3 NLH₂/h con picchi superiori a 0,3 NLH₂/h nella parte centrale; quelle della seconda fase presentano valori complessivamente inferiori e, in particolare, compresi tra 0,1 e 0,15 NLH₂/h con il massimo inferiore a 0,2 NLH₂/h. L'andamento che viene riscontrato per l'idrogeno, che passa da 0,05 a 0,33 NLH₂/h in pochi giorni, è lo stesso del biogas.

Il medesimo scarto delle produzioni di biogas viene riscontrato anche nelle produzioni di idrogeno: mentre nella prima fase le produzioni superano 0,2 NLH₂/h nel 69% delle misurazioni, nella seconda fase non viene mai superato il valore di 0,2 NLH₂/h.

Per le efficienze di rimozione del COD, nella prima fase del secondo periodo (figura 4.9), dopo due buone rimozioni iniziali superiori al 15%, si osserva un crollo delle efficienze, mai superiori al 7%, parallelo alla formazione dei granuli nel reattore. Anche la seconda fase, successiva al riavvio del reattore per la rimozione dei granuli, presenta un andamento identico con una buona rimozione iniziale, pari al 12%, e successiva diminuzione in concomitanza con la nuova crescita dei granuli.

La rimozione percentuale di COD presenta inoltre un andamento opposto rispetto alla produzione di idrogeno: mentre la produzione presenta per entrambe le fasi un andamento crescente nei primi giorni, la rimozione percentuale di COD è caratterizzata da una costante decrescita.

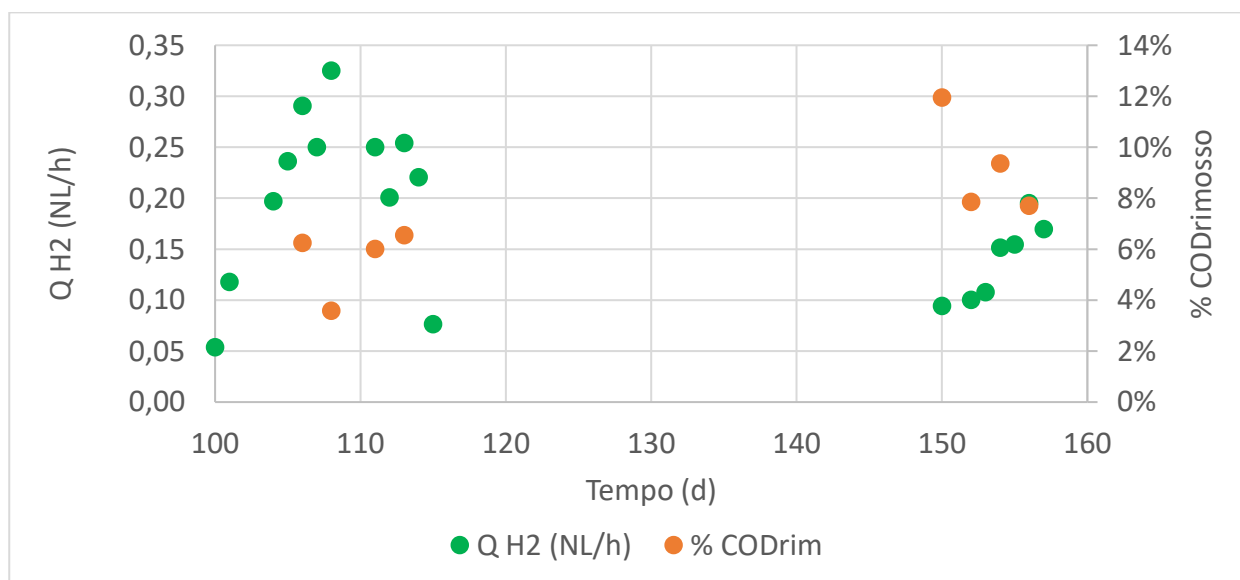


Figura 4.11 Produzione di idrogeno e percentuale di rimozione del COD periodo 2

Il secondo periodo è caratterizzato da rese basse e allo stesso tempo molto diverse tra le due fasi (Figura 4.12): la prima fase è caratterizzata dalle rese di rimozione migliori, infatti si raggiungono valori superiori a 1,5 moli H₂/moli lattosio, ma anche da una forte variabilità, mentre la seconda da valori più stabili ma mai superiori a 1 moli H₂/moli lattosio. La presenza dei granuli e il conseguente crollo delle efficienze di rimozione del COD si riflette con una forte diminuzione delle rese di produzione, passate da una media tra 3 e 4 moli H₂/moli lattosio del primo periodo a valori inferiori a 1,8 moli H₂/moli lattosio del periodo 2.

Anche nel periodo 2 le rese di produzione di idrogeno evidenziano un andamento discordante rispetto alle efficienze di rimozione del COD ma solo per il primo periodo: l'efficienza minore, pari quasi al 4%, coincide con il giorno caratterizzato dalla maggiore resa di produzione di idrogeno pari a 1,8 moli H₂/mol lattosio e quindi dalla maggior portata di idrogeno prodotto pari a 0,33 NL H₂/h.

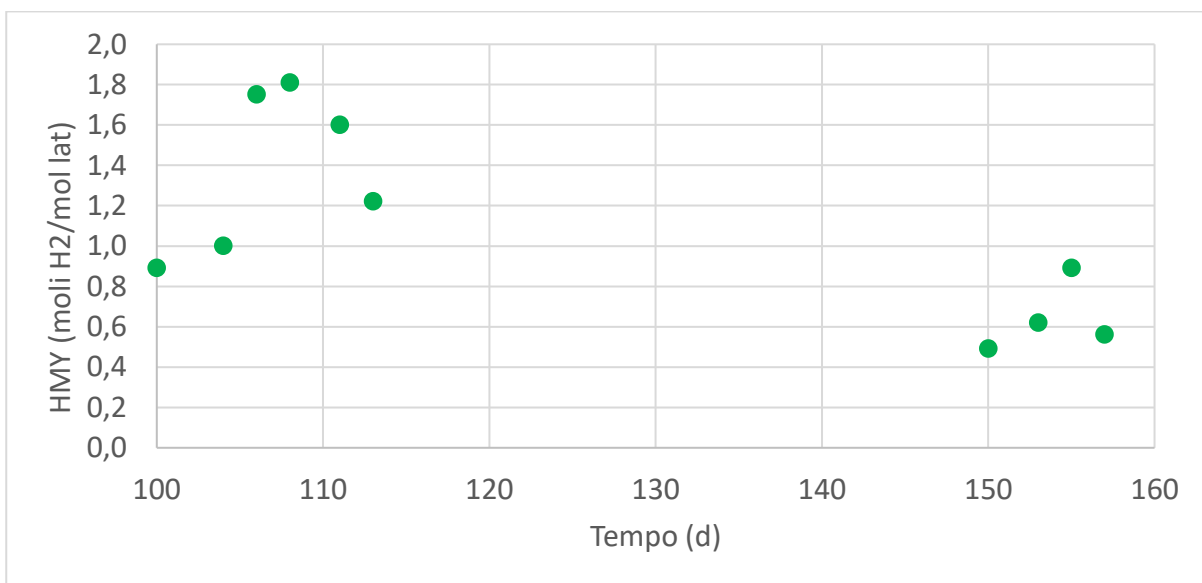


Figura 4.12 Resa di produzione di idrogeno del periodo 2

L'andamento delle concentrazioni di solidi sospesi volatili (Figura 4.13) presenta una forte variabilità: la prima fase presenta valori iniziali superiori a 1 gSSV/L e mostra un andamento crescente con valori costantemente maggiori di 1,4 gSSV/L. Nella parte finale si raggiunge il massimo valore di concentrazione pari a 2 gSSV/L. Anche la seconda fase mostrano un trend crescente seppur con valori in valore assoluto inferiori alla prima: si passa da concentrazioni poco sotto al 1 gSSV/L a valori di 1,5 gSSV/L nell'arco di 10 giorni.

Un andamento opposto si evince confrontando la percentuale di COD rimosso e le concentrazioni di SSV: avanzando nel tempo si assiste ad un più che dimezzamento delle rimozioni, che passa dal 15% al 5%, e ad un raddoppio delle concentrazioni che passano da 1 gSSV/L a quasi 2 gSSV/L. La ragione di un tale andamento può essere spiegata dalla formazione di granuli nel reattore i quali determinano un forte aumento dei SSV; un uguale fenomeno con relativo andamento è stato riscontrato in uno studio precedente (Tugui 2017) in cui al crescere dei SSV al di sopra del 1 gSSV/L ha corrisposto una forte riduzione della percentuale di COD rimosso, passata dal 30% al 15%.

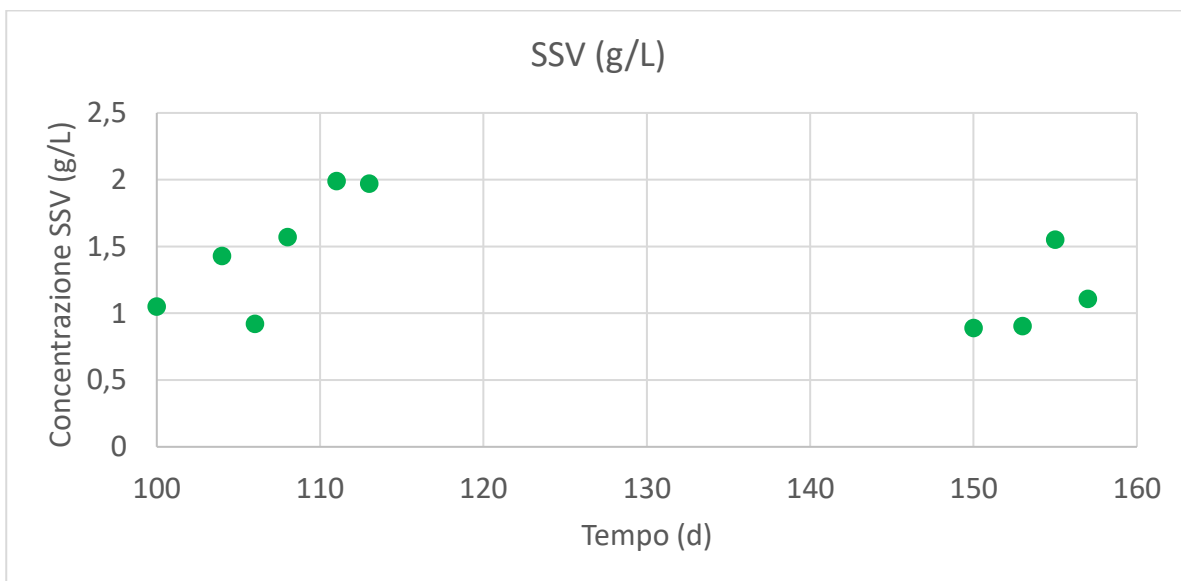


Figura 4.13 Concentrazioni SSV nel periodo 2

Dal grafico (Figura 4.14) si evince un forte discostamento dei punti dalla retta per i primi 6 giorni, mentre la seconda parte risulta caratterizzata da un miglior allineamento dei punti dai quali si evince una crescita dei SSV corrispondente al COD rimosso. Il coefficiente di correlazione pari a 0,884 è sintomatico di una bassa correlazione complessiva tra i due parametri. In particolare, i primi 6 giorni presentano un R^2 prossimo a 0,69 quindi molto inferiore al valore complessivo; questo valore rispecchia il forte discostamento dei punti e una bassa correlazione tra i due parametri, in quanto le rimozioni del COD non sono seguite da altrettante crescite di SSV.

La seconda parte presenta invece un R^2 molto elevato e vicino all'unità, prossimo a 0,98, dal quale deriva una crescita dei SSV totalmente dipendente dal COD rimosso.

Dal confronto con il periodo 1 emerge come la maggiore lontananza dei punti dalla retta della seconda e quindi il basso coefficiente di correlazione siano simbolo del fatto che i solidi sospesi volatili formati non derivano esclusivamente dal COD rimosso dai batteri.

Il coefficiente angolare complessivo rappresentante il tasso lordo di crescita, risulta pari a 1,374 gSSV/gCODrimosso: un valore di crescita impossibile da raggiungere dai batteri idrogeno-produttori. Il tasso di crescita lordo della prima parte risulta essere di 1,19 gSSV/gCODrimosso mentre quello della seconda parte di 1,45 gSSV/gCODrimosso.

In particolare, si passa da valori iniziali pari a 0,53 gSSV/gCODrimosso a valori superiori a 4 gSSV/gCODrimosso per la prima fase e dopo un primo valore inferiore a 2 gSSV/gCODrimosso, tra 2,7 e 3 gSSV/gCODrimosso per la seconda.

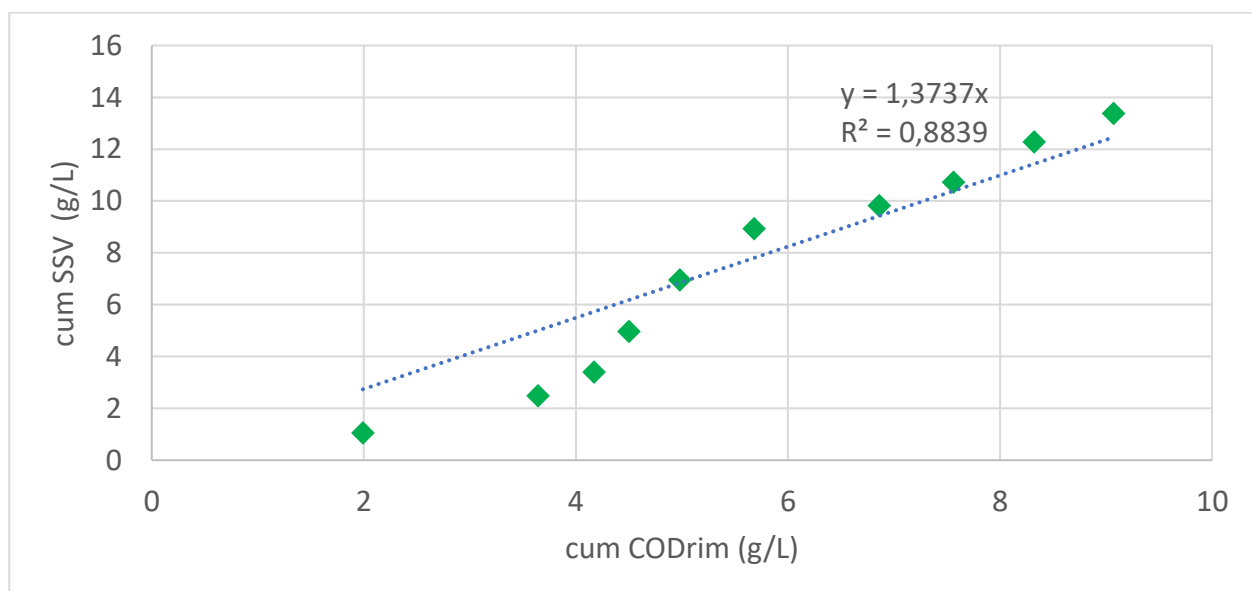


Figura 4.14 Correlazione COD cumulato rimosso e SSV cumulati nel periodo 2

Nel periodo 2 invece si è verificato l'opposto rispetto al periodo 1: ben l'87,5% dei bilanci (tutti tranne uno) non hanno rispettato l'intervallo del 10% con diverse chiusure eccedenti il 20% a causa della presenza dei granuli che ha determinato elevati valori del COD associato ai SSV. Come si evince anche dalla Figura 4.15 il secondo periodo ha una non chiusura media del -16,39. Il COD solubile effluente risulta essere la componente predominante, nello specifico sempre maggiore di 60 gCOD/d, ma mostra una variabilità costante per tutto il periodo. Un maggiore costanza caratterizza le altre due componenti: il COD legato ai SSV, ad esclusione dei primi due bilanci dove i granuli non erano ancora presenti nel reattore, presenta valori costantemente prossimi a 20 gCOD/d. Anche la componente legata all'idrogeno evidenzia un'elevata costanza per tutto il periodo, seppur caratterizzata da valori decisamente inferiori, nello specifico mai superiori a 5 gCOD/d, che rispecchiano le basse produzioni di idrogeno del periodo considerato

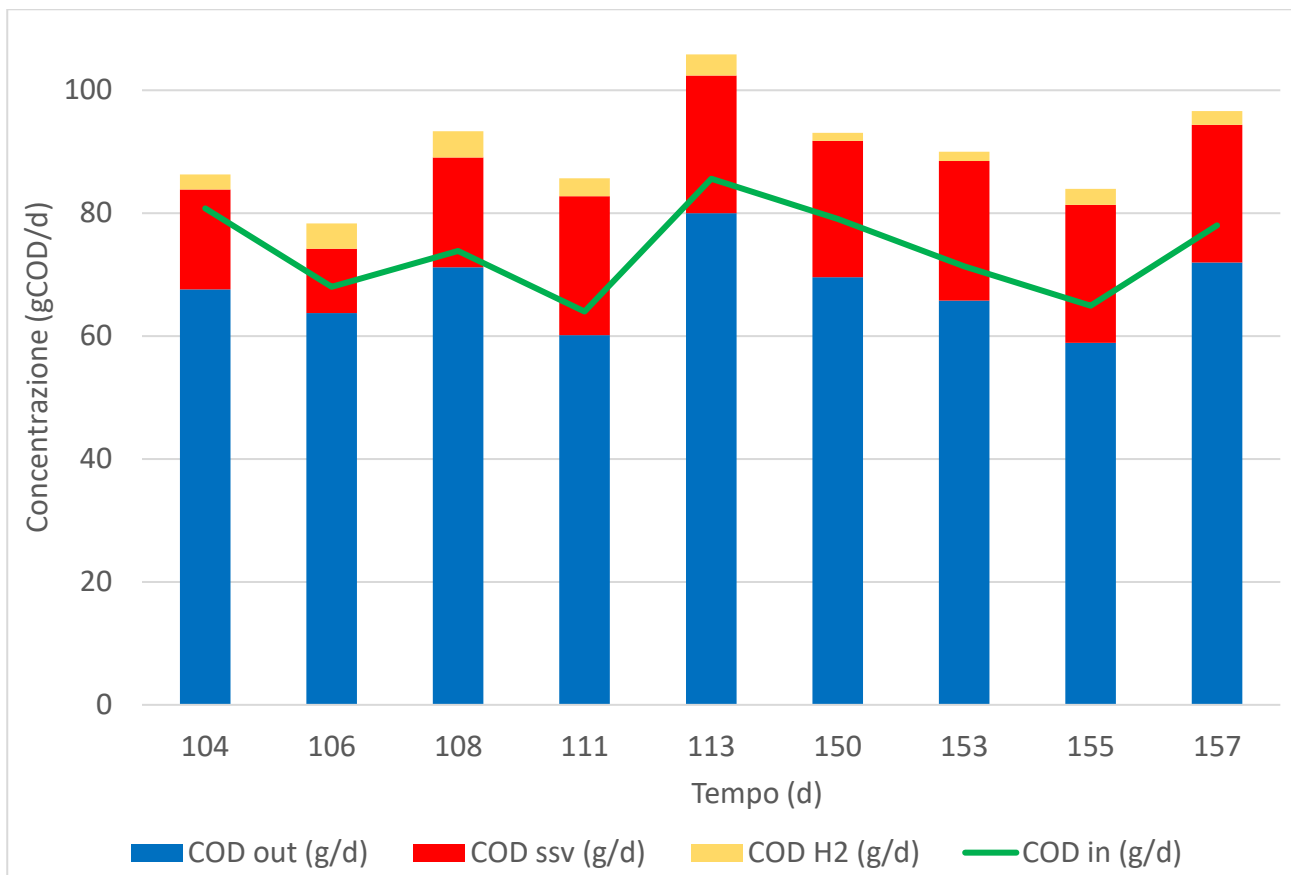


Figura 4.15 Bilancio di massa del periodo 2

Durante il secondo periodo è stata effettuata una sola analisi relativa alla composizione del COD solubile effluente a causa dei numerosi problemi e conseguenti interruzioni al reattore; l'analisi viene riportata in Figura 4.16.

L'analisi del COD solubile effluente ne ha determinato una composizione molto differente rispetto al periodo antecedente: la concentrazione, poco superiore a 5 gCODeq/d, è risultata essere tra le 5 e le 6 volte inferiore rispetto al periodo 1. Le concentrazioni di acido acetico e acido butirrico hanno invece seguito un andamento quasi opposto: quella di acido acetico, prossima a 15 gCODeq/d, è risultata essere superiore, anche se di poco, rispetto alle medesime del periodo 1 (circa 10 gCODeq/d), mentre quella di acido butirrico, prossima 15 gCODeq/d, risulta simile alle concentrazioni riscontrate nell'ultima parte del periodo 1.

Anche nel periodo 2 le concentrazioni di acido propionico e isobutirrico risultano essere trascurabili.

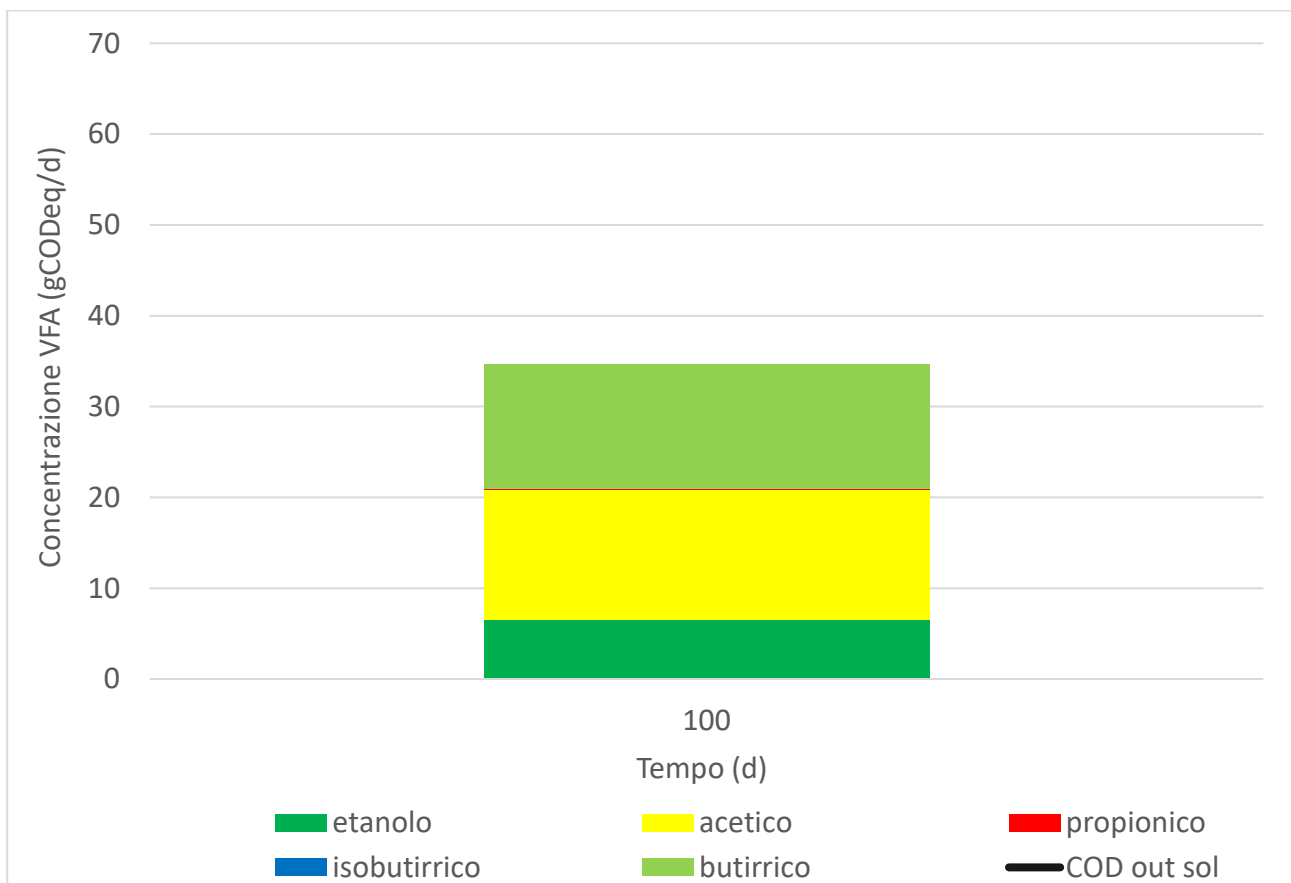


Figura 4.16 Composizione COD solubile effluente periodo 2

4.3 Periodo 3 (26/08/2019 – 21/10/2019)

4.3.1 Risultati

Il periodo 3, durato 48 giorni, dal giorno 218 al giorno 265, (Figura 4.17) mostra produzioni di biogas tra 0,5 e 0,8 NLbiogas/h con due massimi raggiunti ad inizio fase di poco superiori a 0,9 NLbiogas/h. Dopo un primo periodo con valori spesso superiori a 0,6 NLbiogas/h, diverse volte eccedenti anche 0,8 NLbiogas/h, dal grafico si evince un crollo della produzione evidenziato da valori spesso molto inferiori a 0,6 NLbiogas/h. Successivamente, a partire dal giorno 240 si ha un nuovo aumento dei valori che tornano ad assestarsi come ad inizio periodo. Il terzo periodo ha condizioni operative uguali al primo periodo.

Le produzioni di biogas partono già dai primi giorni con valori medi tra 0,7 e 0,9 NL/h superiori a quelli del primo periodo. Anche l'andamento risulta essere differente: nel periodo 1 ad un incremento iniziale segue una stabilizzazione che dura per tutto il periodo, mentre in questo caso già dai primi giorni è evidente una progressiva riduzione delle produzioni, prima leggera e successivamente più marcata, fino a valori molto bassi pari a 0,2 NL/h a cui fa seguito un altrettanto rapido innalzamento.

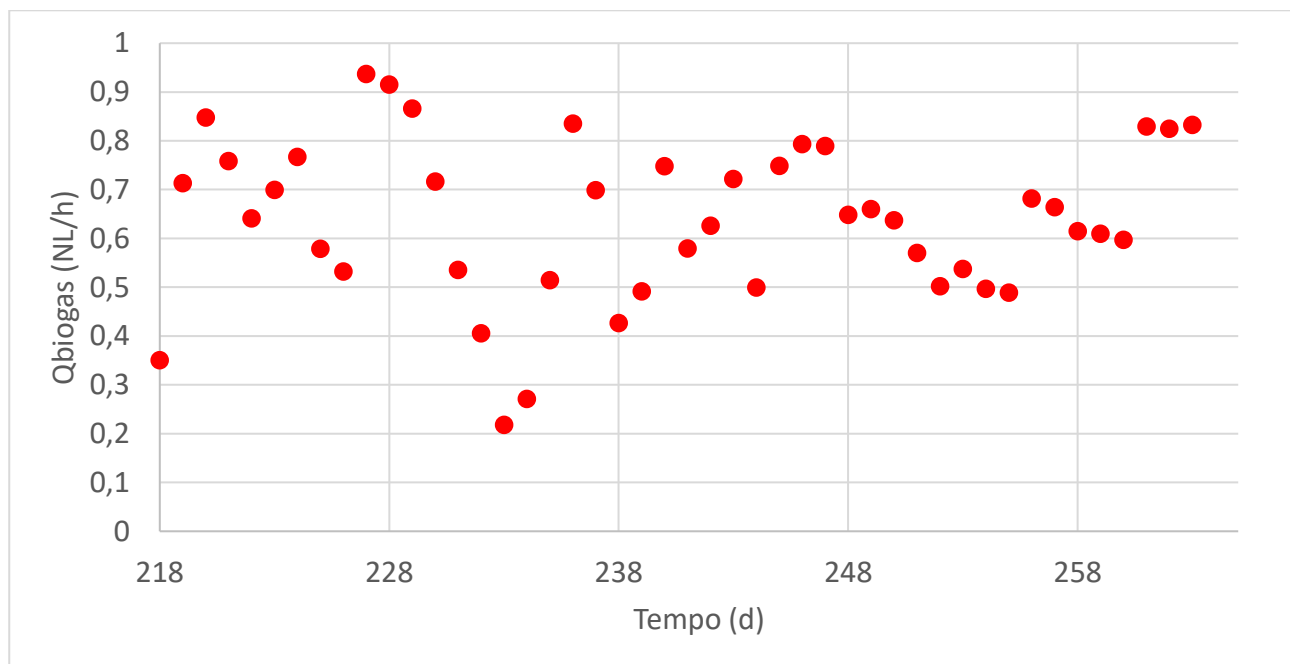


Figura 4.17 Produzione di biogas periodo 3

La composizione del biogas viene riportata in Figura 4.18, da cui si evince la presenza di due parti nel periodo caratterizzate da andamenti molto diversi: la prima parte, dal giorno 218 al giorno 248, corrispondente al periodo caratterizzato da una maggiore variabilità nelle produzioni di biogas, come precedentemente riportato in Figura 4.17, presenta una composizione del biogas perfettamente lineare con ugual presenza di anidride carbonica e idrogeno. La seconda parte, dal giorno 251 al giorno 264, è caratterizzata da una maggiore variabilità a differenza delle produzioni di biogas che presentano maggiori oscillazioni; in particolare, le produzioni di idrogeno inizialmente superiori al 50% subiscono una repentina diminuzione, fino al 45%, per poi tornare ad aumentare fino al termine del periodo raggiungendo valori prossimi al 53%. Opposto è il percorso delle percentuali di anidride carbonica; dopo un inizio con valori inferiori al 50%, subiscono un aumento e una nuova discesa fino a valori finali intorno al 47%.

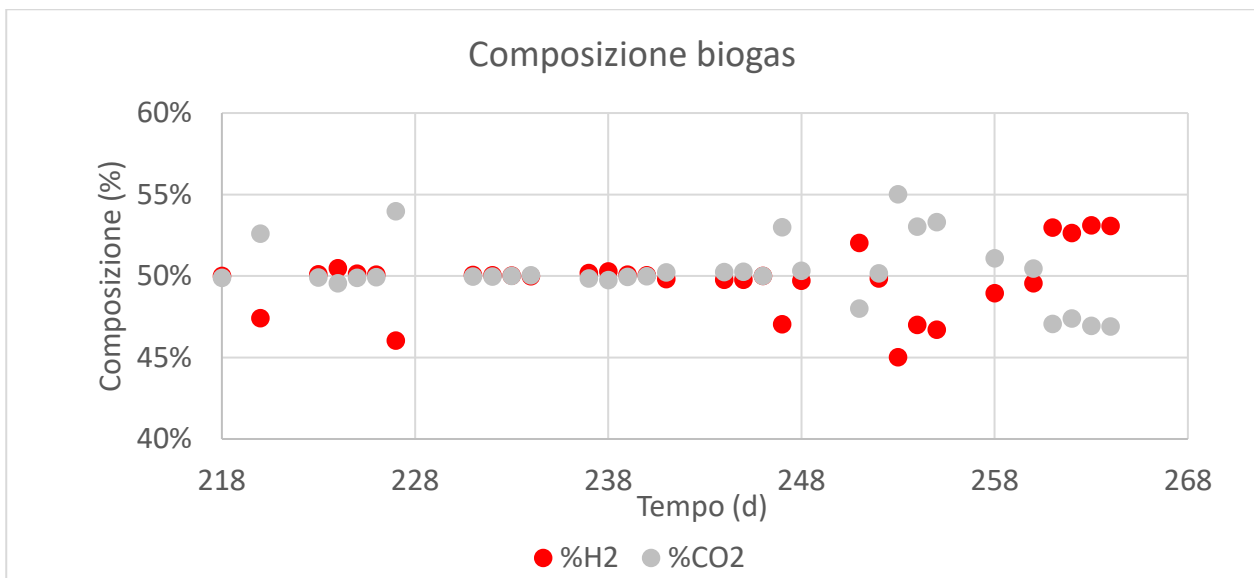


Figura 4.18 Composizione del biogas periodo 3

Il periodo 3 (Figura 4.19) presenta per le produzioni di idrogeno un andamento caratterizzato dall'alternanza di massimi e minimi: le produzioni medie oscillano tra 0,25 e 0,4 NLH₂/h con tre picchi leggermente superiori a 0,4 NLH₂/h, raggiunti sia ad inizio che fine periodo, e con due minimi nella fase centrale con produzioni inferiori a 0,15 NLH₂/h. Coerentemente con gli altri periodi analizzati in precedenza, le produzioni di idrogeno seguono l'andamento di quelle di biogas.

Le efficienze di rimozioni sono leggermente calanti fino al giorno 252: i valori si assestano intorno al 10% (tra 8 e 11%) nella prima parte, mentre intorno all'8% (tra 6 e 10%) nella parte centrale. Le due massime efficienze di rimozioni, pari al 15% e al 21%, sono state raggiunte nella prima parte e alla fine al termine della fase centrale calante. In particolare, al picco centrale con rimozione del COD prossima al 21% raggiunta il giorno 255, non è corrisposta un'altrettanta produzione di idrogeno la quale presenta un valore di 0,24 NLH₂/h, dovuta probabilmente alla necessità da parte dei batteri di usare parte del COD degradato per il proprio fabbisogno energetico.

Rispetto alle produzioni di idrogeno, una minore variabilità è riscontrabile per la rimozione del COD la quale si mantiene tra il 7,5 e il 12,5% lungo tutto il periodo, ad eccezione dei due massimi sopra il 15% e dei due minimi sotto il 7,5%, ma con valori sempre inferiori rispetto al primo periodo: da una rimozione percentuale media del 15% (Figura 4.3) si è passati a una media del 10% (Figura 4.15), valori quasi dimezzati rispetto a tesi precedenti (Gugliandolo 2017, Zappulla 2018) in cui, per condizioni operative e caratteristiche del siero identiche, si sono oltretutto raggiunte efficienze medie superiori al 20%.

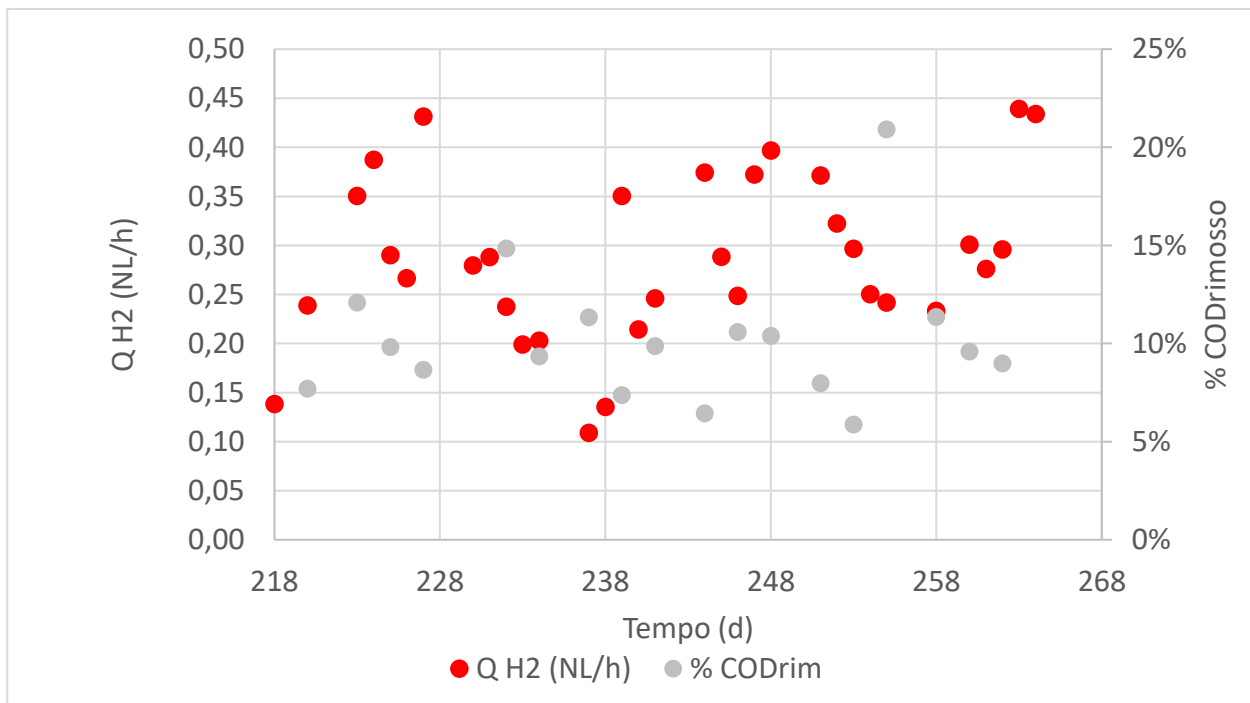


Figura 4.19 Produzione di idrogeno ed efficienza di rimozione del COD periodo 3

Il terzo periodo presenta buone rese di produzione (Figura 4,20): nella prima parte i valori sono molto variabili e in particolare oscillano tra 0,7 a 2,4 moli H₂/moli lattosio, mentre nella seconda parte, a partire dal giorno 248, si assestano tra 1,4 e 1,7 moli H₂/moli lattosio. I due picchi, pari a 2,5 moli H₂/moli lattosio, vengono raggiunti nella parte centrale e nell'ultimo giorno di misurazione mentre il minimo, pari a 0,7 moli H₂/moli lattosio nella fase centrale a testimoniarne la discontinuità.

Le rese di produzione di idrogeno, oscillanti tra 1 e 2 moli H₂/moli lattosio, risultano essere dimezzate rispetto a quelle del primo periodo in coerenza con le minori produzioni di idrogeno. Le rese presentano valori invece simili alla prima fase del secondo periodo (Figura 4.11), caratterizzata da valori siti tra 1 e 1,8 moli H₂/moli lattosio, in coerenza con produzioni simili di idrogeno: 0,25 moli H₂/moli lattosio per la prima fase del secondo periodo e 0,3 moli H₂/moli lattosio per il terzo.

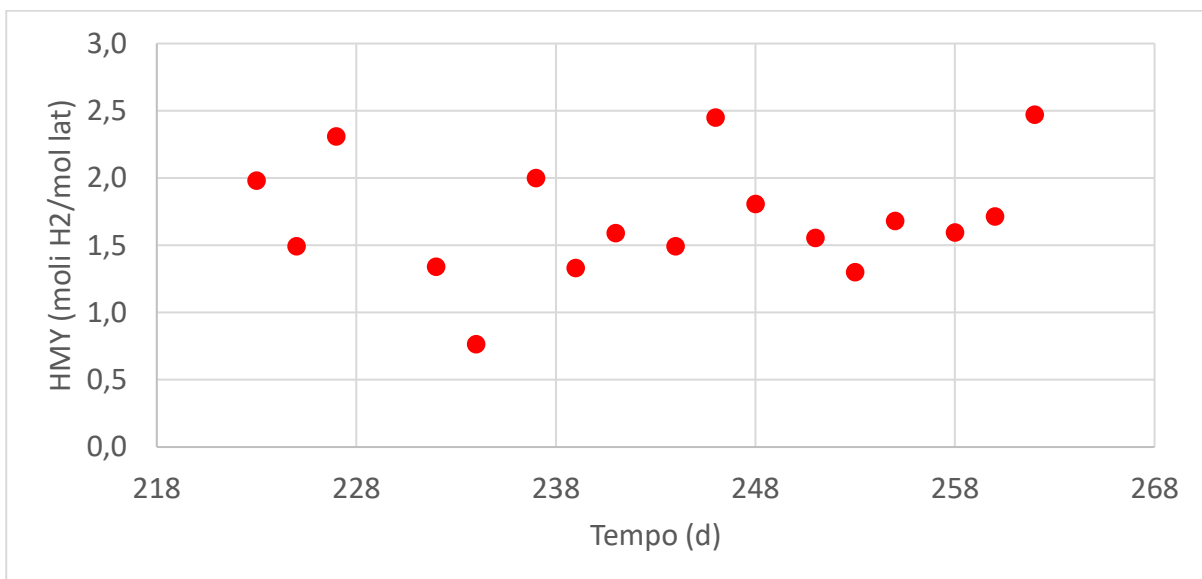


Figura 4.20 Rese di produzione di idrogeno del periodo 3

Il terzo periodo, per quanto riguarda le concentrazioni dei SSV, è caratterizzato da un doppio andamento: la prima parte, fino al giorno 244, è caratterizzata da concentrazioni costanti e compresi tra 0,4 e 0,6 gSSV/L mentre la seconda parte, dal giorno 246 al giorno 262 coincidente con il termine del periodo, in cui si evince un andamento costantemente crescente delle concentrazioni che passano da valori pari a 0,7 gSSV/L a valori circa pari a 0,9gSSV/L.

A differenza del primo periodo in cui le concentrazioni rimangono sempre costanti, in questo esse (Figura 4.21) aumentano nella seconda parte passando da 0,6 a 0,7-0,8 gSSV/L; tali incrementi sono riscontrabili anche in studi precedenti (Togui), con condizioni operative identiche in termini di temperatura e pH e con concentrazioni che passavano da 0,7 gSSV/L a 0,9 gSSV/L.

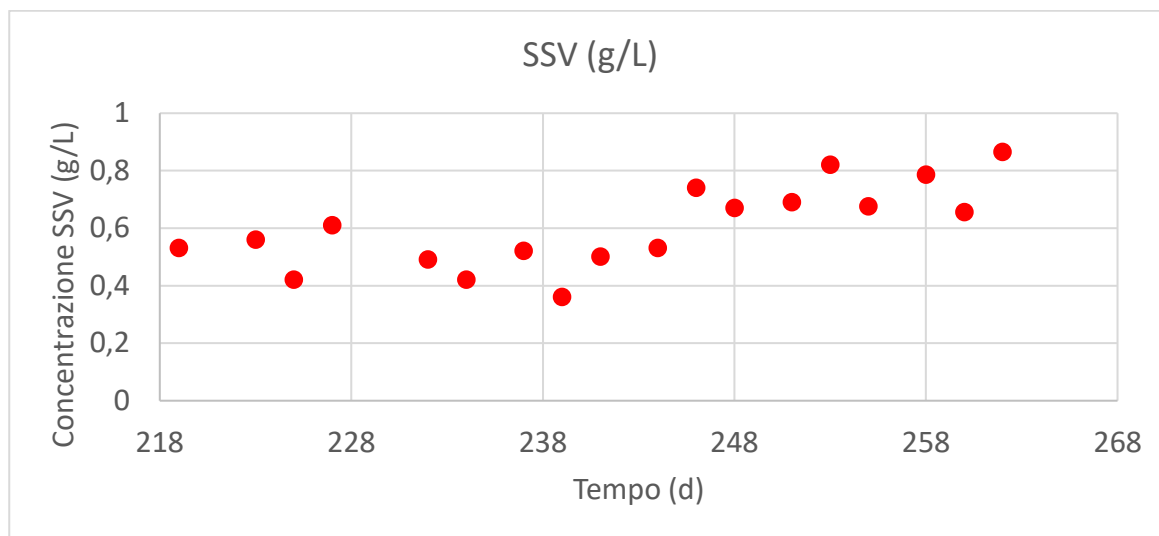


Figura 4.21 Concentrazioni SSV nel periodo 3

Come si evince dal Figura 4.22, il terzo periodo è caratterizzato da punti che si dispongono costantemente intorno alla retta: la correlazione tra i due parametri, evidenziata anche da un coefficiente di correlazione molto elevato e prossimo a 0,98, è molto buona. Ad una parte centrale caratterizzata da punti che si dispongono leggermente al di sotto della retta segue immediatamente una parte finale esattamente opposta. Le migliori correlazioni, come riportato in figura, si trovano nella parte iniziale dove i valori si sovrappongono alla retta sintono di una correlazione molto forte. La parte iniziale, come confermato dal grafico, presenta un R^2 pari a 0,972 da cui si evince una produzione di SSV derivante dalla degradazione del COD. La parte centrale ha un R^2 di 0,957, leggermente inferiore rispetto alla prima parte e nella quale non tutto il COD degradato dai batteri comporta una produzione di SSV; la parte finale invece presenta un R^2 di 0,944, in cui la disposizione dei punti indica una produzione di SSV proveniente non solo dalla degradazione del COD operata dai batteri.

Il tasso di crescita lordo complessivo risulta pari a 0,66 gSSV/gCOD rimosso, leggermente superiore rispetto al periodo 1. Quello della seconda parte è prossimo a 0,6 gSSV/gCOD rimosso, risultando quindi il più realistico anche se comunque troppo elevato, mentre il tasso di crescita lordo della parte finale è di 0,68 gSSV/gCOD rimosso.

Il tasso di crescita inoltre, mostra un andamento molto diversificato all'interno dello stesso periodo: ad una prima fase caratterizzata da forte discontinuità, con valori oscillanti tra 0,45 e 1 gSSV/gCODrimosso, segue una parte centrale caratterizzata da tassi di crescita cellulari inizialmente minori ma costantemente crescenti; si passa infatti da valori pari a 0,4 gSSV/gCODrimosso a valori di poco inferiori a 1 gSSV/gCODrimosso, con il massimo pari a 1,5 gSSV/gCODrimosso raggiunto al termine della parte stessa. La parte finale torna ad avere tassi di crescita variabili come nella prima parte, ma superiori e compresi tra 0,6 e 0,8 gSSV/gCODrimosso.

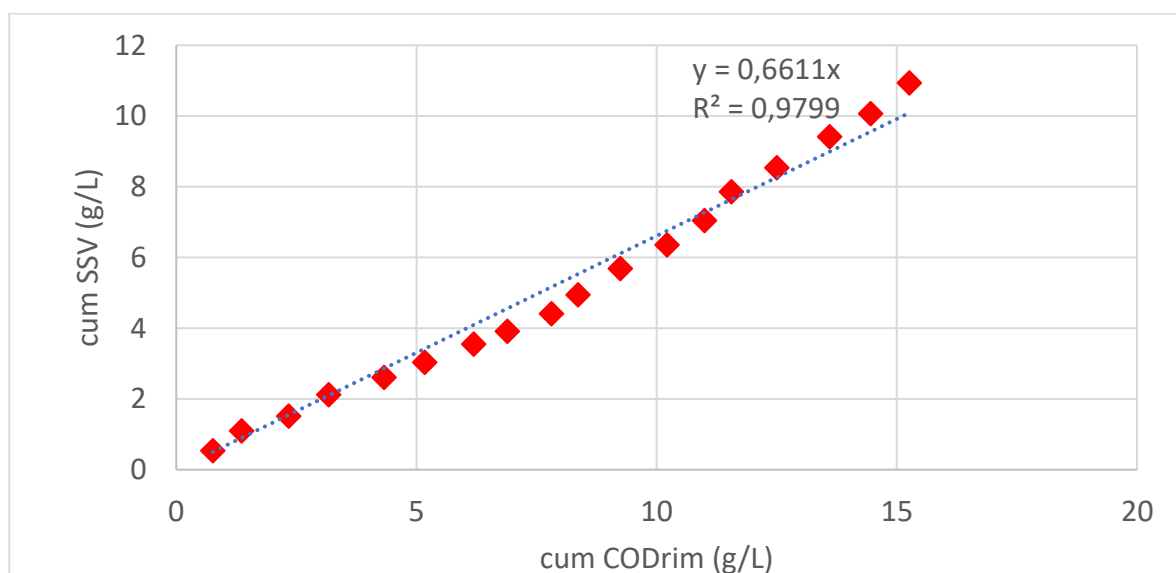


Figura 4.22 Correlazione COD cumulato rimosso e SSV cumulati nel periodo 3

Il periodo 3 presenta le migliori chiusure del bilancio con un valor medio del -4,74, con anche diversi bilanci di massa che presentano una chiusura con errore dello 0% (Figura 4.23).

Le concentrazioni di COD solubile effluente risultano essere le maggiori con valori costantemente superiori a 60 gCOD/d, ad eccezione dei bilanci 232 e 255 corrispondenti ai giorni in cui si sono verificati i due picchi di degradazione del COD pari rispettivamente al 15 e al 21%. Le componenti legate invece ai SSV e all'idrogeno risultano essere sempre inferiori a 10 gCOD/d per tutto il periodo ma in leggera crescita nella seconda parte, a partire dal giorno 246. I bilanci relativi ai giorni 232 e 255, nonostante le elevate rimozioni, presentano bassi valori di COD legati all'idrogeno concordando con quanto detto in precedenza circa le basse produzioni di idrogeno riscontrate in quei giorni.

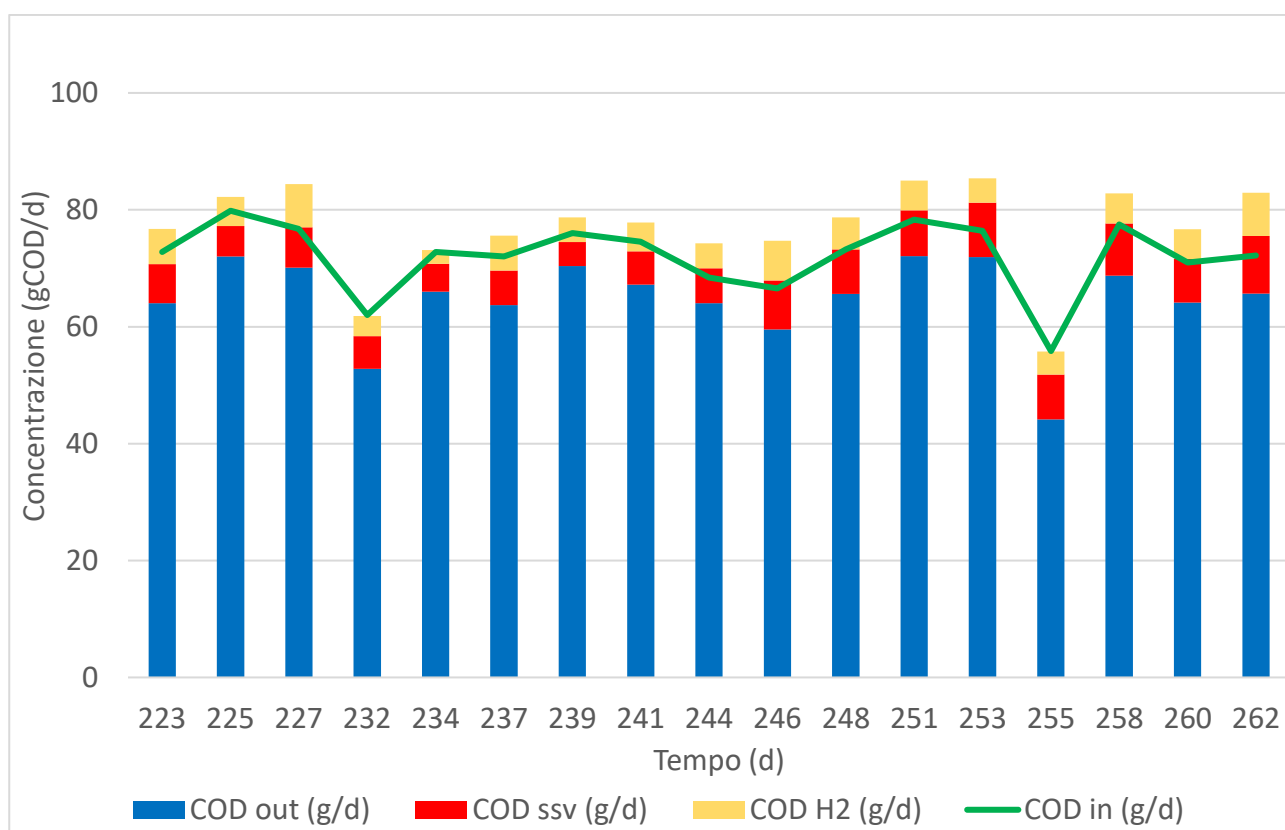


Figura 4.23 Composizione del COD effluente periodo 3

Le concentrazioni degli acidi volatili nel COD solubile effluente, riportate in Figura 4.24, presentano un andamento ben definito: le concentrazioni di etanolo risultano essere costantemente decrescenti, passano infatti da valori prossimi a 25 gCODeq/d del giorno 223 a valori tre volte inferiori del giorno 255. Identico andamento è anche quello delle concentrazioni relative all'acido acetico: si passa da valori intorno ai 10 gCODeq/d a valori finali più che dimezzati prossimi a 4 gCODeq/d. Opposto è il trend dell'acido butirrico, il quale passa da valori iniziali prossimi a 10 gCODeq/d a valori finali doppi, con il picco di 30 gCODeq/d raggiunto il giorno 248 a cui è associata, come da letteratura, un'elevata produzione di idrogeno, pari a 0,4 NLH₂/h.

Le concentrazioni di acido propionico e isobutirrico risultano essere presenti in quantitativi leggermente superiori rispetto ai periodi precedenti, ma ugualmente trascurabili.

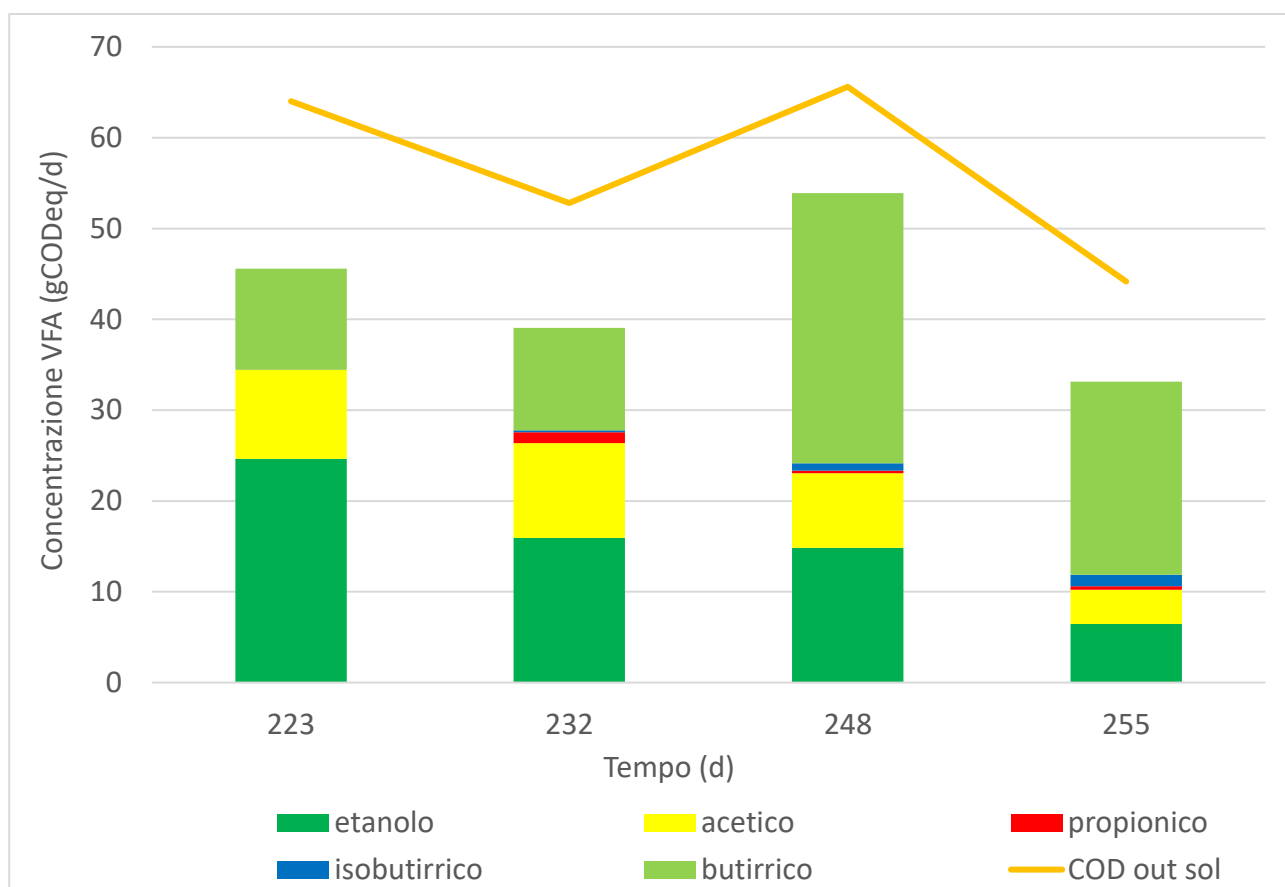


Figura 4.24 Composizione COD solubile effluente periodo 3

4.4 Periodo 4 (22/10/2019 – 11/12/2019)

4.4.1 Risultati

Il periodo 4, nel quale il reattore ha operato in termofilia, può essere suddiviso in 2 parti: la prima della durata di 20 giorni, dal giorno 266 al giorno 285, condotta con una temperatura di 55°C e la seconda della durata di 31 giorni, dal giorno 286 al giorno 316, condotta ad una temperatura di 50°C. Le analisi sono state condotte soltanto con temperatura pari a 50°C a causa delle diverse problematiche riscontrate dal reattore ad operare a 55°C.

La produzione di biogas è stata caratterizzata da produzioni medie complessive anche 10 volte più basse rispetto agli altri periodi (Figura 4.25), in particolare mai superiori a 0,085 NLbiogas/h. Nonostante le ridotte produzioni dal grafico si evincono tre andamenti: il primo molto discontinuo, tipico della prima parte, con valori oscillanti tra 0,04 e 0,081 NLbiogas/h, un secondo caratteristico della parte centrale, dal giorno 302 al giorno 309, con produzioni costanti tra 0,05 e 0,06 NLbiogas/h, ed infine una parte finale crescente con valori che passano da 0,06 a 0,08 NLbiogas/h.

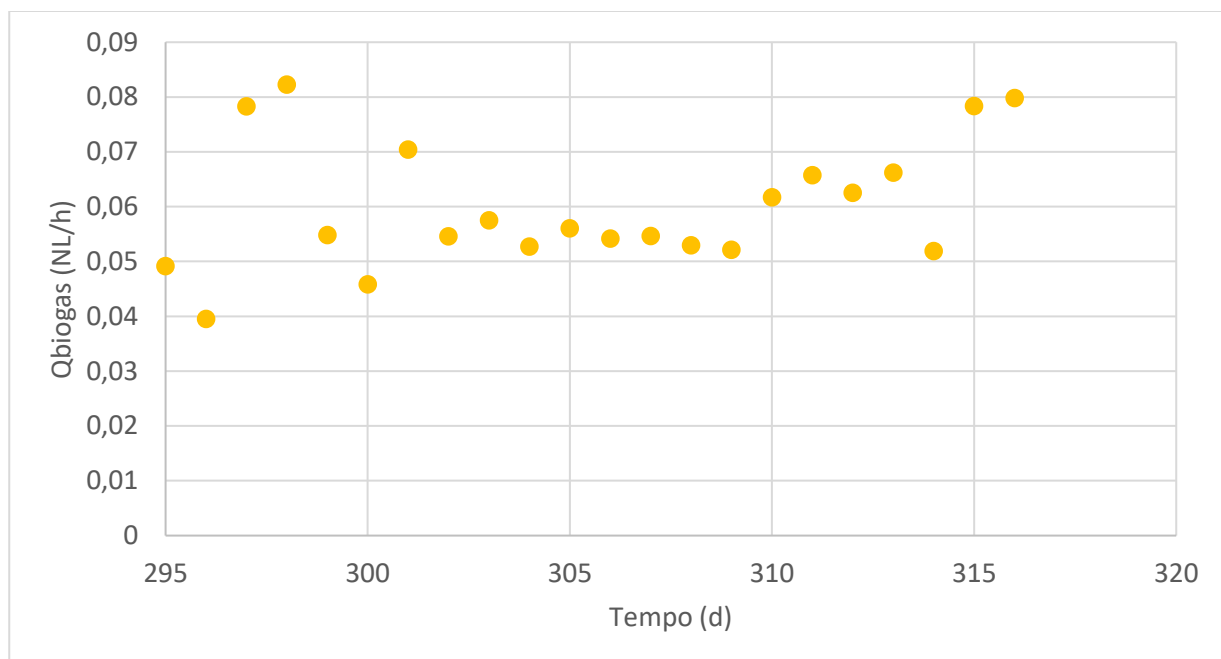


Figura 4.25 Produzioni di biogas e di idrogeno periodo 4

La composizione del biogas (Figura 4.26) può essere scissa in tre parti: la prima della durata di 7 giorni, dal giorno 295 al giorno 302, caratterizzata da una variabilità della composizione nulla e in cui le percentuali di idrogeno sono state prossime al 20%, quattro volte meno rispetto a quelle di anidride carbonica. Una parte centrale di 6 giorni, dal giorno 303 al giorno 309, caratterizzata da una quasi costante diminuzione delle percentuali di anidride carbonica a favore dell'ossigeno, con valori poco superiori al 50% e poco inferiori al 50% rispettivamente. Infine, la parte finale di 6 giorni, caratterizzata da valori costanti e molto simili delle due percentuali; in particolare la percentuale di idrogeno è risultata essere, tranne che per il giorno 313, inferiore a quella dell'anidride carbonica.

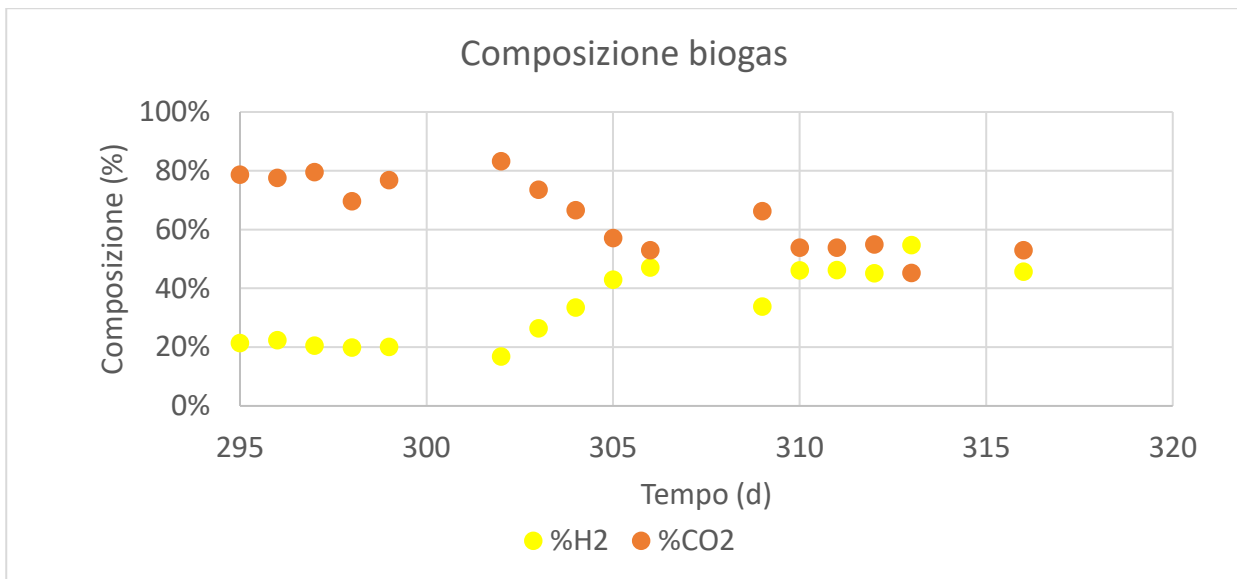


Figura 4.26 Composizione del biogas periodo 4

Le produzioni di idrogeno mostrano un andamento crescente per tutto il periodo (Figura 4.27) ad esclusione di un crollo, corrispondente al minimo, nel giorno 304 in cui la produzione è stata nulla a causa di problemi legati alla mancanza di corrente in laboratorio. Durante il periodo termofilo le produzioni di idrogeno quadruplicano passando da valori pari a 0,01 NLH₂/h tipici dei primi giorni ad un valore finale massimo di 0,045 NLH₂/h.

Riduzioni simili ai parametri produttivi si riscontrano anche per le efficienze di rimozione del COD (Figura 4.27): esse risultano essere oscillanti tra il 2 e il 6% quindi tre volte inferiori se confrontate con il primo periodo e dimezzate rispetto al terzo. Rispetto invece a tutti i periodi precedenti, le efficienze di degradazione del COD mostrano un andamento molto discontinuo ma mediamente decrescente, in contrasto con le produzioni di idrogeno le quali presentano un andamento opposto; ad un picco del 13% fa seguito un rapido crollo delle efficienze quasi sempre al di sotto del 7%, ma allo stesso tempo estremamente variabili con diversi minimi, disposti equamente nel periodo, in cui le efficienze di rimozione del COD si assestano intorno al 1%, coerenti con i parametri produttivi precedentemente analizzati: produzioni quasi nulle di biogas e idrogeno.

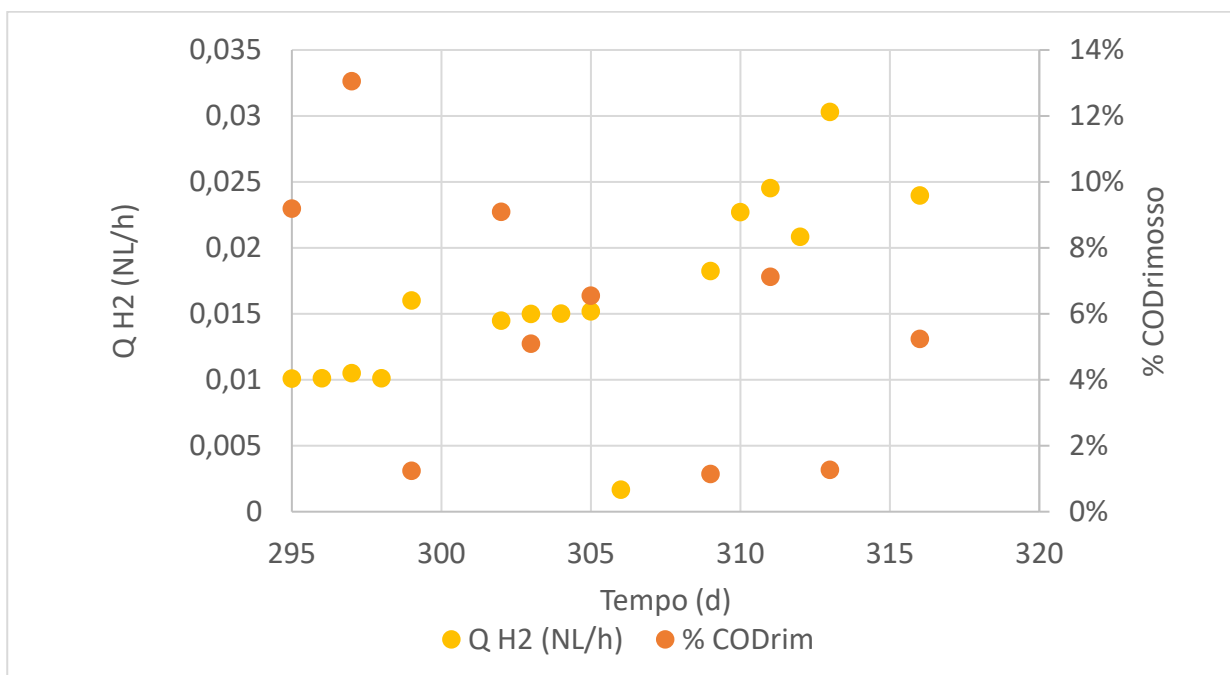


Figura 4.27 Produzione di idrogeno ed efficienza di degradazione del COD periodo 4

Il periodo 4 termofilo (Figura 4.28) presenta le rese decisamente più basse: l'andamento dei valori è crescente, infatti si passa da rese di 0,05 moli H₂/moli lattosio a rese doppie e pari a 0,18 moli H₂/moli lattosio, comunque valori molto bassi.

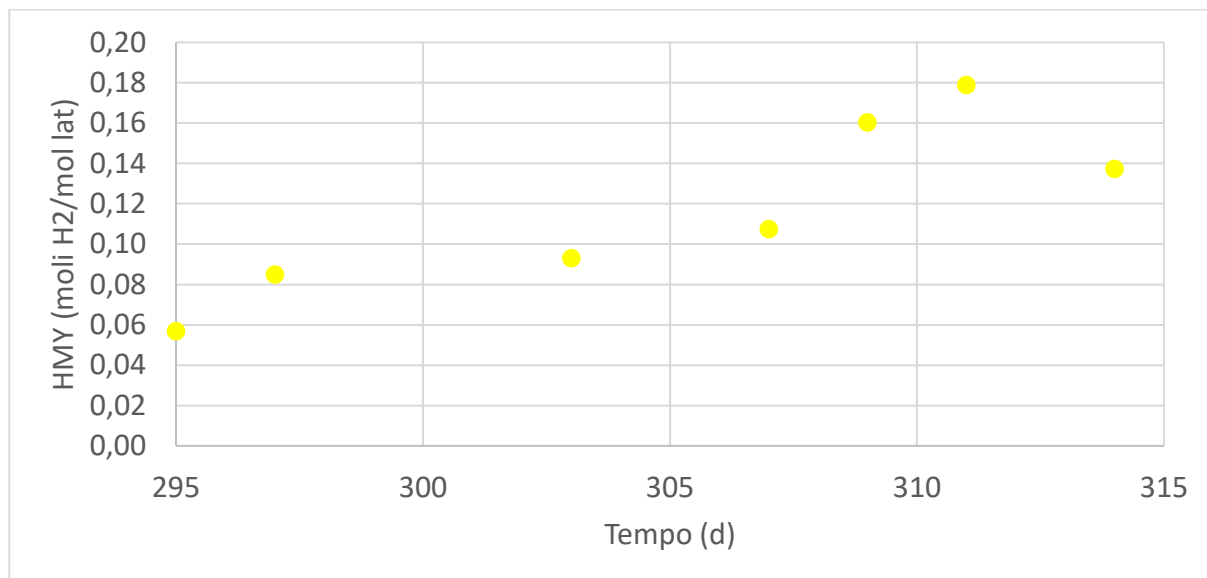


Figura 4.28 Resa di produzione di idrogeno del periodo 4

Le bassissime produzioni di idrogeno determinano rese estremamente basse, sempre inferiori a 0,2 moli H₂/moli lattosio, a differenza della letteratura in base alla quale all'aumento della temperatura corrisponde un aumento delle rese di produzione (Lin e Chang 2004; Li e Fang 2007). In particolare, Azbar (2009) in condizioni termofile e con HRT pari a 3,5h quindi maggiormente sfavorevoli, ha ottenuto rese di produzione di idrogeno decisamente superiori, le quali sono riportate in Tabella 4.1.

Tabella 4.1 Rese di produzione di idrogeno in termofilia

Parametri	Azbar et al. 2009	Questa sperimentazione
Temperatura (°C)	55	50
pH	5,5	5,5
HRT (h)	3,5	9
Resa di produzione di idrogeno HMY	22,00 mmolH ₂ /gCOD corrispondenti a 8,43 molH ₂ /mol lattosio	< 0,2 molH ₂ /mol lattosio

*PM lat = 342,3 g lat/mol lat, CODEq,lat = 1,12 g COD/g lat

Le concentrazioni di SSV nel quarto periodo (Figura 4.29) si mantengono in un intervallo di 0,7-0,9 gSSV/L, con un massimo pari a 0,98 gSSV/L, a cui segue la minima concentrazione pari a 0,62 gSSV/L, in linea con i precedenti periodi. Concentrazioni così elevate di SSV rispetto a efficienze di degradazione del COD molto esigue possono essere dovute a concentrazioni superiori dei SSV nel siero utilizzato per il periodo termofilo.

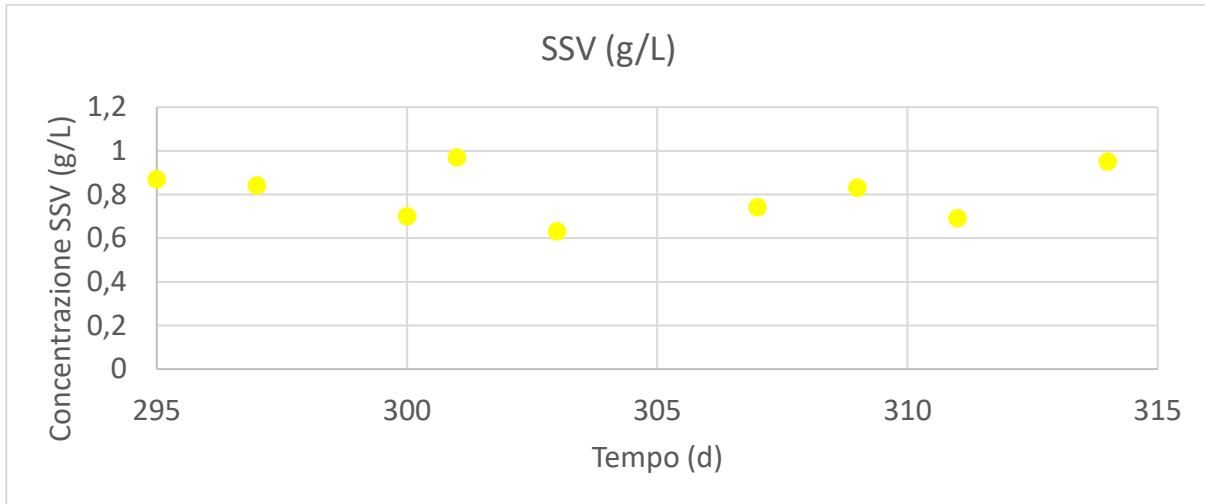


Figura 4.29 Concentrazioni SSV nel periodo 4

Dal grafico (Figura 4.30) si evince un buon coefficiente di correlazione lineare pari a 0,9373. I punti di dispongono nelle parti iniziali e centrali del periodo al di sotto della retta, mentre al di sopra nella parte finale: in entrambi i casi la distanza è bassa a causa della reciproca dipendenza delle cumulate del COD e dei SSV. Il valore del coefficiente angolare, pari alla Y netta, è molto elevato e pari a 1,456 gSV/gCOD rimosso; tale valore è 10 volte superiore ai tassi di crescita cellulare dei batteri idrogeno-produttori. Il raggiungimento di un valore così elevato è causato dalle bassissime rese di degradazione del COD che, unite a buone concentrazioni di SSV nel reattore, portano a determinare questo tasso di crescita cellulare.

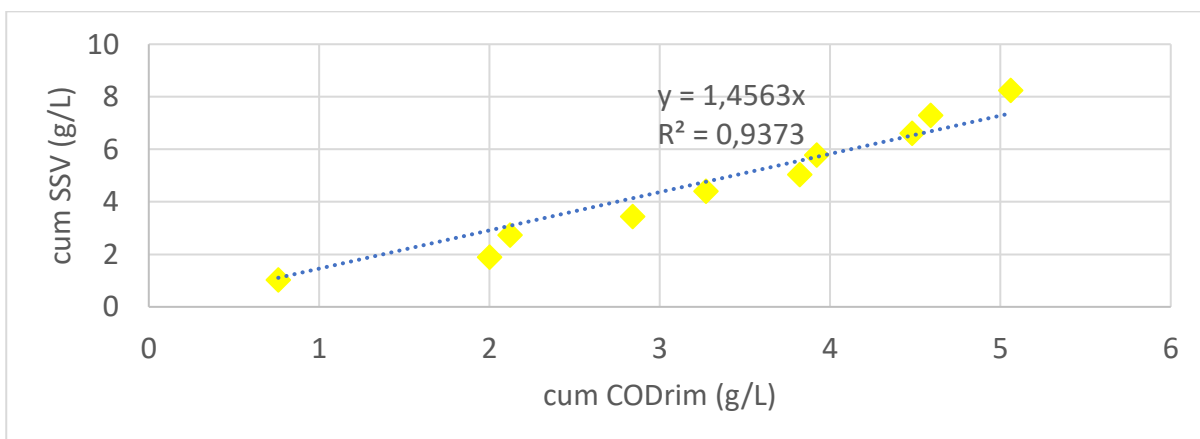


Figura 4.30 Correlazione COD cumolato rimosso e SSV cumulati nel periodo 4

I bilanci di massa del periodo 4 riportati in Figura 4.31, presentano le migliori chiusure; tutti infatti presentano un errore inferiore al 10%, con una non chiusura media del -5,75%.

Il COD solubile effluente risulta essere largamente predominante, con valori sempre superiori a 60 gCOD/d. Il COD associato ai SSV mostra valori costanti per tutto il periodo e prossimi a 10 gCOD/d; nullo invece è il COD legato all'idrogeno, diretta conseguenza delle produzioni del periodo termofilo.

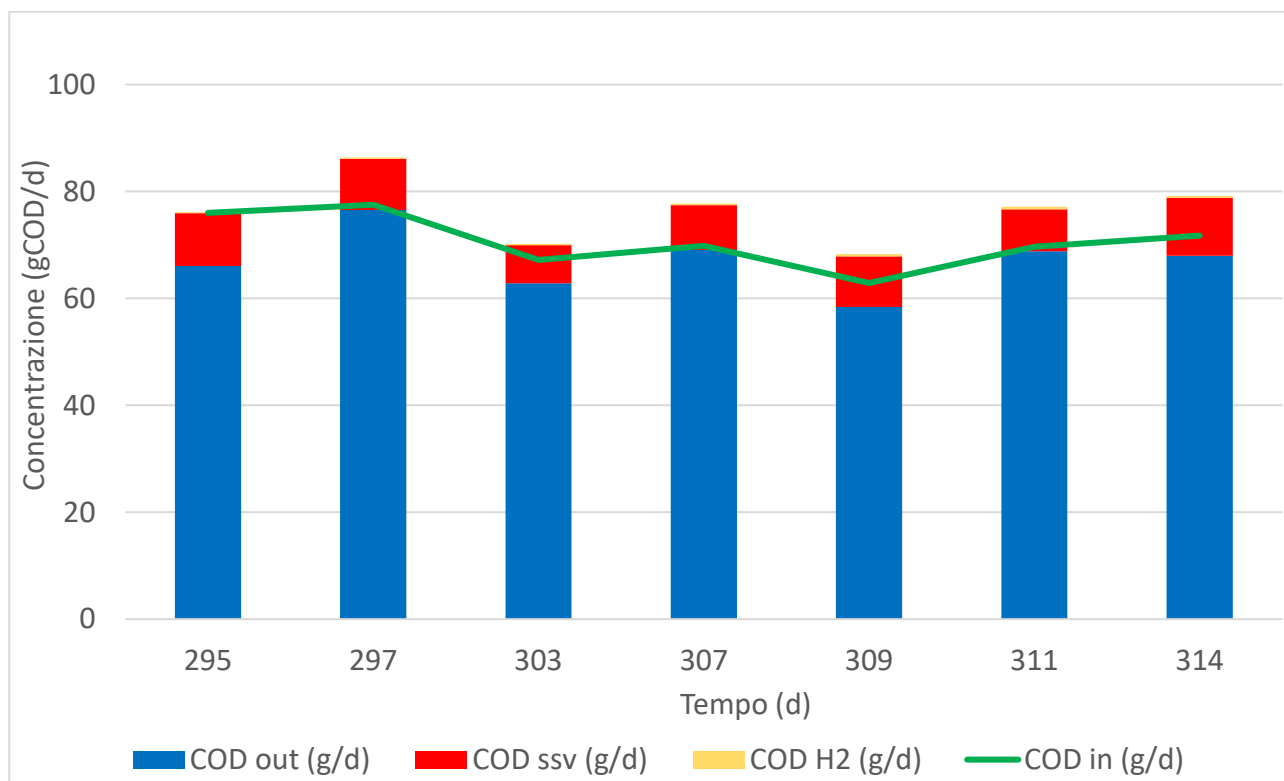


Figura 4.31 Bilancio di massa del COD del periodo 4

La composizione del COD solubile effluente (Figura 4.32) presenta elevate percentuali di etanolo, quasi sempre superiori al 50%, ed acetico; nulle sono invece quelle di butirrico a differenza sia dei precedenti periodi sia della letteratura in base alla quale ad un incremento della temperatura corrisponde un aumento della produzione di acido butirrico a discapito dell'etanolo (Mu et al; 2006). Nulle risultano essere invece le concentrazioni di acido propionico, mentre maggiori sono quelle di acido isobutirrico che si assestano, solo per i giorni 300 e 307, intorno a 2 gCODeq/d, andando a costituire il 10-15% del totale.

La somma delle concentrazioni degli acidi volatili nei campioni analizzati presentano valori complessivamente molto bassi rispetto al valore di COD solubile effluente riportato nel precedente grafico. Per questa ragione, in corrispondenza dei giorni 300 e 307, sono state effettuate delle analisi sulle concentrazioni di lattosio al fine di andare ad analizzare le elevate differenze, in termini di concentrazioni, tra il COD solubile effluente del periodo 4, riportato in Figura 4.31 il cui valor medio risulta circa pari a 70 gCOD_{out,sol}/d, e il COD solubile effluente, dato dalla somma dei diversi acidi

volatili, riportato in Figura 4.32, avente un valor medio circa di 10 gCOD_{out,sol}/d. Gli elevati valori di lattosio riscontrati nel periodo 4 (Tabella 4.2) da soli non riescono a coprire la discrepanza di circa 60 gCOD_{out,sol}/d tra i due COD misurati: questo è emblematico della significativa presenza di ulteriori sostanze non identificate nell'effluente.

Periodo	Giorno	Lattosio,in (gCOD/d)	Lattosio,out (gCOD/d)
Periodo 3	253	7,858	0,878
Periodo 3	255	6,460	0,573
Periodo 4	300	8,646	6,782
Periodo 4	307	6,252	5,657

Tabella 4.2 Concentrazione lattosio influente ed effluente

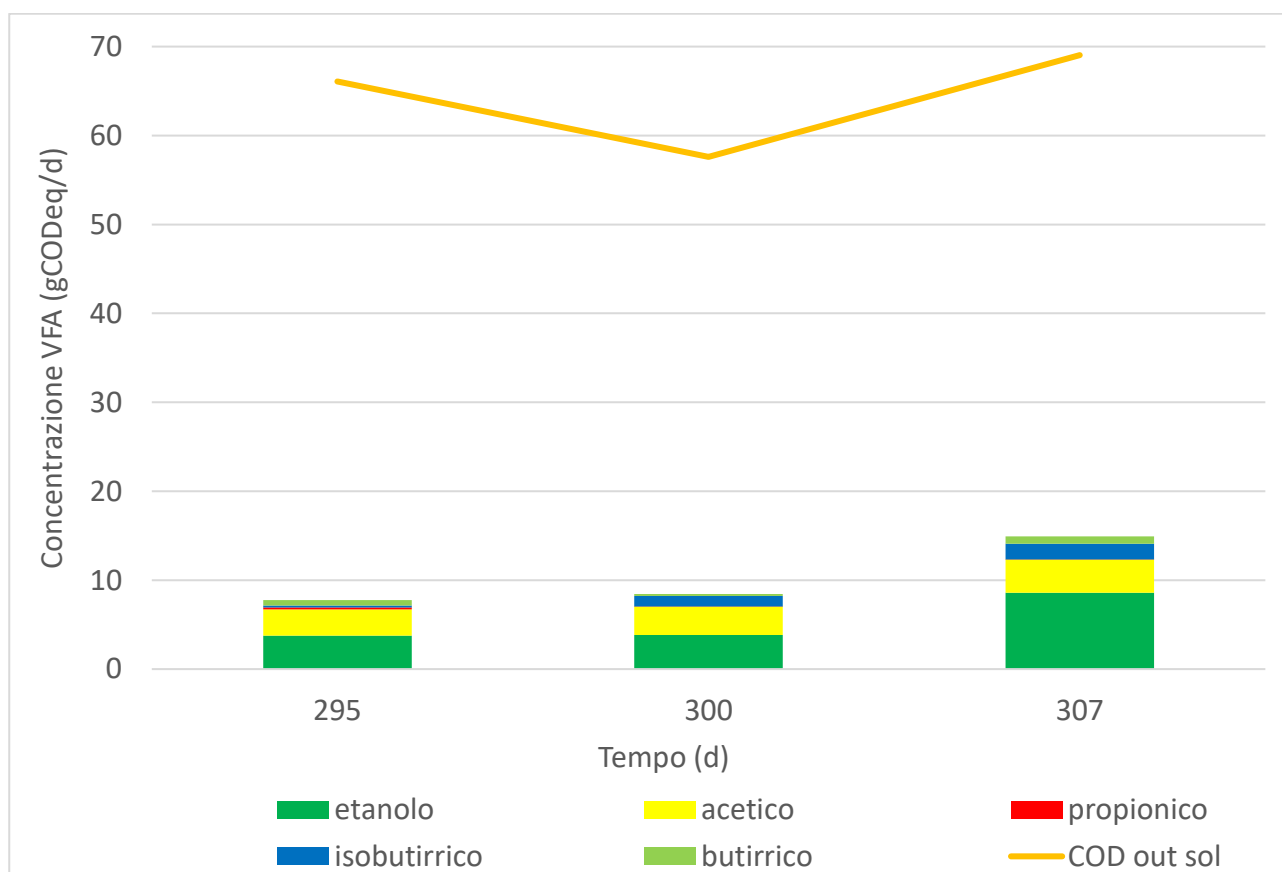


Figura 4.32 Composizione COD solubile effluente periodo 4

4.5 Confronto tra periodi

La composizione del biogas prodotto nei 4 periodi viene riportata nella Tabella 4.3.

Tabella 4.3 Composizione percentuale del biogas prodotto

Periodi	Portata biogas (NL/h)	Portata idrogeno (NLH ₂ /h)	%H ₂
Periodo 1	0,998 ± 0,23	0,577 ± 0,16	50-55
Periodo 2	0,391 ± 0,17	0,189 ± 0,08	45
Periodo 3	0,632 ± 0,16	0,301 ± 0,08	50
Periodo 4	0,060 ± 0,12	0,024 ± 0,01	35

Le migliori percentuali di idrogeno pari al 50/55% corrispondono ai periodi di massima produzione di biogas e di idrogeno, ovvero primo e terzo. Il periodo termofilo è invece caratterizzato dai valori peggiori, sia in termini produttivi sia percentuali, dovuti alle difficoltà riscontrate ad operare in tali condizioni; tali risultati risultano essere contrastanti con la letteratura in quanto ad un aumento della temperatura consegue un aumento delle percentuali di idrogeno nel biogas prodotto (Lin e Chang 2004; Li e Fang 2007). Caratteristica comune a tutti i periodi è l'assenza di metano nel biogas prodotto, simbolo di una corretta inibizione dell'attività metanigena.

Di seguito vengono riportati gli istogrammi delle medie dei parametri precedentemente analizzati con relativa deviazione standard.

Nel caso della produzione di biogas (Figura 4.33) e di idrogeno (Figura 4.34) si notano produzioni medie molto differenti: il periodo 1 è caratterizzato da produzioni medie pari circa a 1 NL/h mentre quelle di idrogeno leggermente inferiori a 0,6 NLH₂/h. Produzioni quasi dimezzate sono invece quelle del periodo 3: la produzione di biogas è di poco superiore agli 0,6 NL/h mentre quella media di idrogeno è esattamente la metà e pari a 0,3 NLH₂/h.

Il periodo 2 è invece da caratterizzato da valor medi di produzioni ancor più bassi: quelle di biogas leggermente inferiori a 0,4 NL/h mentre quelle di idrogeno tre volte inferiori a quelle del periodo 1 e pari a 0,2 NLH₂/h.

Il periodo peggiore in termini produttivi è il periodo 4 termofilo. Le produzioni sia di biogas sia di idrogeno sono estremamente basse: quelle di biogas quasi pari a 0,1 NL/h e quelle di idrogeno pari a 0,05 NLH₂/h, ovvero quattro volte inferiori al periodo 2 e 10 volte inferiori al periodo 1.

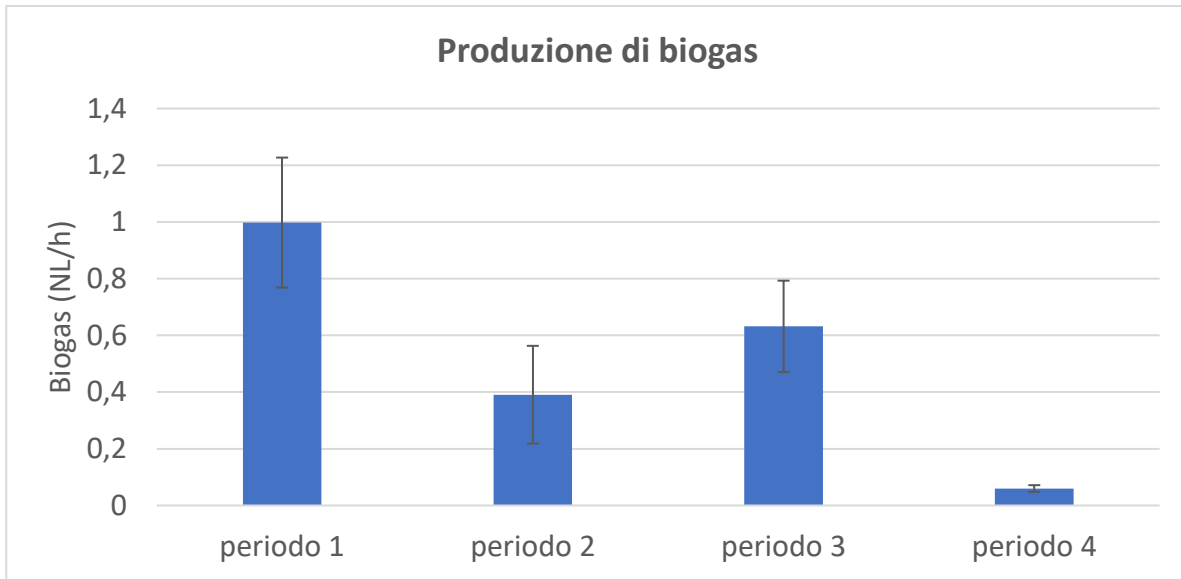


Figura 4.33 Produzioni medie di biogas

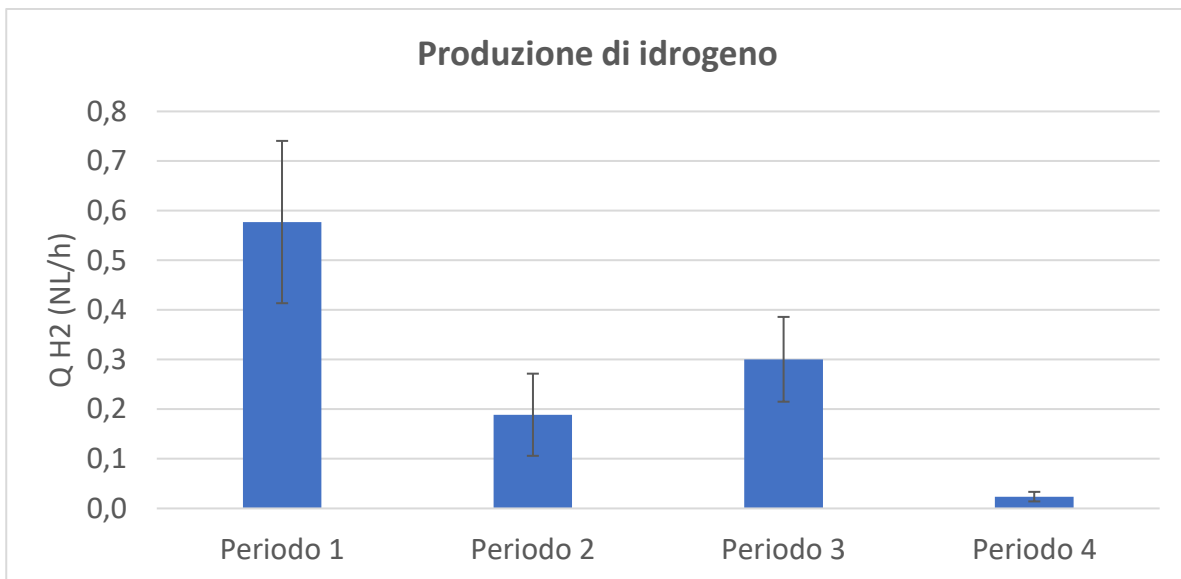


Figura 4.34 Produzioni medie di idrogeno

Una minore variabilità dei valori medi si evince invece analizzando la composizione del COD totale effluente riportata in Figura 4.35 e calcolata come segue (Eq 4.1):

$$\text{COD}_{\text{out}} = \text{COD}_{\text{sol,out}} + \text{COD}_{\text{ssv}} + \text{COD}_{\text{H}_2} \quad \text{Eq 4.1}$$

Per tutti e quattro i periodi la componente solubile effluente del COD è largamente la predominante: le medie dei primi due periodi sono quasi identiche con valori di poco inferiori all'80%. Gli altri due periodi sono caratterizzati da medie leggermente superiori: il periodo 3 ha una media dell'82% e il periodo 4 dell'85%.

Una maggiore differenza di valori medi caratterizza la componente del COD legata ai solidi sospesi volatili: i periodi 1 e 4 presentano percentuali del 10% circa mentre il periodo 3 è quello caratterizzato dalla minore percentuale di COD legato ai SSV pari all'8%. Il periodo 2 presenta invece la percentuale di COD legato ai SSV maggiore con un valor medio poco oltre il 20%: questo è determinato dalla formazione nel reattore di granuli che determinano l'innalzamento di tale componente rispetto alle altre.

La terza componente del COD legata all'idrogeno prodotto risulta essere per tutti e quattro i periodi quella con percentuali minori e mai oltre il 10%. Il periodo 1 è quello caratterizzato dalla percentuale media maggiore e pari circa al 10%, il periodo 2, a causa della presenza dei granuli, presenta valori più che dimezzati e pari circa al 3%. Il periodo 4, coerentemente con le bassissime produzioni di idrogeno, risulta essere caratterizzato da un valor medio di COD legato all'idrogeno stesso quasi nullo.

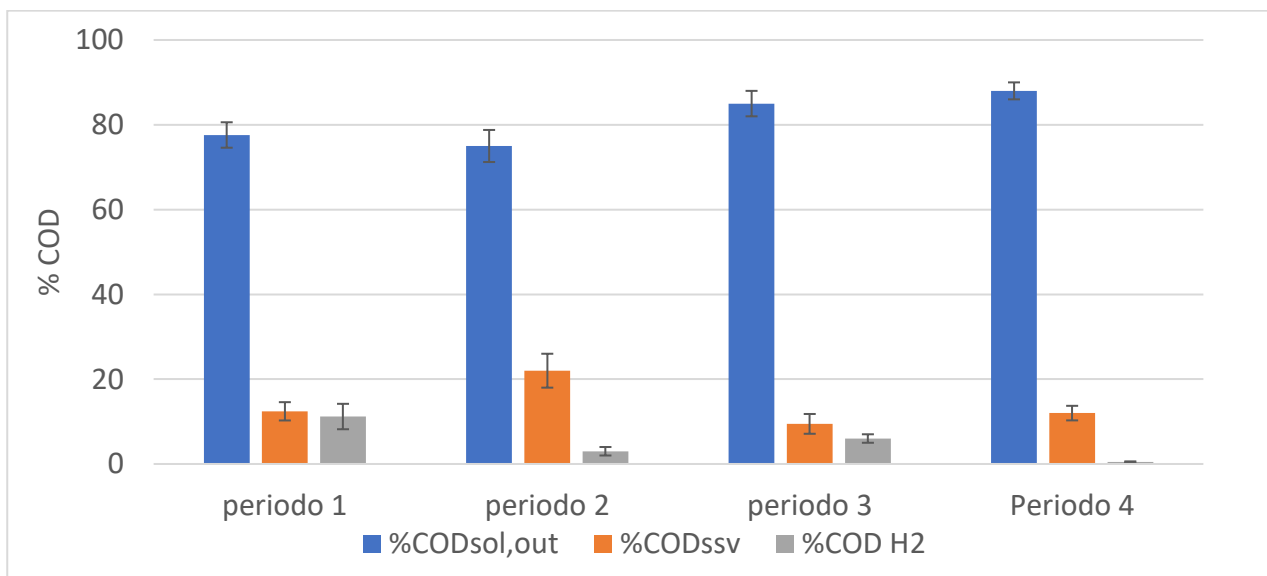


Figura 4.35 Composizione media del COD effluente

Le concentrazioni di COD in ingresso al reattore presentano valori medi molto simili (Figura 4.36) per tutti e quattro i periodi in quanto l'alimento è stato sempre preparato con l'obiettivo di avere in ingresso una concentrazione di COD pari a 10 gCOD/L. Le concentrazioni in uscita invece sono caratterizzate da una maggiore diversità in funzione del grado di rimozione del COD: il periodo 1 presenta le maggiori differenze tra COD influente ed effluente, simbolo di una maggiore degradazione la quale infatti presenta un valore medio del 15% circa.

I periodi 2 e 3 sono caratterizzati da COD effluenti medi simili e poco superiori agli 8 gCOD/L, da cui derivano efficienze medie di rimozione del COD simili e pari al 10%. Il periodo 4 termofilo risulta invece essere il peggiore in quanto caratterizzato da efficienze medie di rimozione del COD del 5%, dovute alle condizioni operative del reattore quali le elevate temperature e le contemporanee condizioni di stress a cui sono sottoposti i batteri nel reattore.

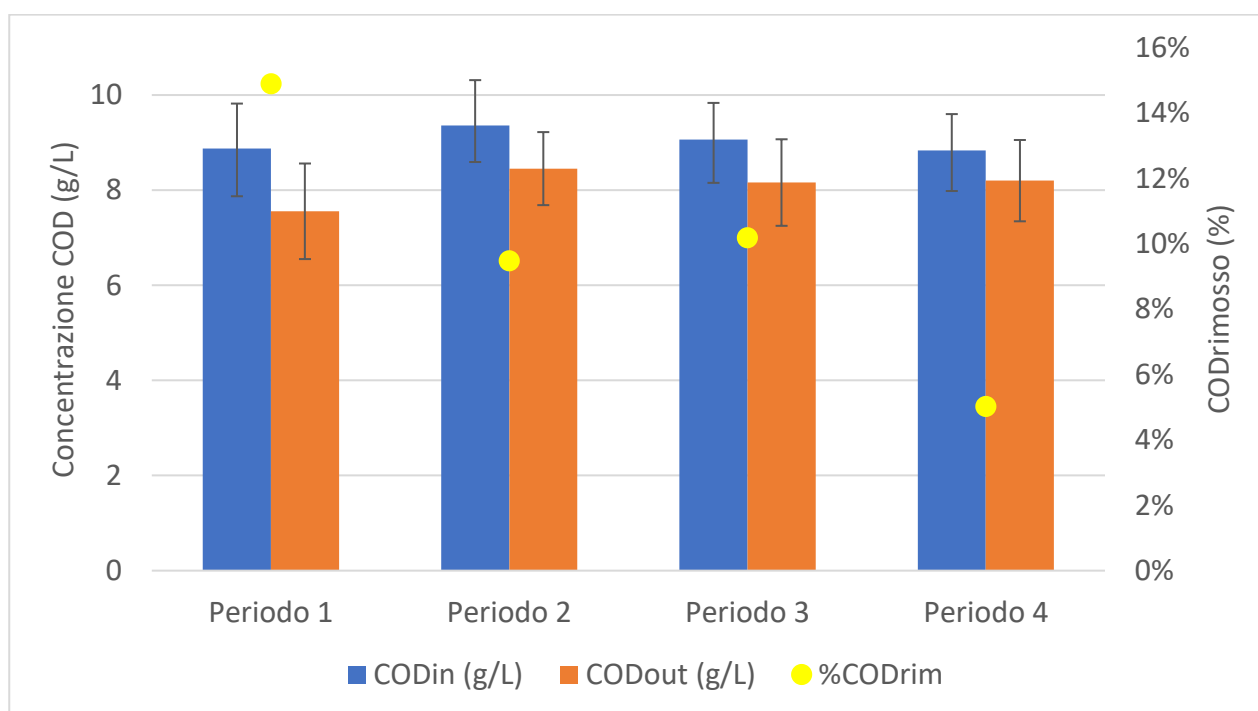


Figura 4.36 Concentrazione media COD influente ed effluente e relativa rimozione

Una forte differenza si evince invece per le rese di produzione di idrogeno e per i tassi di crescita cellulari (Figura 4.37). Le rese medie del periodo 1 sono le più elevate e pari a 2,5 moli H₂/moli lattosio coerentemente con le efficienze di rimozioni del COD e le produzioni di idrogeno; buone ma inferiori sono anche le rese di produzione di idrogeno del periodo 3 aventi un valor medio pari a 1,5 moli H₂/moli lattosio.

Decisamente inferiori e pari a 0,8 moli H₂/moli lattosio sono le rese di produzione del periodo 2: tali valori sono dovuti alle minori produzioni di idrogeno legate alla formazione di granuli e a condizioni di avvio del reattore che hanno determinato maggiori problematiche di innesco del processo. Il periodo 4 è risultato essere, anche per questo parametro, il peggiore: le basse produzioni di idrogeno conseguenti all'innalzamento della temperatura, alle difficoltà di avvio del processo e alle maggiori concentrazioni di lattosio effluenti, hanno determinato rese di produzioni di idrogeno estremamente esigue con un valor medio pari a 0,2 moli H₂/moli lattosio.

I tassi di crescita cellulari mostrano invece un andamento quasi opposto. Il periodo 1 è caratterizzato da un tasso medio pari a 0,5 gSSV/gCODrim mentre leggermente superiori è il tasso medio del periodo 3 pari a 0,7 gSSV/gCODrim. Molto superiori sono i tassi di crescita cellulari ottenuti nel periodo 2 e nel 4: nel periodo 2 si è ottenuto un valor medio irrealizzabile nella realtà e pari a 2,5 gSSV/gCODrim. Tale valore è una diretta conseguenza del processo di formazione dei granuli nel reattore che ha portato ad un aumento esponenziale delle concentrazioni di SSV.

Anche per il tasso di crescita cellulare il periodo 4 termofilo risulta essere il peggiore poiché caratterizzato da un tasso di crescita medio poco superiore a 2,5 gSSV/gCODrim: un valore così elevato e non raggiungibile nella realtà è dovuto in questo caso alle bassissime rimozioni di COD.

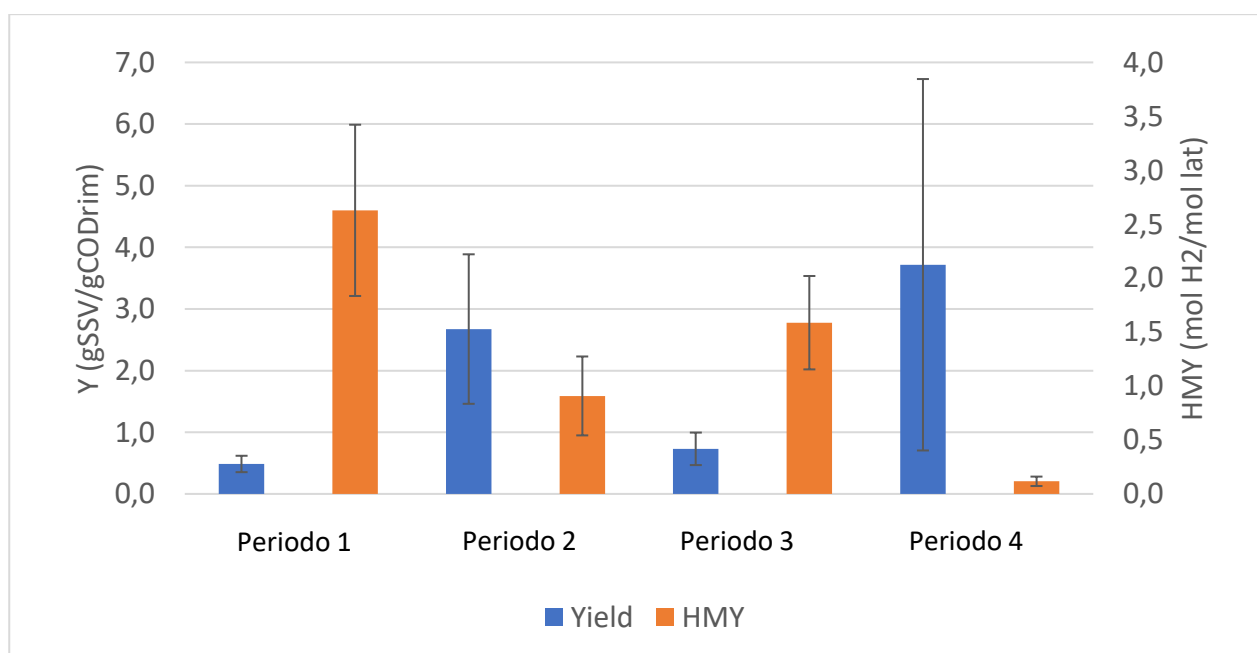


Figura 4.37 Valori medi per rese di rimozione e tassi di crescita cellulare

Bilanci di massa sul COD

Tutti i bilanci di massa sono caratterizzati dalla prevalenza della componente legata al COD solubile effluente, che costituisce almeno il 75% del totale. La sua variabilità nei diversi periodi è legata alla percentuale di degradazione del COD operata dai batteri; i valori minori, dal giorno 62 al giorno 78, corrispondono al periodo caratterizzato dalle maggiori degradazioni del COD, risultate essere sempre oltre il 15%.

Le componenti legate ai SSV e all'idrogeno sono state sempre inferiori, non andando a costituire oltre il 20% del totale ad eccezione del periodo 2, in cui la graduale formazione di granuli nel reattore ha portato ad elevate concentrazioni di SSV, riscontrabili con altrettanti alti valori della componente legata ai SSV a sfavore di quella dell'idrogeno. Un andamento molto simile si è verificato anche nel periodo termofilo; le buone concentrazioni di SSV unite a produzioni nulle di idrogeno hanno determinato differenze tra le due componenti simili a quelle del periodo 2.

Nel quarto periodo agli elevati valori di COD legati ai solidi sospesi volatili fanno seguito i massimi valori di tassi di crescita cellulari; i maggiori valori di COD legati ai SSV si riscontrano invece nel secondo periodo, a cui però non corrispondono, come si evince dalla Figura 4.38, i maggiori valori di crescita cellulare: ciò è dovuto al fatto che i granuli presenti nel reattore, che vanno a determinare i valori di SSV, non derivano dalla degradazione del COD. I migliori valori di COD legato alla produzione di idrogeno sono relativi al terzo e soprattutto al primo periodo; nel periodo termofilo invece, coerentemente con le produzioni di biogas e idrogeno, si evince una barra del COD legato all'idrogeno praticamente nulla.

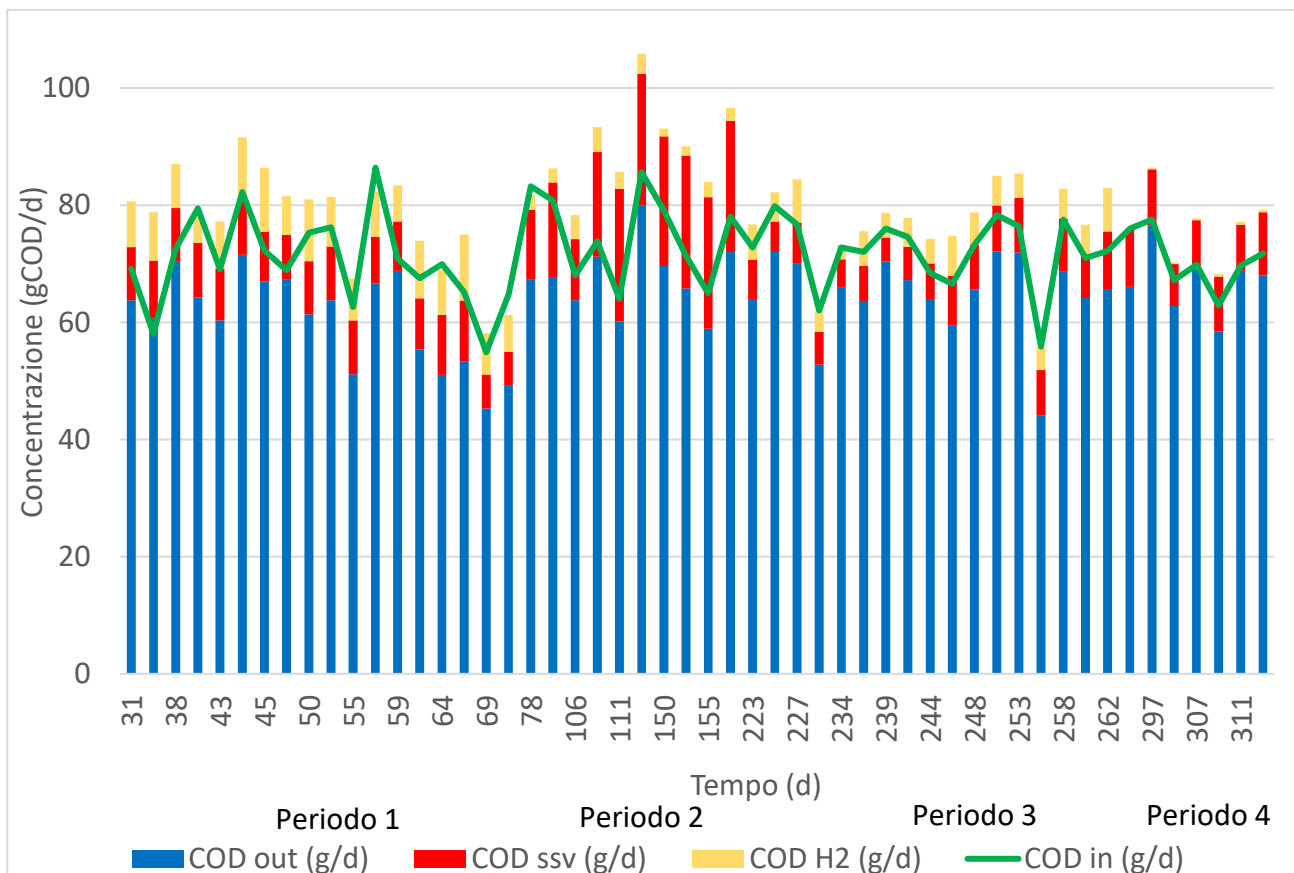


Figura 4.38 Bilanci di massa nel tempo dell'intero periodo di studio

Acidi volatili (VFA)

Gli acidi volatili analizzati effluente sono stati: etanolo, acido acetico, acido propionico, acido butirrico e isobutirrico. La composizione dell'effluente, espressa in termini di concentrazioni equivalenti di COD (gCOD/d), viene mostrata in Figura 4.39.

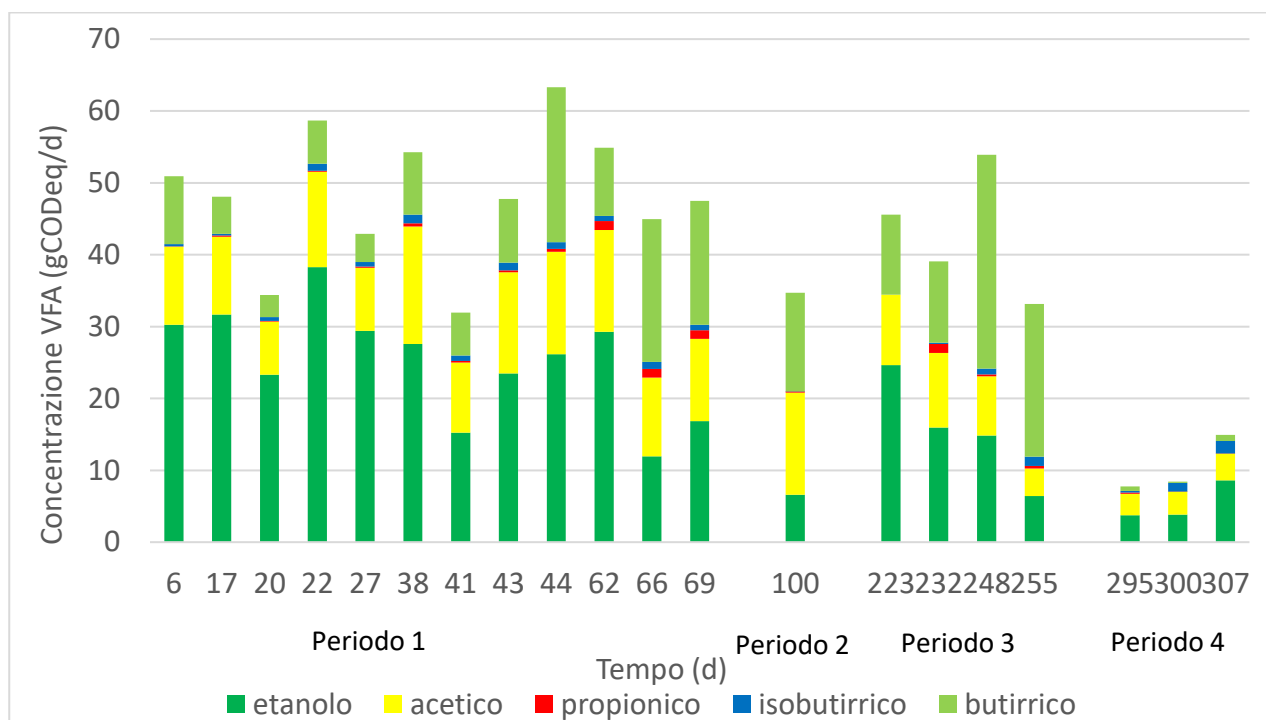


Figura 4.39 Composizione del COD solubile effluente

Dalla Figura 4.39 si evince una forte differenza nella composizione del COD solubile effluente tra i diversi periodi.

Le maggiori concentrazioni di etanolo, riscontrate nel periodo 1, corrispondono anche al periodo in cui si sono verificate le migliori rese di degradazione del COD e le più alte produzioni di idrogeno, in contrasto con studi precedenti (Yuan 2017) e con la letteratura, in base alla quale la reazione di produzione di etanolo non porta ad una produzione di idrogeno (Capitolo 2.3.1, Tabella 2.2, Eq. 2.22).

Le concentrazioni di acido acetico, la maggior via di produzione di idrogeno, risultano decrescere leggermente da inizio a fine periodo, con valori che passano da 15 a 10 gCOD/d circa, a differenza delle produzioni di idrogeno le quali tendono ad aumentare nella parte finale del periodo; anche questo trend risulta contrastante con la letteratura in base alla quale un aumento delle concentrazioni di acido acetico determinano un incremento di quelle di idrogeno.

Opposto è l'andamento delle concentrazioni dell'acido butirrico: il primo periodo è caratterizzato da valori medi intorno ai 7 gCODeq/d con un raddoppio nella parte finale conseguente alla diminuzione dell'etanolo.

Nel terzo periodo le concentrazioni di etanolo presentano un andamento fortemente decrescente: si passa da valori simili al primo periodo, pari a 25 gCODeq/d, a concentrazioni prossime a 5 gCODeq/d al termine del periodo. Anche le concentrazioni di acido acetico presentano il medesimo andamento anche se di minore entità. Opposto e analogo al primo periodo sono le concentrazioni di acido butirrico, che triplicano raggiungendo valori tra 25 e 30 gCODeq/d. L'andamento delle concentrazioni di etanolo è coerente con le produzioni di idrogeno: ad una riduzione delle concentrazioni di etanolo corrisponde un aumento delle produzioni idrogeno. Lineare risulta la correlazione tra le produzioni di idrogeno e l'acido butirrico: come da studi precedenti (Gugliandolo 2018), ad un aumento dell'acido butirrico corrisponde un aumento dell'idrogeno prodotto.

Il quarto periodo risulta essere invece caratterizzato da elevate concentrazioni di etanolo, quasi sempre superiori al 50%, ed acetico; nulle sono invece quelle di butirrico a differenza sia dei precedenti periodi sia della letteratura in base alla quale ad un incremento della temperatura corrisponde un aumento della produzione di acido butirrico a discapito dell'etanolo (Mu et al; 2006). Gli autori hanno infatti riscontrato un aumento delle concentrazioni di butirrico e una riduzione di quelle di etanolo passando da una temperatura di 33°C a una di 41°C.

Le concentrazioni di acido propionico e isobutirrico risultano essere quasi nulle in tutti i campioni analizzati.

Un parametro usato come simbolo dell'efficienza della dark fermentation, poiché indicante la strada metabolica del processo, è il rapporto tra acido butirrico e acetico (Figura 4.40), in genere compreso tra 0,64 e 3,6 (Hawkes et al.,2006). Se superiore a 1 il processo segue la via meno produttiva dell'acido butirrico mentre se inferiore a 1 quella maggiormente produttiva dell'acido acetico.

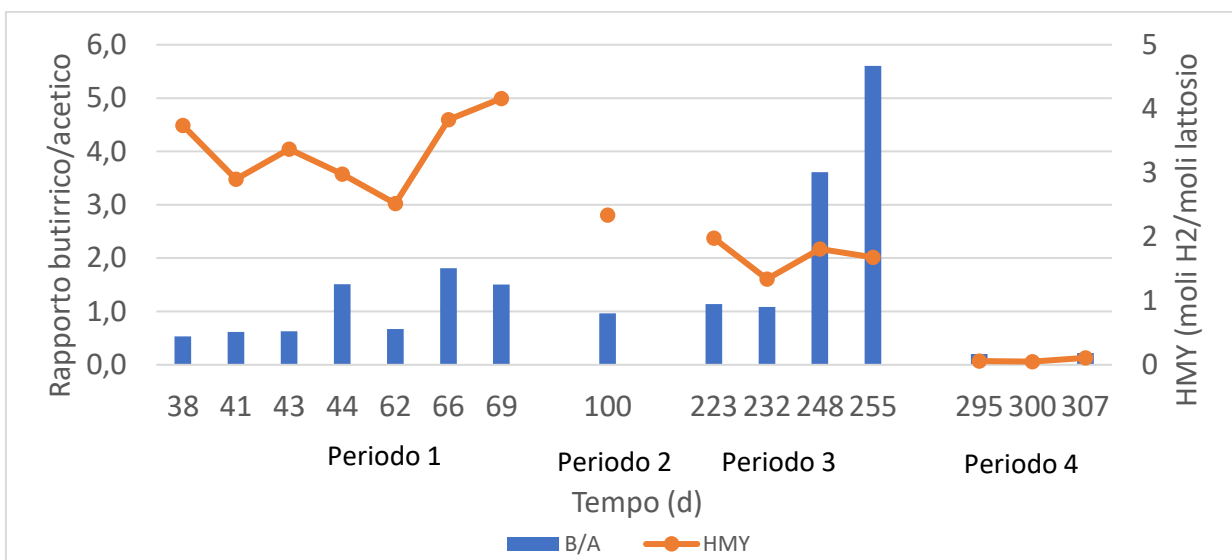


Figura 4.40 Rapporto butirrico/acetico nel tempo

Dal grafico si evince, per la prima parte del periodo uno, un andamento delle rese di produzione rispetto al rapporto butirrico/acetico coerente con la letteratura: all'aumentare del rapporto infatti la produzione diminuisce passando da rese superiori a 4 a rese inferiori a 3. La seconda parte del primo periodo mostra invece un andamento discordante: il rapporto aumenta ma parallelamente cresce anche la resa.

Il terzo periodo torna a mostrare un trend lineare con la letteratura in quanto ad un forte aumento del rapporto, causato dall'incremento della concentrazione di butirrico, corrisponde una riduzione della resa del processo. Totalmente discordante risulta essere invece il periodo termofilo caratterizzato da rapporti estremamente bassi ma produzioni nulle.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

L'attività sperimentale effettuata nel predetto studio ha permesso di analizzare il processo di fermentazione biologica del siero di latte per la produzione di idrogeno con l'obiettivo di ottenere nuovi elementi per l'ottimizzazione del processo produttivo.

La sperimentazione è stata effettuata su un impianto pilota tramite un reattore completamente miscelato (CSTR), a pH costante di 5,5 ottenuto tramite dosaggio automatico di soda (3M), con HRT di 9 ore. L'unico parametro che è stato fatto variare nel corso dello studio è stata la temperatura; la prima parte della sperimentazione è stata condotta in condizioni mesofile a 36°C, mentre la seconda in condizioni termofile a 50°C.

La variazione di temperatura è finalizzata a verificare le conseguenze che essa comporta sulle degradazioni del COD, sulle produzioni di idrogeno, sulle rese di produzione di idrogeno (HMY) e sui tassi di crescita cellulari.

L'esperimento in condizioni mesofile è stato condotto per un totale di 150 giorni suddivisi nel seguente modo: 78 giorni il periodo 1, 24 giorni il periodo 2 e 48 giorni il periodo 3.

I periodi 1 e 3 sono caratterizzati dalle medesime condizioni operative e non si sono verificate problematiche quali salti di corrente, rotture di sonde e formazione di granuli. Per le produzioni di idrogeno, il miglior risultato è stato ottenuto il giorno 71 con un valore di 1,24 NL H₂/h a cui è corrisposta anche una resa di degradazione del COD molto elevata e pari al 26%; la degradazione migliore è stata ottenuta sempre nel periodo 1, il giorno 64 in cui è stato riscontrato un valore pari al 27%. La resa di produzione di idrogeno maggiore è stata ottenuta sempre nel periodo 1 il giorno 69, in cui è stato raggiunto un valore di 4,16 molH₂/mol lattosio; non è stato assunto come valido la resa di produzione di idrogeno raggiunta il giorno 34 pari a 6,87 molH₂/mol lattosio in quanto conseguente ad un errore nella preparazione dell'alimento. Anche il miglior tasso di crescita cellulare è stato riscontrato nel periodo 1 e prossimo a 0,6 gSSV/gCODrimosso, seppur troppo elevato per batteri idrogeno-produttori.

I risultati ottenuti sono caratterizzati da incertezza relativa a possibili errori nell'effettuare le analisi, a problematiche relative al mantenimento nel reattore delle condizioni ottimali quali un elevato grado dell'anaerobicità; di fondamentale importanza è anche la corretta preparazione dell'alimento, per la quale, un errore, pregiudica l'efficienza e la correttezza del processo nonché dei parametri analizzati.

Un altro elemento di notevole importanza risulta essere il siero di latte usato per la sperimentazione: una maggiore caratterizzazione delle diverse sostanze che compongono il siero quali proteine, zuccheri o altre sostanze inibenti può orientare circa i possibili risultati.

Infine, importante può essere anche l'analisi quantitativa ma soprattutto qualitativa della biomassa contenuta nel siero di latte: la definizione della biomassa permette la classificazione delle specie batteriche presenti e l'individuazione della presenza di microorganismi competitori o inibenti verso gli idrogeno-produttori.

Il periodo 2 mesofilo si distingue dagli altri due periodi sopra riportati per le difficoltà nella fase di start up del reattore dovute a salti di corrente, rotture delle sonde e acclimatazione batterica, e durante la sperimentazione per la formazione di granuli nel reattore. La produzione massima di idrogeno è stata riscontrata nel giorno 108, pari a 0,325 NL H₂/h, a cui è associata la minima degradazione del COD, risultata prossima al 4%; la maggiore degradazione del COD è invece avvenuta il giorno 150, pari a 12%, a cui corrisponde una produzione di idrogeno tra le basse, prossima a 4 NL H₂/h. Le rese di produzione di idrogeno sono conseguentemente risultate inferiori ai periodi mesofili senza granuli, ovvero 1 e 3; la massima resa è stata ottenuta il giorno 108 ed è stata pari a 1,81 molH₂/mol lattosio. Le elevate concentrazioni di SSV, dovute alla presenza dei granuli, hanno comportato tassi di crescita cellulari prossimi a 1,4 gSSV/gCODrimosso, valori fuori scala per i batteri idrogenotrofi. I dati ottenuti risultano essere fortemente influenzati dalla formazione di tali granuli e pertanto poco attendibili; una maggiore accuratezza può essere garantita tramite un'analisi più approfondita circa l'origine e la composizione di tali granuli, la prima delle quali può essere legata anche alle caratteristiche del siero utilizzato.

Il periodo 4 termofilo si differenzia dagli altri 3 periodi per la temperatura di lavoro, pari a 50°C. Le produzioni di idrogeno, le efficienze di degradazione del COD e le rese di produzione di idrogeno sono state molto basse e pari rispettivamente a 0,03 NL H₂/h, 13% e 0,18 molH₂/mol lattosio. Allo stesso tempo i tassi di crescita cellulari sono risultati essere molto elevati, prossimi a 1,5 gSSV/gCODrimosso. Le misure effettuate non possono essere considerate del tutto affidabili, in conseguenza delle diverse problematiche presentate dal reattore quali la rottura della sonda della temperatura, e della durata della sperimentazione in tali condizioni: i batteri in tali condizioni di stress potrebbero richiedere un periodo di acclimatazione più lungo rispetto a quello richiesto operando in mesofilia.

CAPITOLO 6

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Adams MW., Mortenson LE., (1984), "The physical and catalytic properties of hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum* a comparison with hydrogenase I", *Journal of Biological Chemistry*, 259(11), pp 7045–7055.

Akhlaghi M., Boni MR., De Gioannis G., Muntoni A., (2017), "A parametric response surface study of fermentative hydrogen production from cheese whey", *Bioresource, Elsevier*

Alibardi L., Cossu R., (2008), "Biological hydrogen production from the Organic Fraction of Municipal Solid Waste", *Proceedings of SIDISA, Florence (Italy)*.

Antonopoulou G., Stamatelatos K., Venetsaneas N., Kornaros M., Lyberatos G., (2008), "Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47, pp 5227–5233.

Argun H., Kargi F., Kapdan I., Oztekin R., (2008), "Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, pp 1813–1819.

Azbar N., Çetinkaya Dokgöz, F. T., Keskin, T., Korkmaz, K. S., Syed, H. M., (2009) "Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), pp 7441–7447.

Azbar N., Dokgöz F. T. Ç., Peker, Z., (2009) "c", *International Journal of Green Energy*, 6(4), pp 371–380.

Azbar N., Cetinkaya Dokgoz F. T., (2010) "The effect of dilution and l-malic acid addition on biohydrogen production with *Rhodospseudomonas palustris* from effluent of an acidogenic anaerobic reactor", *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(10), pp 5028–5033.

Baghchehsaraee B., Nakhla G., Karamanev D., Margaritis A., Reid G., (2008), "The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, pp 4064–4073.

Bastidas-Oyanedel J., Schmidt J., Bonk F., Thomsen M., (2015), "Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio)chemical industry"

Bundhoo Z.M.A., Mohee R., Hassan A.M., (2015), "Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review", *Journal of Environmental Management*, 157, pp 20-48.

Bundhoo M.A.Z., Mohee R., (2016), "Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review", *International Journal of Hydrogen Energy*, Elsevier Ltd, 41(16), pp 6713–6733.

Carrillo-Reyes J., Celis L.B., Alatraste-Mondragón F., Razo-Flores E., (2012), "Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors", *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, pp 5591–601.

Carrillo-Reyes J., Celis L.B., Alatraste-Mondragón F., Montoya L., Razo-Flores E., (2014a), "Strategies to cope with methanogens in hydrogen producing UASB reactors: 126 Community dynamics", *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(22), pp 11423-11432.

Carrillo-Reyes J., Celis L.B., Alatraste-Mondragón F., Razo-Flores E., (2014b), "Decreasing methane production in hydrogenogenic UASB reactors fed with cheese whey", *Biomass and Bioenergy*, 63, pp 101–108.

Castelló E., García y Santos C., Iglesias T., Paolino G., Wenzel J., Borzacconi L., (2009), "Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: links between microbial community and reactor performance", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, pp 5674–82.

Chen CC., Lin CY., Chang JS., (2001), "Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate", *Applied Microbiology Biotechnology*, 57, pp 56–64.

Cota-Navarro C. B., Carrillo-Reyes J., Davila-Vazquez G., Alatraste-Mondragón F., Razo-Flores E., (2011) "Continuous hydrogen and methane production in a two-stage cheese whey fermentation system", *Water Science and Technology*, 64(2), pp. 367–374.

Davila-Vazquez G., Alatraste-Mondragón F., León-Rodríguez A., Razo-Flores E., (2008), "Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (19), pp 4989-4997.

Davila-Vazquez G., Cota-Navarro C.B., Rosales-Colunga L.M., León-Rodríguez A., Razo-Flores E., (2009), "Continuous biohydrogen production using cheese whey: improving the hydrogen production rate", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (10), pp 4296-4304.

Davila-Vazquez G., de León-Rodríguez A., Alatraste-Mondragón F., Razo-Flores E., (2011), "The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures", *Biomass and Bioenergy*, 35(7), pp 3174–3181.

Dębowski, M., Korzeniewska, E., Filipkowska, Z., Zieliński, M., Kwiatkowski, R., (2014), "Possibility of hydrogen production during cheese whey fermentation process by different strains of psychrophilic bacteria", *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(5), pp 1972–1978.

De Gioannis G., Friargiu M., Massi E., Muntoni A., Poletti A., Pomi R., (2014), "Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: influence of pH", *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, pp 20930–20941.

Dinamarca C, Ganan M, Liu J, Bakke R., (2011), "H₂ consumption by anaerobic non-methanogenic mixed cultures", *Water Science & Technology*, 63(8-9), pp 1583-1589.

Elbeshbishy E., Ranjan Dhar B., Nakhla G., Lee H., (2007), "A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, pp 656-668

Fang HHP., (1991), "Treatment of wastewater from a whey processing plant using activated sludge and anaerobic processes", *Journal of Dairy Science*, 74(6), pp 2015–2019.

Fang HHP., Liu H., (2002), "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture", *Bioresource Technology*, 82, pp 87–93.

Ferchichi M., Crabbe E., Gil GH., Hintz W., Almadidy A., (2005), "Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey", *Journal of Biotechnology*, 120(4), pp 402–409.

Fernandez, C., Carracedo, B., Martinez, E. J., Gomez, X. and Moran, A., (2014) "Application of a packed bed reactor for the production of hydrogen from cheese whey permeate: Effect of organic loading rate", *Journal of Environmental Science and Health*, 49(2), pp. 210–217.

Ghimire A., Frunzo L., Pirozzi F., Trabaly E., Escudie R., Lens P. N. L. Esposito G., (2015), "A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products", *Applied Energy*, 144, pp 73-95.

Gratarola P., (2016), "Produzione di bioidrogeno da siero di latte ultrafiltrato in reattore CSTR mediante dark fermentation", *Tesi di laurea magistrale*

Gugliandolo M., (2018). "Produzione continua di idrogeno tramite dark fermentation di siero di latte – Indagine sperimentale per l'ottimizzazione del processo", *tesi di laurea magistrale*

Guo W., Liu C., Zou S., Zhang M., (2006), "Progress in research and application of homoacetogen", *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 12, pp 874-877.

Han S-K., Shin H-S., (2004), "Performance of an innovative two-stage process converting food waste to hydrogen and methane", *Journal of Air & Waste Management Association*, 54, pp 242–249.

Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes D.L., Hussy I., (2002), "Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization", *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, pp 1339-1347.

Hwang M.H., Jang N.J., Hyun S.H., Kim I.S., (2004), "Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH", *Journal of Biotechnology*, 111, pp 297–309.

Kan E., (2013), "Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation", *Renewable Energy*, 49, pp 227-231.

Kapdan I.K., Kargi F., (2006), "Bio-hydrogen production from waste materials", *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 569–582.

Karadag D., Puhakka J., (2010), "Effect of changing temperature on anaerobic hydrogen production and microbial community composition in an openmixed culture bioreactor", *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, pp 8554–8560.

Kargi F., Eren N.S., Ozmihci S., (2012), "Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations", *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, pp 8338–8342.

Khanal S., Chen W.H., Li L., Sung S., (2003), "Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products", *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, pp 1123–1131.

Kim S-H., Han S-K., Shin H-S., (2006), "Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter", *Process Biochemistry*, 41, pp 199–207.

Kotsopoulos A., Zeng J., Angelidaki I., (2006), "Biohydrogen production in granular up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70 °C)", *Biotechnology and Bioengineering*, 94, pp 296–302.

Kyazze G., Martinez-Perez N., Dinsdale R., Premier G.C., Hawkes F.R., Guwy A.J., Hawkes D.L., (2006), "Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production", *Biotechnology and Bioengineering*, 93(5), pp 971–979.

Lee C., Kim J., Hwang S., (2006), "Optimization of adenosine 5'-triphosphate extraction for the measurement of acidogenic biomass utilizing whey wastewater", *Biodegradation*, 17(4), pp 347–355.

Lee K-S., Tseng T-S., Liu Y-W., Hsiao Y-D., (2012), "Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy", *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, pp 15556–15562.

Levin BD., Pitt L., Love M., (2004), "Biohydrogen production: prospects and limitations to practical applications", *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, pp 173–185 [Erratum 1425–6].

Li C., Fang HHP., (2007), "Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures", *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37, pp 1–39.

Li Q., Su H., Tan T., (2008), "Synthesis of ion-imprinted chitosan-TiO₂ adsorbent and its multi-functional performances", *Biochemical Engineering Journal*, 38 (2), pp 212-218.

Lima, D. M. F., Inoue, R. K., Rodrigues, J. A. D., Ratusznei, S. M., Zaiat, M. (2015) 'Biohydrogen from cheese whey treatment in an ansbbr: Achieving process stability', *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(2), pp. 397–408.

Lima D. M. F., Lazaro C. Z., Rodrigues J. A. D., Ratusznei S. M., Zaiat, M., (2016), "Optimization performance of an AnSBBR applied to biohydrogen production treating whey", *Journal of Environmental Management*, 169, pp 191–201.

Lin CY., Chang R-C., (1999), "Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74, pp 498–500.

Lin CY., Chang RC., (2004), "Fermentative hydrogen production at ambient temperature"

Lin CYC-Y., Lay CH., (2004), "Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora", *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, pp 41–45.

Lin C-Y., Shei S-H., (2008), "Heavy metal effects on fermentative hydrogen production using natural mixed microflora", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, pp 587–593.

Liu D., Zeng R., Angelidaki I., (2008), "Enrichment and adaptation of extremethermophilic (70 °C) hydrogen producing bacteria to organic household solid waste by repeated batch cultivation", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, pp 6492–6497.

Logan BE., Oh SE., Kim IS., van Ginkel S., (2002), "Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers", *Environmental Science Technology*, 36(11), pp 2530–2535.

Mandal B., Nath K., Das D., (2006), "Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*", *Biotechnology Letters*, 28, pp 831–835.

Martinek S., Kastner V., Schnitzhofer W., (2013), "Efficient biohydrogen production from whey using a pilot scale carrier based bioreactor system", *13th World Congress on Anaerobic Digestion*, pp 5.

Moreno R., Escapa A., Cara J., Carracedo B., Gómez X., (2015), “A two-stage process for hydrogen production from cheese whey: Integration of dark fermentation and biocatalyzed electrolysis”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(1), pp 168–175.

Muller V., (2003), “Energy conservation in acetogenic bacteria”, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), pp 6345-6353.

Napoli F., Olivieri G., Russo M.E., Marzocchella A., Salatino P., (2012), “Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum*—Assessment of energetics and product yields of the acidogenesis”, *Enzyme and Microbial Technology*, 50(3), pp 165-172.

Noike T., Takabatake H., Mizuno O., Ohba M., (2002), “Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, pp 367–1371.

O-Thong S., Prasertsan P., Intrasungkha N., Dhamwichukorn S., Birkeland N-K., (2008), “Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by Thermoanaerobacterium-rich sludge”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, pp 1221–1231.

Perna V., Castelló E., Wenzel J., Zampol C., Fontes Lima D. M., Borzacconi L., Varesche M. B., Zaiat, M., Etchebehere C., (2013), “Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(1), pp 54–62.

Prazeres AR., Carvalho F., Rivas FJ., (2012), “Cheese whey management: a review”, *Journal of Environmental Management*, 110, pp 48–68.

Quéméneur M., Hamelin J., Latrille E., Steyer J-P., Trably E., (2011), “Functional versus phylogenetic fingerprint analyses for monitoring hydrogen-producing bacterial populations in dark fermentation cultures” *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, pp 3870–3879.

Rai P. K., Singh S. P., Asthana R. K., (2012), “Biohydrogen production from cheese whey wastewater in a two-step anaerobic process”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(6), pp 1540–1549.

Ren N., Li J., Li B., Wang Y., Liu S., (2006), “Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, pp 2147–2157

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”, *Environmental Microbiology*, 9(5), pp 1112–1125.

Rivas J., Prazeres AR., Carvalho F., Beltrán F., (2010), “Treatment of cheese whey wastewater: combined coagulation–flocculation and aerobic biodegradation”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), pp 7871–7877.

Romão B.B., Batista F.R.X., Ferreira J.S., Costa H.C.B., Resende M.M., Cardoso V.L., (2014), "Biohydrogen production through dark fermentation by a microbial consortium using whey permeate as substrate", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(7), pp 3670–3685.

Rosa P. R. F., Santos S. C., Sakamoto I. K., Varesche M. B. A., Silva E. L., (2014) "Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: effect of hydraulic retention time on the microbial community composition", *Bioresource technology*, 161, pp 10–19.

Rosales-Colunga L.M., Razo-Flores E., Ordoñez L.G., Alatraste-Mondragón F., León-Rodríguez A., (2010), "Hydrogen production by *Escherichia coli* DhycA DlacI using cheese whey as substrate", *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (2), pp 491-499.

Saadý N.M.C., (2013), "Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge", *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30), pp 13172–13191.

Saddoud A., Hassaïri I., Sayadi S., (2007), "Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey", *Bioresource Technology*, 98(11), pp 2102–2108.

Sacchi D., (2015), "Produzione continua di idrogeno da siero di latte ultrafiltrato in reattore MBR"

Sanders W., Geerink M., Zeeman G., Lettinga G., (1999), "Anaerobic hydrolysis kinetics of particulate substrates", *Water science & Technology*, pp 25-32.

Schink B., (1994), "Diversity, ecology, and isolation of acetogenic bacteria", In: Drake HL, editor. *Acetogenesis*", *London: Chapman and Hall Microbiology Series*, pp 197-228.

Schink B., "Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, pp 262-280.

Seo Y. H., Yun Y.-M., Lee H., Han J.-I., (2015), "Pretreatment of cheese whey for hydrogen production using a simple hydrodynamic cavitation system under alkaline condition²", *Fuel*, 150, pp 202–207.

Shaterzadeh M.J., Ataei S., (2017), "The effects of temperature, initial pH, and glucose concentration on biohydrogen production from *Clostridium acetobutylicum*"

Show K., Zhang Z., Tay J., Teeliang D., Lee D., Jiang W., (2007), "Production of hydrogen in a granular sludge-based anaerobic continuous stirred tank reactor", *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, pp 4744–4753.

Siso MIG., (1996), "The biotechnological utilization of cheese whey: a review", *Bioresource Technology*, 57(1), pp 1-11.

Stafford D., Hawkes D., Horton R., (1980), "Methane production from waste organic matter", *CRC Press, Boca Raton, Florida (USA)*, pp 285.

Stamatelatou K., Antonopoulou G., Tremouli A., Lyberatos G., (2011), "Production of gaseous biofuels and electricity from cheese whey", *Industrial & Engineering Chemistry Resource*, 50 (2), pp 639-644.

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"

Tawfik., El-Qelish M., (2012), "Continuous hydrogen production from co-digestion of municipal food waste and kitchen wastewater in mesophilic anaerobic baffled reactor", *Bioresource Technology*, 114, pp 270–274.

Teli A., Ficara E., Malpei F., (2014), "Bio-hydrogen production from cheese whey by dark fermentation", *Chemical Engineering Transactions*, 37, pp 613–618.

Ueno Y., Haruta S., Ishii M., Igarashi Y., (2001), "Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost", *Applied Microbiology Biotechnology*, 57, pp 555–562.

Valdez-Vazquez I., Poggi-Varaldo H.M., (2009), "Hydrogen production by fermentative consortia", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(5), pp 1000-1013.

Van Ginkel S., Logan B., (2005), "Increased biological hydrogen production with reduced organic loading", *Water Research*, 39(16), pp 3819-3826.

Van Ginkel S., Logan BE., (2005), "Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids" *Environmental Science Technology*, 39, pp 9351–9356.

Vavilin VA., Rytow SV., Lokshina LY., (1996), "Modelling hydrogen partial pressure change as a result of competition between the butyric and propionic groups of acidogenic bacteria", *Bioresource Technology*, 54, pp 171-177.

Venetsaneas N., Antonopoulou G., Stamatelatou K., Kornaros M., Lyberatos G., (2009), "Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches", *Bioresource Technology*, 100, pp 3713–3717.

Waligorska M., (2012), "Fermentative hydrogen production process design and bioreactors"

Xiao J., Hay W., Wu TY., Juan JC., (2013), "Biohydrogen production through fermentation using waste as a future prospects of hydrogen usage", *Biofuels Bioproduct Biorefinery*.

Yang K., Yu Y., Hwang S., (2003), "Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation", *Water Research*, 37(10), pp 2467–2477.

Yang P., Zhang R., McGarvey J.A., Benemann J.R., (2007), "Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities", *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(18), pp 4761-4771.

Yuan., (2017), "Biohydrogen production from cheese whey by dark fermentation", *Tesi di laurea magistrale*

Zaiat M., Blanco YMC., Oliveira GHD., (2019), "Dark fermentation biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling", *Renewable energy, Elsevier*

Ziara RMM., Miller DN., Subbiah J., Dvorak Bl., (2019), "Lactate wastewater dark fermentation: The effect of temperature and initial pH on biohydrogen production and microbial community", *International Journal of Hydrogen Energy, Elsevier*

