

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

**Produzione di acidi carbossilici e acetone da
fermentazione anaerobica: un approccio *green* per la
valorizzazione della CO₂**



Relatore

Prof.ssa Debora Fino

Correlatori

Prof.ssa Tonia Tommasi

Dott.ssa Loredana Tarraran

Candidato

Matteo Bonincontro

Luglio 2021

Indice

1. Introduzione	1
2. Crescita batterica	5
2.1 <i>Influenza della concentrazione di substrato</i>	6
2.2 <i>Influenza della temperatura</i>	7
2.3 <i>Influenza del pH</i>	8
2.4 <i>Influenza della presenza di ossigeno</i>	8
2.5 <i>Influenza dell'attività dell'acqua</i>	9
3. Descrizione del microrganismo <i>Acetobacterium woodii</i>	11
3.1 <i>Metabolismo</i>	11
3.1.1 <i>Metabolismo eterotrofico</i>	11
3.1.2 <i>Metabolismo autotrofico</i>	12
3.2 <i>Processi in pressione</i>	13
3.3 <i>Effetti del bicarbonato sul metabolismo di <i>A. woodii</i></i>	15
3.4 <i>Produzione di acetone da <i>A. woodii</i> ingegnerizzato</i>	17
4. Acido formico, acido acetico e acetone: produzione e applicazioni	21
4.1 <i>Acido formico</i>	21
4.1.1 <i>Produzione</i>	21
4.1.2 <i>Applicazioni</i>	22
4.2 <i>Acido acetico</i>	23
4.2.1 <i>Produzione</i>	24
4.2.2 <i>Applicazioni</i>	25
4.3 <i>Acetone</i>	26
4.3.1 <i>Produzione</i>	26
4.3.2 <i>Applicazioni</i>	28
5. Scopo del lavoro	29
6. Materiali e metodi	31
6.1 <i>Materiali</i>	31
6.1.1 <i>Composizione del terreno eterotrofico</i>	31
6.1.2 <i>Composizione del terreno autotrofico</i>	34
6.2 <i>Metodi</i>	35
6.2.1 <i>Preparazione del terreno</i>	35
6.2.2 <i>Degasamento</i>	36
6.2.3 <i>Cambio gas per crescita in condizioni autotrofiche</i>	37
6.2.4 <i>Valutazione della curva di crescita microbica</i>	37

6.2.5	Inoculo e condizioni ottimali di crescita	38
6.2.6	Misura della pressione.....	39
6.2.7	Misura del pH.....	39
6.2.8	Prove in bioreattore	40
6.2.9	Analisi dei gas in uscita dal reattore.....	41
6.2.10	Analisi e quantificazione dei prodotti del metabolismo.....	42
6.2.11	Definizione delle rette di calibrazione per le analisi HPLC.....	42
6.2.11.1	Rette di calibrazione per il rivelatore PDA.....	42
6.2.11.2	Rette di calibrazione per il rivelatore RID	45
6.2.12	Definizione dei parametri della fermentazione e bilancio al carbonio.....	48
7.	Determinazione del tempo di desorbimento di N₂	49
8.	Effetto della CO₂ sul metabolismo di <i>A. woodii</i>	53
8.1	<i>Fermentazione in serum bottles in presenza di KHCO₃</i>	54
8.1.1	Confronto fra fermentazione in presenza di KHCO ₃ e in presenza di KCl.....	55
8.2	<i>Fermentazione in reattore a 9,8 bar con N₂ come inerte</i>	59
8.2.1	Fermentazione a 9,8 bar: confronto fra alta e bassa frazione di CO ₂ nel <i>feed</i> ...	61
9.	Ottimizzazione del terreno di coltura	65
9.1	<i>Fermentazione in assenza di vitamine</i>	65
9.2	<i>Fermentazione in assenza di estratto di lievito</i>	68
9.3	<i>Fermentazione in assenza di metalli</i>	68
	Conclusioni e sviluppi futuri	71
	Elenco dei simboli	73
	Bibliografia	75
	Ringraziamenti	79

1. Introduzione

A partire dalla prima metà degli anni '90, si è cominciato a diffondere il concetto di *Green Chemistry*, un'idea che ha segnato una svolta in campo industriale e che ha cambiato il modo di vedere i processi chimici non solo da un punto di vista meramente legato alle operazioni processistiche, ma anche relativamente al loro aspetto economico e alle ricadute che esse hanno sull'ambiente e sulla salute umana.

Nel 1998, Paul T. Anastas e John C. Warner nel loro lavoro "Green Chemistry: Theory and Practice" definiscono 12 principi su cui si basa il concetto di *Green Chemistry* (Anastas e Eghbali, 2010), che possono essere così riassunti:

- massimizzare la resa dei reagenti nei prodotti di interesse in modo da minimizzare la produzione di rifiuti;
- definire rotte di processo che prevedano la formazione di intermedi di reazione e prodotti meno tossici e pericolosi possibile, riducendo al minimo l'uso di solventi o altre sostanze ausiliarie;
- ridurre l'uso di energia valutandone l'impatto economico e ambientale e prediligendo processi che operino a temperature e pressioni prossime a quelle ambiente, anche avvalendosi dell'uso di catalizzatori (non solo inorganici ma anche biocatalizzatori quali enzimi, microrganismi naturali o microrganismi ingegnerizzati);
- uso di materie prime rinnovabili e formazione di prodotti che al termine del loro utilizzo si degradino in sostanze a basso impatto ambientale;
- prevenire la formazione di sostanze pericolose mediante l'uso di tecniche di analisi in grado di controllare il processo in tempo reale.

Questi aspetti hanno fatto sì che il concetto di *Green Chemistry* assumesse una notevole importanza negli ultimi decenni e che il suo impatto non rimanesse confinato al solo ambito della ricerca ma si estendesse a svariati settori.

Uno degli ambiti in cui la *Green Chemistry* ha trovato maggiore sviluppo è quello della riduzione delle emissioni di CO₂. La CO₂ è una molecola non tossica ed è, anzi, fondamentale per lo sviluppo della vita sul nostro pianeta in quanto parte integrante del ciclo del carbonio (**Figura 1.1**).

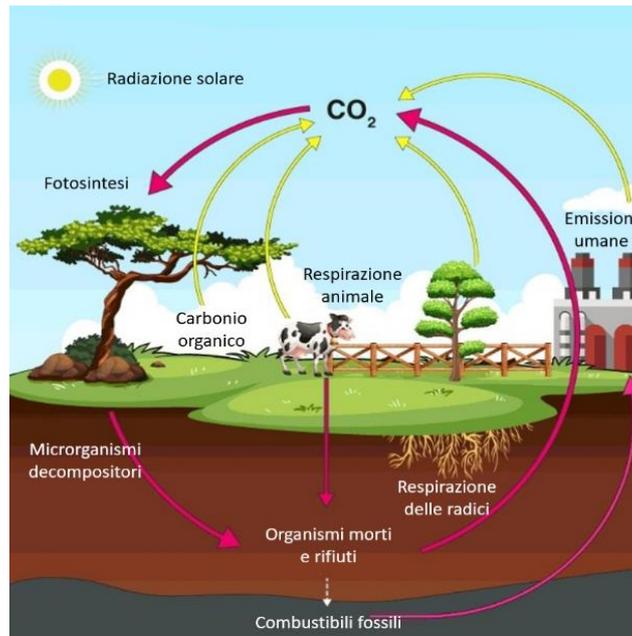


Figura 1.1 Ciclo del carbonio (figura tratta da Tech Thoroughfare sito web con modifiche)

Tuttavia, a partire dalla fine del 1800, il largo impiego di combustibili fossili per la produzione di energia e l'incremento di altre attività legate allo sviluppo della produzione su grande scala (ad esempio deforestazione, allevamenti intensivi e lo sviluppo di industrie) ha portato all'alterazione del ciclo del carbonio (Our World in Data sito web); ciò ha causato un innalzamento della concentrazione di CO₂ nell'atmosfera dai 280 ppm dell'epoca preindustriale ai 410 ppm del 2018 (**Figura 1.2**). Questo aumento, seppur piccolo in termini assoluti, ha causato un innalzamento nella temperatura globale media di circa 1 °C, mettendo in evidenza quanto le attività umane influenzino la quantità di gas serra presenti nell'atmosfera terrestre e quanto essi incidano sulla salute del nostro pianeta. Secondo le stime attuali, di questo passo, entro il 2050 la concentrazione di CO₂ raggiungerà 500 ppm, il che comporterebbe un innalzamento di 2 °C della temperatura media globale rispetto al periodo preindustriale (Babin *et al.*, 2021), con possibili conseguenze catastrofiche per lo sviluppo della vita sulla Terra.

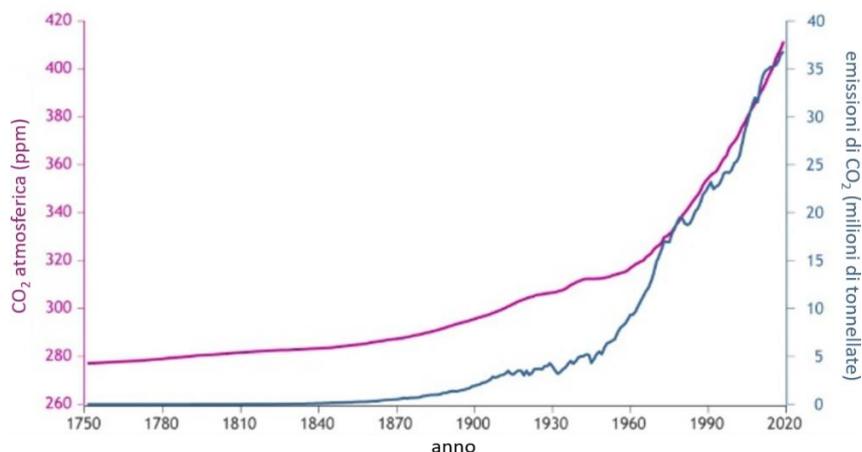


Figura 1.2 Variazione della concentrazione di CO₂ atmosferica e delle emissioni annuali di CO₂ dall'epoca preindustriale al 2020 (figura tratta da NOAA Climate.gov sito web con modifiche)

Ciò ha evidenziato la necessità di introdurre delle innovazioni che portino a un'inversione di tendenza e ad una transizione verso una *low carbon society*. A questo proposito nel 2015 gli Stati membri della Convenzione quadro delle Nazioni Unite sui cambiamenti climatici (UNFCCC) hanno firmato l'accordo di Parigi che rappresenta "il primo accordo universale e giuridicamente vincolante sui cambiamenti climatici; tale accordo si propone di contenere l'innalzamento della temperatura media globale al di sotto dei 2 °C previsti entro il 2050, limitandolo, auspicabilmente, a 1,5 °C" (Commissione Europea sito web). Affinché questo obiettivo venga raggiunto, negli ultimi anni hanno iniziato a svilupparsi processi di *Carbon Capture and Storage* (CCS), ovvero tecnologie che mirano alla riduzione delle emissioni di CO₂ in atmosfera (**Figura 1.3**). Le tecniche di CCS possono essere suddivise in tre categorie:

- post-combustione: separazione della CO₂ dai gas combusti (in cui è presente in concentrazioni generalmente non superiori al 14% in volume) mediante tecniche quali assorbimento, adsorbimento, distillazione criogenica e sistemi a membrana;
- pre-combustione: gassificazione del combustibile mediante ossigeno o vapore, con l'ottenimento di una miscela di H₂ e CO₂, da cui successivamente si separano i due componenti puri;
- ossicombustione: combustione mediante ossigeno puro con ottenimento di una miscela gassosa di CO₂ e H₂O che viene poi separata per condensazione.

La CO₂ così ottenuta può essere stoccata in depositi carboniferi o in giacimenti petroliferi esausti o può essere utilizzata per la formazione di carbonati e minerali e per lo sviluppo di tecniche *EOR* (*Enhanced Oil Recovery*) per l'estrazione assistita di petrolio (Raza *et al.*, 2019; Tsvetkov *et al.*, 2019).

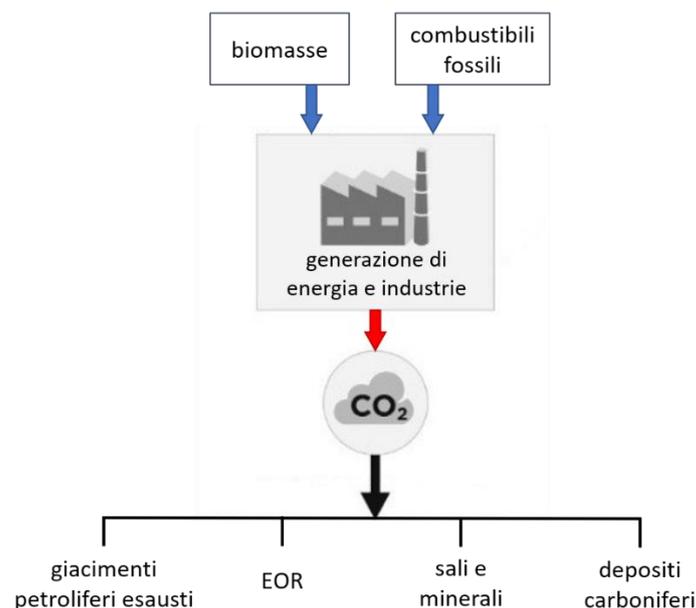


Figura 1.3 Carbon capture and storage (CCS) (figura tratta da Bruhn *et al.*, 2016 con modifiche)

Un concetto collegato alla CCS è quello di *CO₂ Conversion and Utilisation* (CCU), che mira alla valorizzazione della CO₂ impiegandola come reagente per la produzione di altre sostanze. Talvolta i due acronimi sono considerati in contrasto fra loro e visti come alternative l'uno

dell'altro; in realtà sono due concetti complementari, in quanto se da un lato la CCU trova nella CO₂ un'alternativa sostenibile per la sintesi di prodotti finiti, facendo sì che essa da “problema” diventi “risorsa”, la CCS fornisce una soluzione al problema che si pone una volta che i prodotti arrivano al termine del loro ciclo di vita (**Figura 1.4**).

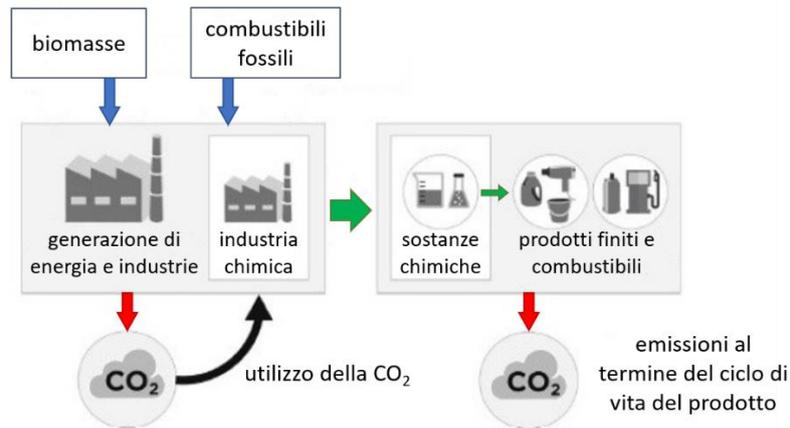


Figura 1.4 CO₂ Conversion and Utilisation (CCU) (figura tratta da Bruhn *et al.*, 2016 con modifiche)

Relativamente alla transizione verso l'obiettivo *net-zero emissions* prefissato nell'Accordo di Parigi, la CCU assume una notevole importanza soprattutto nella misura in cui vengano sviluppati processi *carbon-negative*; tali processi prevedono l'utilizzo di CO₂ atmosferica, sottraendola direttamente dall'ambiente mediante tecniche di *Direct Air Capture* oppure indirettamente, sfruttando biomasse che assorbono naturalmente CO₂ durante i processi metabolici. Bisogna, tuttavia, considerare che al termine del proprio ciclo di vita ogni sostanza organica rilascia anidride carbonica e, dunque, quando si valuta l'impatto di un nuovo processo bisogna anche tener conto di quanto tempo la CO₂ resta “immagazzinata” all'interno del prodotto (Bruhn *et al.*, 2016; Bui *et al.*, 2018).

Negli ultimi anni stanno riscuotendo interesse processi che sfruttano il metabolismo di microrganismi in grado di convertire la CO₂ in prodotti ad alto valore aggiunto; processi di questo tipo presentano vari vantaggi, quali l'assenza di costosi catalizzatori inorganici e di solventi (che spesso hanno un elevato impatto ambientale), l'alta selettività e l'utilizzo di condizioni operative (pressione e temperatura) prossime a quelle ambiente, che si traduce in un notevole risparmio in termini energetici. Tuttavia, operare con batteri è piuttosto delicato poiché il loro metabolismo e, conseguentemente, la loro crescita sono fortemente influenzati da diversi fattori tra cui temperatura, pH, composizione del terreno di coltura, portata di gas in ingresso, concentrazione di CO₂ (sia nel gas che nel *medium*) e configurazione del reattore (Salehizadeh *et al.*, 2020) e in caso di formazione di prodotti liquidi si pone il problema della separazione dal terreno di coltura.

Il presente lavoro di tesi propone lo studio di un processo di CCU per la valorizzazione della CO₂ per via biologica, che consiste nell'impiego del batterio *Acetobacterium woodii* per la produzione di acido formico, acido acetico e acetone a partire da una miscela di H₂ e CO₂.

2. Crescita batterica

La crescita dei batteri avviene attraverso una serie di reazioni chimiche che costituiscono il metabolismo del microorganismo. La velocità di crescita varia da batterio a batterio e dipende da diversi fattori; diagrammando l'assorbanza, che permette di stimare il numero di cellule, o la massa dei batteri in funzione del tempo si ottengono delle curve che presentano un andamento caratteristico (**Figura 2.1**).

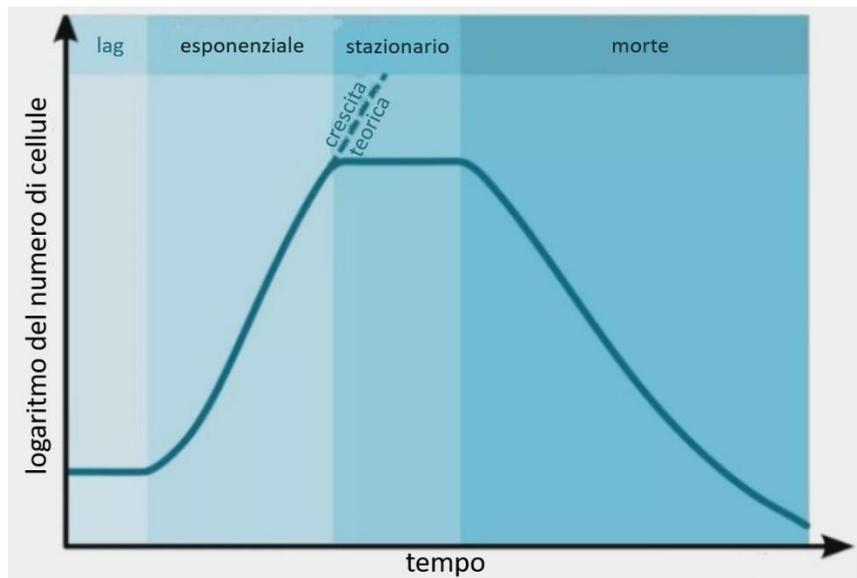


Figura 2.1 Variazione del numero di cellule in funzione del tempo (figura tratta da ThoughtCo sito web con modifiche)

Nella curva di crescita si individuano quattro fasi distinte:

- fase *lag* (o di latenza): la prima parte della curva si presenta piatta in quanto non vi è crescita del numero di cellule e la velocità di crescita è pressoché nulla. Questo andamento è legato alla necessità di adattamento da parte dei microrganismi e la durata dipende dal tempo necessario per la sintesi degli enzimi necessari per la crescita all'interno del nuovo ambiente. Nel caso di *A. woodii* è stato dimostrato sperimentalmente che è possibile ridurre la durata della fase *lag* prelevando dal *medium* precedente una coltura in fase esponenziale oppure inoculando un maggior numero di cellule;
- fase esponenziale: in questa fase il numero di cellule (X) cresce in maniera esponenziale rispetto al numero di divisioni cellulari (n) (equazione 2.1).

$$X = 2^n X_0 \quad (2.1)$$

Riarrangiando l'equazione 2.1 è possibile calcolare il numero di divisioni cellulari necessarie per ottenere la concentrazione di cellule desiderata, a partire da una concentrazione iniziale (X_0) nota (equazione 2.2):

$$n = \frac{\ln X - \ln X_0}{\ln 2} \quad (2.2)$$

Effettuando il bilancio del numero di cellule nella fase esponenziale si ottiene l'equazione 2.3:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\text{spec}} X \quad (2.3)$$

Nell'equazione di bilancio appare il termine μ_{spec} che indica la velocità specifica di crescita e rappresenta il valore massimo assunto dalla velocità di crescita; essendo μ_{spec} un parametro costante, integrando l'equazione 2.3, è possibile calcolarne il valore a partire dal numero di cellule iniziale e dal numero di cellule presenti al generico istante t (X) (equazione 2.4).

$$\mu_{\text{spec}} = \frac{\ln X - \ln X_0}{t} \quad (2.4)$$

- fase stazionaria: la terza fase della curva è caratterizzata da una crescita nulla del numero di cellule, esprimibile matematicamente mediante l'equazione 2.5:

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (2.5)$$

In questa fase le cellule continuano a riprodursi, ma molto più lentamente e allo stesso tempo una parte va incontro a morte e lisi cellulare; questo comportamento è legato ad una carenza di nutrienti o ad un'inibizione della crescita dovuta all'accumulo di prodotti;

- fase di morte (o di declino): nell'ultima parte la curva assume un andamento decrescente, dovuto al maggior numero delle cellule che muoiono e vanno incontro a lisi rispetto a quelle che si riproducono. Dal punto di vista matematico, la variazione rispetto al tempo è di tipo esponenziale decrescente, ma la velocità con cui le cellule muoiono è generalmente minore rispetto a quella assunta durante la fase di crescita esponenziale (Maier e Pepper, 2015).

La crescita dei microrganismi è fortemente influenzata dalle condizioni in cui essa avviene ed ogni specie è in grado di sviluppare correttamente il suo metabolismo solo in determinate condizioni; per questo motivo, risulta necessario individuare quali sono i fattori determinanti affinché la crescita di ciascuna specie avvenga in maniera opportuna. Tali fattori possono essere di natura intrinseca (legati alle caratteristiche fisico-chimiche del substrato) o estrinseca (indipendenti dal substrato e correlati all'ambiente in cui avviene esso si trova). Di seguito sono presentati brevemente i fattori principali che influenzano la crescita dei microrganismi.

2.1 *Influenza della concentrazione di substrato*

L'effetto della concentrazione di substrato sulla velocità specifica di crescita è espresso dall'equazione di Monod, riportata in equazione 2.6, dove μ_{max} indica la massima velocità di crescita ammissibile per una determinata coltura, K_s la costante di mezza saturazione e S la concentrazione di substrato.

$$\mu_{\text{spec}} = \frac{\mu_{\text{max}} S}{K_s + S} \quad (2.6)$$

μ_{max} e K_s sono costanti che dipendono dal substrato utilizzato e dalla temperatura e sono proprietà intrinseche di ciascun tipo di microrganismo; in questo modo μ_{spec} risulta dipendente dalla sola variabile S . Diagrammando μ_{spec} in funzione di S si ottiene il grafico in **Figura 2.2**.

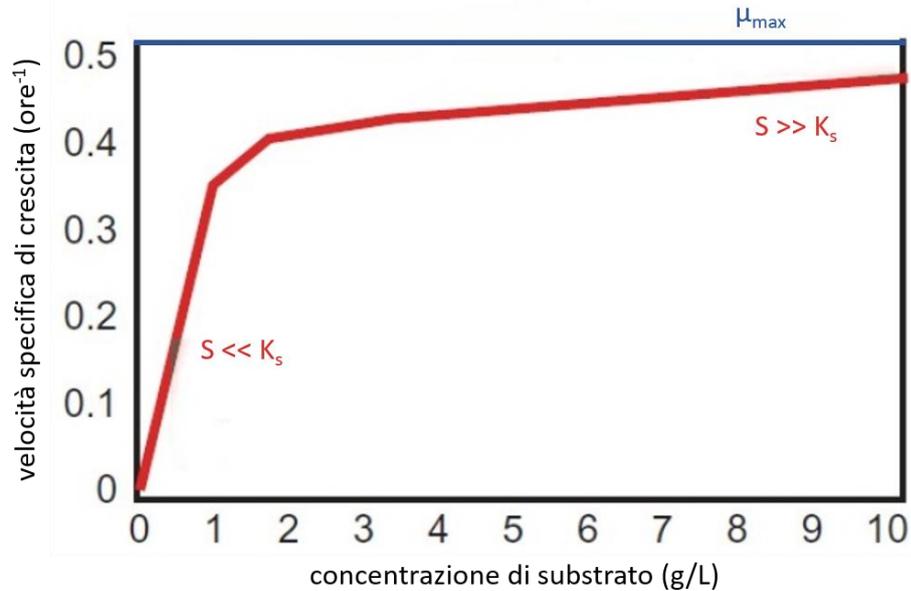


Figura 2.2 Variazione della velocità specifica di crescita in funzione della concentrazione di substrato secondo l'equazione di Monod (figura tratta da Maier e Pepper, 2015 con modifiche)

Come si evince dalla figura sopra riportata, nella curva è possibile individuare una prima zona per cui a bassi valori della concentrazione di substrato la curva assume un andamento lineare rispetto a S e semplificando l'equazione 2.6 si ottiene l'equazione 2.7:

$$\mu_{\text{spec}} = \frac{\mu_{\text{max}}}{K_s} S \quad (2.7)$$

Per valori di S molto elevati, l'espressione della velocità specifica di crescita tende ad assumere un andamento di ordine zero rispetto alla concentrazione di substrato e μ_{spec} diventa approssimabile con μ_{max} .

Sostituendo l'equazione 2.6 nell'equazione 2.3, è possibile esprimere il numero di cellule in funzione della concentrazione di substrato. Per l'andamento della curva risultante sono applicabili le stesse considerazioni fatte per la curva ottenuta diagrammando l'equazione di Monod (Maier e Pepper, 2015).

2.2 *Influenza della temperatura*

Uno dei fattori che maggiormente influenza la crescita dei microrganismi è la temperatura. Per ogni specie sono individuabili tre valori di temperatura che individuano il valore minimo e massimo a cui la crescita può avvenire e la temperatura ottimale a cui si ha la massima velocità di crescita (per ragioni di cinetica, generalmente più vicina a quella massima che a quella minima). Al di sotto della temperatura minima si ha una netta riduzione dell'attività enzimatica con conseguente aumento della fase di latenza; tuttavia le basse temperature non causano la morte delle cellule (se non in piccola misura a causa della formazione di cristalli all'interno del substrato). Per questo motivo l'uso di basse temperature è usato per la conservazione delle specie microbiche piuttosto che per la sterilizzazione. Al contrario, sottoponendo una coltura microbica a temperature ben al di sopra della corrispondente temperatura massima si ha la

denaturazione dei componenti che costituiscono la cellula e ciò porta alla morte del microrganismo; l'uso di alte temperature, quindi, è un espediente usato nei processi di sterilizzazione.

In base ai tre valori di temperatura assunti, è possibile individuare tre classi di microrganismi:

- psicrofili: questi microrganismi sono in grado di sopravvivere a basse temperature (in qualche caso anche fino a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) e la temperatura ottimale è generalmente compresa fra 20 e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- mesofili: è la classe a cui appartiene la maggior parte dei microrganismi, caratterizzata da una temperatura ottimale compresa fra i 28 e $43\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- termofili: sono la classe più resistente, in grado di sopravvivere fino a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e caratterizzata da una temperatura ottimale superiore a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Choi, 2013).

2.3 *Influenza del pH*

L'acidità dell'ambiente è un altro fattore che influenza la crescita microbica. Anche in questo caso è possibile definire delle classi di microrganismi in base al valore del pH ottimale per la crescita; si distinguono microrganismi *acidofili* (pH ottimale acido), *neutrofili* (pH ottimale neutro) e *alcalofili* (pH ottimale basico).

L'importanza del pH ambientale è legata all'influenza che esso ha rispetto all'attività degli enzimi di membrana e all'effetto su altri fattori, quali la concentrazione di sali, l'attività dell'acqua e l'eventuale presenza di soluzioni tampone (Patrignani e Tabanelli, 2013).

2.4 *Influenza della presenza di ossigeno*

L'ossigeno influisce sulla crescita dei microrganismi. La presenza di tale molecola può portare alla formazione di radicali liberi e di sostanze tossiche per il microrganismo. Per alcuni batteri l'ossigeno è necessario per il metabolismo e le loro cellule hanno tutti i meccanismi di difesa dalle specie tossiche che si possono generare dal suo utilizzo. Una specie batterica che non possiede dei meccanismi in grado di degradare le sostanze tossiche prodotte o di prevenirne la produzione, invece, presenta un'intolleranza rispetto all' O_2 . In base al grado di intolleranza nei confronti dell'ossigeno si distinguono:

- microrganismi aerobi obbligati: necessitano della presenza di ossigeno molecolare per sviluppare il loro metabolismo e usano O_2 come accettore finale di elettroni;
- microrganismi anaerobi facoltativi: usano ossigeno per moltiplicarsi ma in assenza di esso sviluppano metabolismi fermentativi traendo energia da altre fonti;
- microrganismi anaerobi obbligati: traggono energia da processi di fermentazione o di respirazione anaerobica e anche piccole concentrazioni di ossigeno causano la loro morte;
- microaerofili: possono essere aerobi o anaerobi; i primi raggiungono la massima velocità di crescita in presenza di basse concentrazioni di ossigeno, mentre i secondi sono in grado di tollerare basse quantità di ossigeno pur non usandolo come accettore finale di elettroni.

Un parametro correlato alla concentrazione di ossigeno è il potenziale di ossido-riduzione (Eh) che indica la tendenza di un substrato ad accettare o cedere elettroni: maggiore è la concentrazione di sostanze ossidate, maggiormente positivo sarà il potenziale di ossido-riduzione; per questo motivo i terreni di coltura dei microrganismi aerobi presentano Eh positivi, mentre in quelli anaerobi si hanno generalmente valori minori di 0 (Patrignani e Tabanelli, 2013). La definizione di potenziale di ossidoriduzione consente di trarre da esso anche informazioni sulle sostanze disciolte nel terreno diverse da O₂ (come i prodotti derivanti dal metabolismo) e permette di correlare pH ed Eh: un pH basso indica la presenza di sostanze acide che generalmente sono ossidanti e, dunque, l'Eh misurato risulterà maggiore.

2.5 *Influenza dell'attività dell'acqua*

L'attività dell'acqua (a_w) indica la frazione di acqua presente all'interno del terreno di coltura non legata ad altre sostanze e, dunque, disponibile all'uso per il metabolismo dei microrganismi. Matematicamente, si esprime come rapporto fra la tensione di vapore dell'acqua all'interno della soluzione (P) e quella dell'acqua pura (P₀) (equazione 2.8):

$$a_w = \frac{P}{P_0} \quad (2.8)$$

Un altro modo per esprimere l'attività dell'acqua è in funzione della quantità di molecole di soluto (n_s) e delle molecole di solvente (n_{sv}) (equazione 2.9):

$$a_w = \frac{n_{sv}}{n_s + n_{sv}} \quad (2.9)$$

La quantità di acqua disponibile dipende anche dal tipo soluto, in virtù della sua capacità di trattenere l'acqua. In base al valore minimo di a_w necessario per la crescita e al tipo di soluto su cui sono in grado di crescere, è possibile classificare i microrganismi secondo le seguenti categorie:

- xerofili: riescono a svilupparsi a valori di a_w bassi, anche inferiori a 0,75;
- alofili: richiedono concentrazioni elevate di sali;
- alotolleranti: crescono in maniera ottimale a basse concentrazioni di sali, ma tollerano anche quantità elevate;
- osmofili: sono in grado di crescere in presenza di alte concentrazioni di zuccheri (Patrignani e Tabanelli, 2013).

3. Descrizione del microrganismo *Acetobacterium woodii*

Acetobacterium woodii è un batterio acetogenico Gram-positivo appartenente alla famiglia delle *Eubacteriaceae*, isolato per la prima volta nel 1977. Le caratteristiche principali di questo microrganismo sono la forte intolleranza nei confronti dell'ossigeno e la capacità di produrre acetato.

La produzione di acetato può avvenire in due modi: a partire da fonti di carbonio complesse quali alcuni zuccheri esosi (condizioni eterotrofiche), oppure in condizioni autotrofiche riducendo la CO₂ per mezzo di idrogeno molecolare. Il substrato di partenza influisce sulla crescita di *A. woodii*; in eterotrofia la coltura microbica raggiunge la fase esponenziale prima rispetto al caso di crescita in H₂ e CO₂ e presenta un andamento più accentuato (**Figura 3.1**) (Balch *et al.*, 1977). Come verrà spiegato più in dettaglio nel capitolo “Materiali e metodi”, questa caratteristica è comunemente sfruttata durante la fase di inoculo: inizialmente il batterio viene fatto crescere in terreno eterotrofico in maniera tale che raggiunga rapidamente la fase esponenziale; solo successivamente parte della coltura viene trasferita nel terreno autotrofico cosicché il batterio sia già sufficientemente sviluppato quando inizia la crescita in H₂ e CO₂.

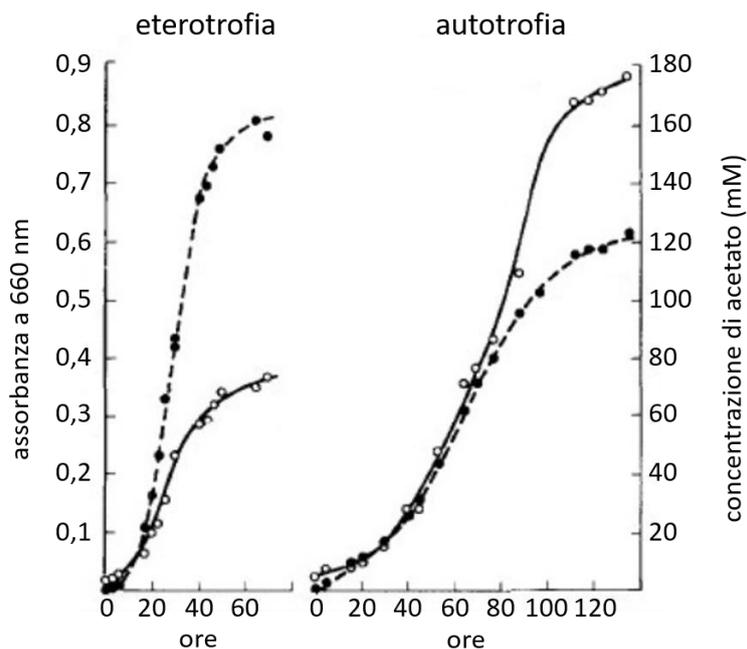


Figura 3.1 Variazione dell'assorbanza a 660 nm (curva tratteggiata con pallini pieni), indice della concentrazione delle cellule, e concentrazione di acetato (curva continua con pallini vuoti) in condizioni eterotrofiche (a sinistra) e in condizioni autotrofiche (a destra) (figura tratta da Balch *et al.*, 1977 con modifiche)

3.1 *Metabolismo*

3.1.1 *Metabolismo eterotrofico*

In condizioni eterotrofiche, *A. woodii* produce tre molecole di acetato a partire da una di zucchero esoso.

Il processo metabolico (**Figura 3.2**) prevede una prima fase in cui lo zucchero esoso è soggetto a glicolisi e porta alla formazione di due molecole di piruvato e due di ATP; successivamente ciascuna delle due molecole di piruvato è soggetta a decarbossilazione per mezzo dell'enzima piruvato-ferredossina ossidoriduttasi (PFOR) e viene dunque convertita in Acetil-CoA e CO₂.

L'acetil-CoA è poi fosforilato dall'enzima fosfato acetiltransferasi e l'acetil-fosfato così ottenuto genera una molecola di acetato e una di ATP mediante una reazione catalizzata dall'enzima acetochinasi. La terza molecola di acetato è prodotta dalle due molecole di CO₂ derivanti dalla decarbossilazione del piruvato che vengono ridotte seguendo il *Wood-Ljungdahl pathway* (Drake *et al.*, 2008), noto anche come *Acetyl-CoA pathway* o con l'acronimo WLP. Tale via metabolica verrà descritta più in dettaglio nella sezione seguente.

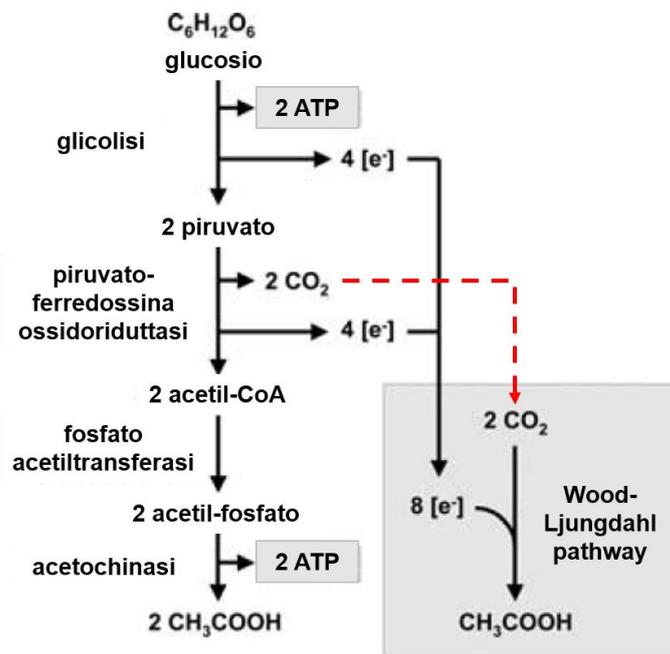


Figura 3.2 Metabolismo eterotrofico di *A. woodii* (figura tratta da Drake *et al.*, 2008 con modifiche)

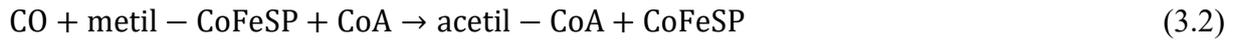
3.1.2 Metabolismo autotrofico

In condizioni autotrofiche la reazione complessiva che porta alla formazione di acetato è descritta dall'equazione 3.1:



Tale reazione avviene mediante una serie di passaggi che costituiscono il già citato *Wood-Ljungdahl pathway* (**Figura 3.3**).

Il WLP si divide in due sezioni: il ramo carbonilico e il ramo metilico. La prima reazione del ramo metilico prevede la conversione di CO₂ in formiato; la successiva conversione di formiato in gruppo metilico avviene attraverso una sequenza di enzimi contenenti tetraidrofolato (THF) e cobalamina. Un altro enzima fondamentale nel WLP è CODH/ACS (*carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase*); CODH catalizza la conversione di CO₂ a CO (ramo carbonilico), mentre ACS favorisce la reazione fra lo stesso CO, il coenzima A e la proteina metilata derivante dal ramo metilico, con formazione di acetil-CoA (equazione 3.2).



Infine, la formazione di acetato da acetil - CoA avviene attraverso la formazione di acetil-fosfato come intermedio, in maniera analoga al metabolismo eterotrofico (Ragsdale, 2008; Schiel - Bengeldorf e Dürre, 2012).

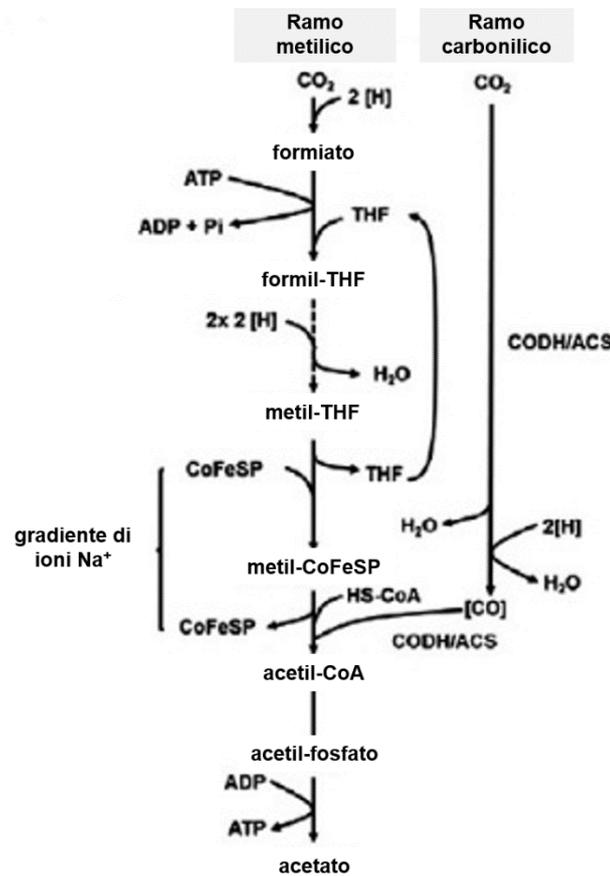


Figura 3.3 Wood-Ljungdahl pathway in *A. woodii* (figura tratta da Schiel - Bengeldorf e Dürre, 2012 con modifiche)

Come si evince da **Figura 3.3**, nel WLP si ha la formazione di una molecola di ATP in seguito alla defosforilazione dell'acetil-fosfato e il consumo di 1 ATP durante la formazione di formil-THF a partire da formiato. Il guadagno di ATP necessario per i processi metabolici risulta quindi non sufficiente, considerando come via generativa di tale molecola solo questa via metabolica. Nel caso di *A. woodii* è stato dimostrato che il WLP è associato alla generazione di un gradiente di ioni Na^+ attraverso la membrana citoplasmatica. Tale gradiente è responsabile della sintesi di ATP a livello della membrana cellulare ad opera di un'ATPasi Na^+ dipendente (Müller et al., 2001, Muller et al., 2008, Westphal-Muller 2018).

3.2 Processi in pressione

Come già detto, i processi biologici presentano diversi vantaggi rispetto ai processi termocatalitici. Tuttavia, affinché un processo possa essere ritenuto competitivo è necessario che abbia produttività elevate; ciò non è affatto scontato nel caso dei processi che sfruttano il

metabolismo dei batteri e una delle cause è da individuare nella bassa velocità di trasferimento del gas all'interno del *medium* (*mass transfer*). L'equazione di bilancio che regola il mass transfer di un generico componente gassoso *i* all'interno di una fase liquida *L* è riportata nell'equazione 3.3.

$$\frac{dX_{i,L}}{dt} = k_L a_i * (Y_i * p * H_i - X_{i,L}) \quad (3.3)$$

Secondo quanto riportato nell'equazione, la velocità di trasferimento del gas all'interno del liquido dipende dal coefficiente di scambio di materia volumico ($k_L a_i$), dalla frazione molare del componente *i* nella fase gas (Y_i), dalla pressione all'interno del reattore (p), dalla costante di Henry relativa ad *i* (H_i) e dalla concentrazione molare di *i* nel liquido ($X_{i,L}$) (Van Hecke *et al.*, 2019).

Per favorire il *mass transfer*, dunque, uno degli espedienti può essere quello di incrementare la pressione all'interno del reattore. Van Hecke *et al.* (2019) riportano alcuni esempi di processi di fermentazione condotti a pressioni moderatamente alte (fino a 10 bar) in cui l'impiego di una pressione più alta rispetto a quella atmosferica comporta effettivamente un aumento delle produttività. Tuttavia, non in tutti i casi riportati si verifica questo miglioramento e anche nei casi migliori sia le produttività sia le concentrazioni di prodotto ottenute non sempre risultano soddisfacenti. È, dunque, necessario approfondire maggiormente queste tecnologie al fine di renderle competitive sul mercato.

Prove in pressione sono state effettuate anche con *A. woodii* (Demler e Weuster-Botz, 2011; Kantzow e Weuster-Botz, 2016). Demler e Weuster-Botz (2011) riportano un esperimento condotto in un reattore batch, mantenuto a pH 7, all'interno del quale viene fatta variare la pressione parziale dell'idrogeno gassoso tra 400 e 1700 mbar; i risultati mostrano che a 1700 mbar dopo 11 giorni la concentrazione di acetato raggiunge 44 g/L (massimo valore riscontrato fino ad allora) e che la produttività specifica (espressa in $\text{g}_{\text{acetato}} \text{g}_{\text{pesocellularesecco}}^{-1} \text{giorni}^{-1}$) aumenta linearmente all'aumentare della pressione parziale di H_2 . Ciò sembra dimostrare come l'idrogeno sia il substrato limitante del WLP e che ad un aumento della sua solubilità corrisponda un aumento delle prestazioni di *A. woodii*.

Le prove condotte da Kantzow e Weuster-Botz (2016) studiano l'influenza della pressione su *A. woodii* analizzando come la curva di crescita del batterio e la concentrazione dei prodotti nel *medium* al termine della fermentazione variano al variare delle pressioni parziali dei gas all'interno del reattore. Gli esperimenti sono stati condotti ad una pressione totale di 3,5 bar; in una prima prova sono stati impiegati 1,4 bar di H_2 , 0,6 bar di CO_2 , 1,5 bar di N_2 , mentre nella prova successiva i rapporti fra le specie gassose sono stati variati in maniera tale da avere 2,1 bar di H_2 , 0,9 bar di CO_2 , 0,5 bar di N_2 . Nel primo esperimento, dopo circa 3 giorni dall'inoculo si osserva una minor concentrazione di acetato rispetto alla fermentazione condotta a 1 bar (0,4 bar di H_2 , 0,2 bar di CO_2 , 0,4 bar di N_2 , così da mantenere costanti i rapporti molari fra le specie gassose), compensata da un aumento della concentrazione di formiato; tale tendenza risulta amplificata in seguito all'aumento della pressione parziale dell'idrogeno da 1,4 a 2,1 bar. Allo stesso tempo, la resa spazio-temporale in acetato (espressa in $\text{g}_{\text{acetato}} \text{L}^{-1} \text{reattore} \text{giorni}^{-1}$) appare decrescente all'aumentare della pressione parziale di H_2 . Nello stesso studio è riportato un esperimento che confronta, a p_{H_2} pari a 1,4 bar, *A. woodii wild type* con due ceppi ingegnerizzati; nel primo ceppo è incrementata l'espressione degli enzimi dipendenti dal cofattore THF (necessari per la conversione di formiato in formil-THF, **Figura 3.3**), mentre nel secondo ceppo si agisce sull'espressione della fosfato acetiltransferasi (PTA) e

dell'acetochinasi (ACK), necessari per la fosforilazione di ADP ad ATP e per la formazione di acetato. I risultati ottenuti mostrano una maggiore crescita dei batteri ingegnerizzati e una netta diminuzione della concentrazione di formiato nel ceppo con sovraespressione di PTA e ACK; l'altro ceppo ingegnerizzato presenta, invece, una concentrazione iniziale di formiato maggiore rispetto al *wild type*, tendenza che dopo i primi due giorni scompare. In base a quanto riportato, sembrerebbe che un aumento della pressione parziale di H₂ comporti un'inibizione degli enzimi che intervengono in alcuni step chiave del *Wood-Ljungdahl pathway*.

3.3 Effetti del bicarbonato sul metabolismo di *A. woodii*

Schuchmann e Müller (2013) riportano la scoperta dell'enzima HDCR (*hydrogen-dependent carbon dioxide reductase*) in *A. woodii*, in grado di catalizzare la conversione diretta di idrogeno molecolare e CO₂ in formiato. Un vantaggio di questo enzima è che non necessita di un cofattore esterno che funge da trasportatore di elettroni e dunque la sua attività è indipendente dal metabolismo del microrganismo; a prova di ciò, esperimenti condotti in assenza di ioni Na⁺ (che, come già riportato nella sezione 3.1.2, sono essenziali per la conservazione di energia in *A. woodii*) hanno mostrato che, in tali condizioni, la produzione di acetato cessa quasi del tutto, mentre quella di formiato non è significativamente influenzata.

Un'altra prova è stata effettuata usando KHCO₃ come substrato al posto di CO₂; *A. woodii* presenta infatti l'enzima carbonato deidratasi (CA) (Braus-Stromeyer *et al.*, 1997) in grado di catalizzare la reazione riportata in equazione 3.4 e può quindi crescere in condizioni autotrofiche anche in assenza di CO₂ gassosa.



Come mostrato in **Figura 3.4**, all'aumentare della quantità di bicarbonato disciolta, la concentrazione di formiato aumenta finché la concentrazione di ioni HCO₃⁻ non supera 0,45 M.

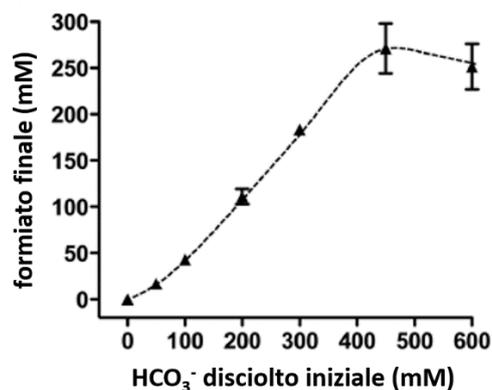


Figura 3.4 Variazione della concentrazione finale di formiato nel *medium* al variare della concentrazione iniziale di bicarbonato disciolto (figura tratta da Schuchmann e Müller, 2013 con modifiche)

Gli effetti della concentrazione di bicarbonato all'interno del terreno di coltura sono stati ulteriormente approfonditi da Schwarz e Müller (2020). Gli esperimenti sono stati condotti su *Thermoanaerobacter kivui*, un batterio termofilo e acetogenico che, al pari di *A. woodii*, presenta l'enzima HDCR e il cui metabolismo segue il WLP. Le prove con un basso contenuto

di KHCO_3 (50 mM) come fonte di carbonio in aggiunta alla CO_2 gassosa hanno mostrato un aumento della concentrazione e della velocità di formazione di acetato rispetto al caso senza bicarbonato e un forte aumento della concentrazione di formiato nei minuti iniziali della prova (Figura 3.5a,b); inoltre, a conferma di quanto già mostrato da Schuchmann e Müller (2013), ad alte concentrazioni di bicarbonato (300 mM) la produzione di acetato risulta pressoché nulla, mentre quella di formiato aumenta notevolmente (Figura 3.5c).

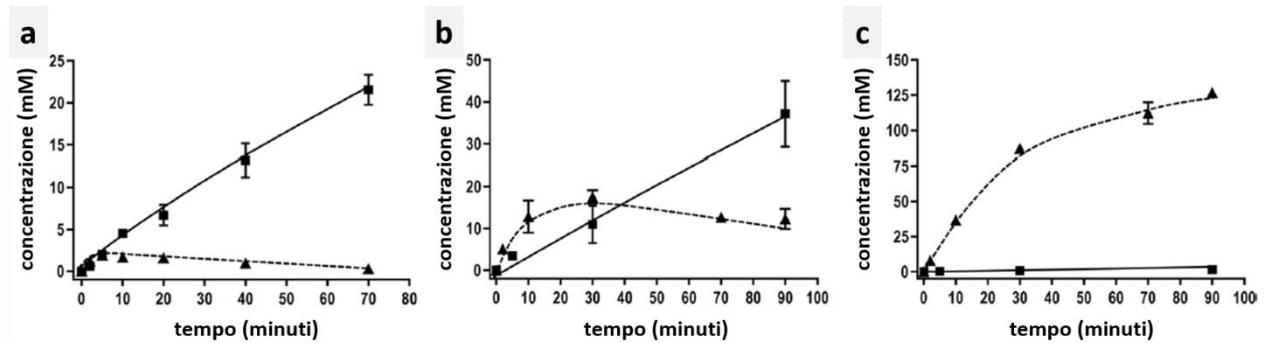


Figura 3.5 Effetto della concentrazione iniziale di KHCO_3 sulla variazione nel tempo della concentrazione di formiato (linea tratteggiata con triangoli) e acetato (linea continua con quadrati) su *T. kivui*. **a** No KHCO_3 ; **b** 50 mM KHCO_3 ; **c** 300 mM KHCO_3 (figura tratta da Schwarz e Müller, 2020 con modifiche)

L'aumento della concentrazione di formiato in presenza di bicarbonato è legato al fatto che la costante di equilibrio della reazione di produzione di formiato (equazione 3.5) è circa 1 e quindi anche un modesto aumento della CO_2 disciolta sposta la reazione verso i prodotti.



Ulteriori esperimenti hanno dimostrato che l'aggiunta di KHCO_3 causa l'inibizione della sintesi di ATP; come riportato in Figura 3.6 con 300 mM di bicarbonato la concentrazione di ATP si annulla immediatamente, mentre con 50 mM si ha comunque una diminuzione, ma meno significativa.

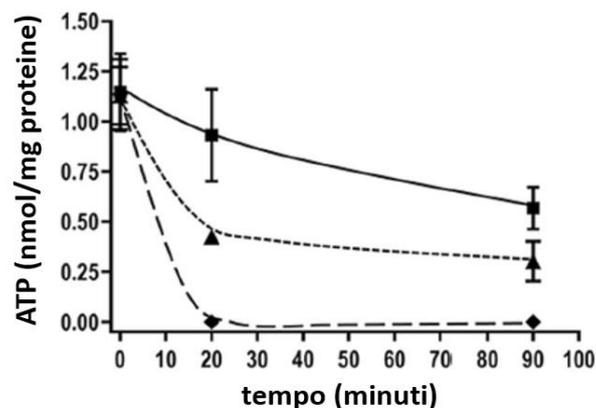


Figura 3.6 Effetto della concentrazione iniziale di KHCO_3 sulla variazione nel tempo della concentrazione di ATP in *T. kivui*. Quadrati, No KHCO_3 ; triangoli 50 mM KHCO_3 ; rombi 300 mM KHCO_3 (figura tratta da Schwarz e Müller, 2020 con modifiche)

Prove in cui è stato utilizzato NaHCO_3 al posto di KHCO_3 hanno evidenziato lo stesso effetto inibitorio nei confronti della sintesi di ATP e ciò dimostra che tale effetto è legato alla presenza dell'anione HCO_3^- che ostacola il legame dell'ADP.

In sintesi, la presenza di alte concentrazioni di bicarbonato influisce sul metabolismo di *T. kivui* inibendo la produzione di ATP e limitando, di conseguenza, il WLP alla sola produzione di formiato. Secondo quanto riportato nella sezione 3.2, un incremento della concentrazione di formiato è stato riscontrato anche in seguito all'aumento della pressione all'interno del reattore. Le due casistiche potrebbero essere correlate in quanto l'aumento della pressione parziale della CO_2 ne favorisce la dissoluzione; in soluzione, la CO_2 reagisce con l'acqua e a pH 7 (valore a cui sono generalmente condotte le prove con *A. woodii*) forma principalmente HCO_3^- .

3.4 Produzione di acetone da *A. woodii* ingegnerizzato

Il presente lavoro di tesi prevede l'uso di *A. woodii* per la sintesi di molecole di interesse industriale con una particolare attenzione alla produzione di acetone. Poiché questo batterio non è in grado naturalmente di produrre tale molecola, il ceppo originale è stato ingegnerizzato con un approccio di biologia molecolare. Per rendere possibile ciò, è necessario infatti apportare modifiche al *Wood-Ljungdahl pathway*, inserendo all'interno del batterio geni che codificano per gli enzimi responsabili della sintesi di acetone. (Figura 3.7). In letteratura, Hoffmeister *et al.* (2016) dimostrano come i geni di *Clostridium acetobutylicum* possano essere inseriti, espressi e funzionanti in *A. woodii* portando alla produzione di acetone.

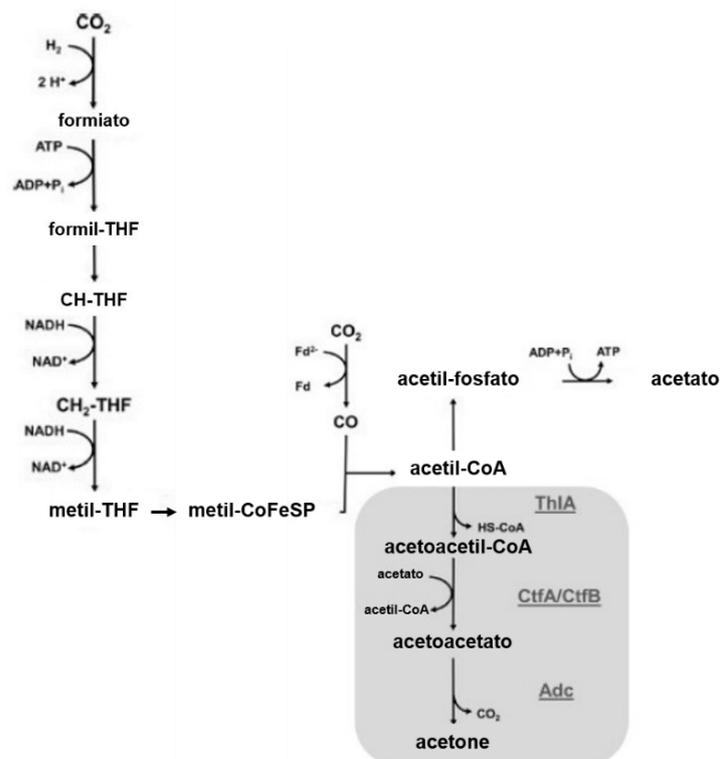


Figura 3.7 *Wood-Ljungdahl pathway* accoppiato al metabolismo di produzione di acetone in *C. acetobutylicum* (figura tratta da Hoffmeister *et al.*, 2016 con modifiche)

Gli enzimi fondamentali per il metabolismo di produzione dell'acetone sono:

- A tiolasi (thlA): catalizza la reazione di formazione di acetoacetyl-coenzima A a partire da due molecole di acetyl-coenzima A;
- CoA transferasi (ctfA/ctfB): favorisce il trasferimento del CoA dall'acetoacetyl-coenzima A ad una molecola di acetato, portando quindi alla formazione di una molecola di acetoacetato e una di acetyl-CoA;
- acetoacetato decarbossilasi (adc): converte l'acetoacetato in acetone con formazione di una molecola di CO₂.

Dunque, per la produzione di una molecola di acetone sono necessarie due molecole di acetato e la reazione complessiva risulta essere:



Le prove di Hoffmeister *et al.* (2016) sono state effettuate in tre sistemi diversi: *serum bottles*, reattore batch con flusso continuo di gas e reattore continuo con separazione e ricircolo della biomassa per mezzo di una membrana di ultrafiltrazione. I risultati delle tre prove sono riportati in **Tabella 3.1**.

Tabella 3.1 Confronto fra i diversi sistemi impiegati per la fermentazione di *A. woodii* pMTL84151_act_{thlA} (tabella tratta da Hoffmeister *et al.*, 2016 con modifiche)

Tipo di fermentazione	OD ₆₀₀ massima	acetato (mM)	acetone (mM)	durata (ore)	produttività (mg L ⁻¹ h ⁻¹)
Serum bottles	0,9	118	15	710,5	1,2
Reattore batch	2,2	1330	16.5	357	3,8
Reattore continuo	9,2	810	52	128	26,4

Dalla tabella si nota come il continuo apporto di *medium* fresco, il recupero della biomassa e il mantenimento della concentrazione di acetato a un valore compreso fra 500 e 800 mM, adottati nella fermentazione in continuo, favoriscano il metabolismo e la crescita delle cellule; ciò si traduce in un aumento della produttività e della concentrazione di acetone. Tuttavia, la complessità del sistema e l'impiego di membrane di ultrafiltrazione comportano che si presti un'attenzione costante al processo e richiedono una maggiore ottimizzazione.

Secondo la stechiometria delle reazioni riportate in equazione 3.1 e in equazione 3.6, assumendo una conversione totale della CO₂, a partire da 100 mol di CO₂ si possono ottenere teoricamente 25 mol di acetato e 16,7 mol di acetone. Tuttavia, secondo i dati riportati in **Tabella 3.2**, ciascuno dei tre sistemi ha rese in acetone ben lontane da quelle teoriche.

Tabella 3.2 Rese in acetato e acetone nei tre sistemi di fermentazione usati; le rese sono state calcolate come moli di prodotto ottenute a partire da 100 moli di CO₂ (tabella tratta da Hoffmeister *et al.*, 2016 con modifiche)

Tipo di fermentazione	Rese in acetato	Rese in acetone
Serum bottles	40,7	5,2
Reattore batch	49,1	0,6
Reattore continuo	47,2	1,9
Resa teorica	25	16,7

Approfondire il metabolismo di *A. woodii* ingegnerizzato e ottimizzare i parametri di fermentazione risulta quindi fondamentale al fine di incrementarne le rese in acetone così da poter porre le basi per la realizzazione di un impianto su grande scala che sia competitivo sul mercato.

4. Acido formico, acido acetico e acetone: produzione e applicazioni

L'analisi di *A. woodii* presentata nel capitolo 3 mostra che questo batterio è un promettente biocatalizzatore e potrebbe trovare largo impiego in ambito industriale in quanto, agendo adeguatamente sul suo metabolismo, a partire da H₂ e CO₂ può portare alla formazione non solo di acido acetico ma anche di acetone e di acido formico. Tuttavia, ad oggi questo microrganismo è poco studiato ed è, dunque, necessario approfondirne la conoscenza prima di riuscirne a sfruttare al pieno le potenzialità su larga scala.

La presente sezione si propone di presentare le modalità con cui sono prodotti acido formico, acido acetico e acetone in ambito industriale e le loro applicazioni.

4.1 Acido formico

L'acido formico (o acido metanoico) è il più semplice fra gli acidi organici (**Figura 4.1**).

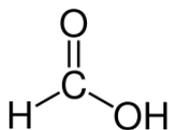


Figura 4.1 Formula di struttura dell'acido formico

La presenza di una catena idrocarburica molto corta comporta una maggiore acidità rispetto agli altri acidi carbossilici. Altre caratteristiche che rendono l'acido formico preferibile agli altri acidi organici sono la maggiore biodegradabilità, la minore corrosività e il minore impatto ambientale (Chen *et al*, 2020). Tali fattori, negli ultimi anni, hanno reso l'acido formico fra i prodotti di maggiore interesse nell'ottica della transizione verso un'industria sostenibile e ciò ha contribuito all'aumento della produzione mondiale di acido formico dalle 390000 tonnellate/anno del 1995 (Weissermel e Arpe, 2003, capitolo 2) alle 600000 del 2020 (Mordor Intelligence sito web, acido formico).

4.1.1 Produzione

Il nome dell'acido formico deriva dalle formiche, da cui è sintetizzato naturalmente e dalla cui distillazione tale sostanza veniva prodotta prima del 1800. Il primo processo di rilevanza industriale è stato sviluppato nel 1855 da Berthelot e si divide in due passaggi: inizialmente viene fatta reagire CO con idrossido di potassio a 100 °C (reazione 4.1):



Il formiato di potassio ottenuto, successivamente, reagisce con acido solforico (reazione 4.2) e dalla distillazione della miscela finale viene separato acido formico:



Nonostante sia molto datato, il metodo sopra descritto è ancor oggi largamente utilizzato.

Il processo tradizionale di produzione di acido formico si basa sull'idrolisi del metilformiato e contribuisce a circa l'80% della produzione mondiale; il metilformiato (HCOOCH₃) è prodotto

a partire da CO e metanolo che reagiscono in presenza di una base forte (reazione 4.3) a una pressione di 40 bar ed una temperatura di circa 80 °C:



L'estere ottenuto è poi soggetto a idrolisi (reazione 4.4) in presenza di una quantità di acqua pari a 5 volte quella del metilformiato.



Tra gli aspetti positivi che hanno decretato la diffusione di questo processo ci sono l'alta concentrazione di acido formico ottenuta (fino al 98%) e la possibilità di ricircolare il metanolo. Tuttavia, l'alto consumo energetico richiesto dai vari passaggi del processo e l'uso del CO, sostanza tossica generalmente prodotta a temperature molto elevate a partire da fonti fossili, rendono questa tecnologia non coerente con i dogmi della *green chemistry*.

Recentemente si stanno diffondendo nuovi processi mirati alla produzione di acido formico con basso impatto ambientale; tra questi sembrano avere concrete possibilità di attuazione su grande scala quelli basati sull'ossidazione e sull'idrolisi di biomasse lignocellulosiche (Bulushev e Ross, 2018).

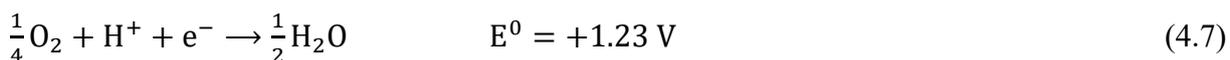
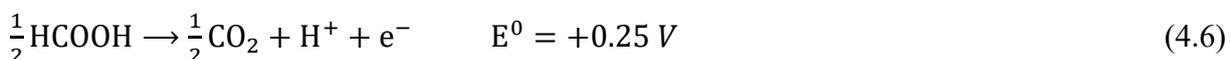
Un'altra idea che si sta diffondendo ultimamente è quella di produrre acido formico a partire da CO₂ e H₂ (reazione 4.5). Lo sviluppo di tecnologie basate su questo concetto consentirebbe la valorizzazione della CO₂ ottenuta mediante tecniche CCS e allo stesso tempo costituirebbe una strada interessante per risolvere il problema dello stoccaggio dell'idrogeno (Alvarez *et al.*, 2017).



4.1.2 Applicazioni

Il settore in cui l'acido formico trova maggiore impiego è quello agroalimentare in cui è usato principalmente come additivo per il mangime degli animali e come agente antibatterico per la conservazione del fieno; ciò spiega l'ampia diffusione in paesi quali Stati Uniti, India e Cina in cui vi è un gran numero di allevamenti. Inoltre, è molto utilizzato nell'industria tessile, farmaceutica, per la concia delle pelli e come intermedio in diversi processi chimici industriali (Mordor Intelligence sito web, acido formico).

Negli ultimi anni sta avanzando l'ipotesi di utilizzare l'acido formico a fini energetici; un possibile impiego è come combustibile nelle *Direct Formic Acid Fuel Cells* (DFAFC), celle a combustibile al cui anodo avviene l'ossidazione dell'acido formico (reazione 4.6) e al catodo la riduzione dell'ossigeno (reazione 4.7).



Fra i fattori che ostacolano la diffusione di questo tipo di cella a combustibile c'è il fenomeno del *crossover* dell'acido formico attraverso la membrana che comporta non solo perdita di reagente ma anche l'avvelenamento del catalizzatore catodico, generalmente costituito da platino (Rees e Compton, 2011).

Come già riportato nella sezione 4.1.1, l'acido formico può essere sintetizzato a partire da H₂ e CO₂ e può, dunque, rappresentare un'alternativa interessante per lo stoccaggio e la diffusione dell'idrogeno; da questo punto di vista l'acido formico risulta ottimo perché ha una capacità volumetrica di 53 g H₂/L a cui corrisponde una densità energetica di 1,77 kWh/L, un valore

superiore a quello di alcuni sistemi a idrogeno a 70 MPa installati sui veicoli commerciali. In alternativa alle sopracitate DFAFC, si potrebbe accoppiare una tecnologia ampiamente consolidata come le PEMFC (*proton-exchange membrane fuel cells*) con le grandi potenzialità dell'acido formico come *energy carrier*, installando a bordo dei veicoli un sistema catalitico, altamente selettivo, in grado di promuovere la reazione inversa a quella riportata in equazione 4.5. In questo modo, diventerebbe possibile realizzare un'infrastruttura (**Figura 4.2**) che, utilizzando acido formico prodotto da fonti rinnovabili, consentirebbe di avere veicoli in grado di emettere meno di 10 g CO₂/km senza incomberne nella spinosa questione del trasporto a bordo dell'idrogeno (Eppinger e Huang, 2017).

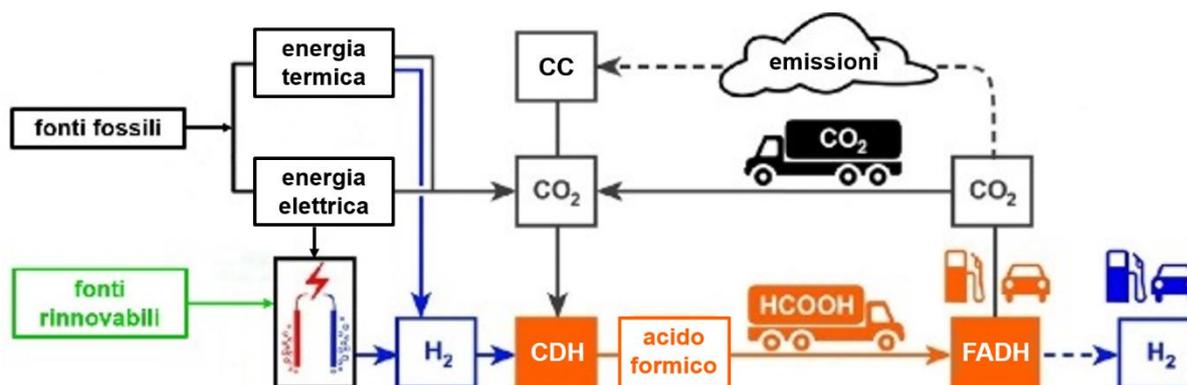


Figura 4.2 Schema di infrastruttura per l'uso acido formico per la produzione di H₂ a bordo di veicoli Fuel Cell (FCV). L'acido formico è prodotto mediante l'idrogenazione della CO₂ (CDH) e la reazione inversa (*formic acid dehydrogenation* – FADH) avviene direttamente nei veicoli e porta alla formazione di H₂ che viene usato per alimentare le fuel cells presenti a bordo. La sostenibilità del processo può essere incrementata usando H₂ prodotto mediante idrolisi usando fonti rinnovabili e CO₂ proveniente da processi di *carbon capture* (CC) (figura tratta da Eppinger e Huang, 2017 con modifiche)

4.2 Acido acetico

L'acido acetico (o acido etanoico) è il secondo acido organico in termini di complessità della molecola (**Figura 4.3**).

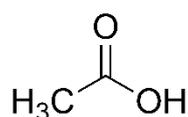


Figura 4.3 Formula di struttura dell'acido acetico

La Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry descrive l'acido acetico come un "liquido chiaro, incolore, corrosivo che ha un odore pungente ed è un forte vescicante".

Già più di 5000 anni fa questo composto era noto e veniva prodotto in soluzioni acquose dalla fermentazione del vino; attualmente viene utilizzato soprattutto per la sintesi di altri prodotti chimici e negli ultimi anni la produzione industriale mondiale è cresciuta notevolmente, passando dai 7,8 milioni di tonnellate del 1998 (Yoneda *et al.*, 2001) ai circa 16 milioni di tonnellate nel 2020 (Mordor Intelligence sito web, acido acetico).

4.2.1 Produzione

La produzione di acido acetico può avvenire per via sintetica o per via batterica; le due vie differiscono non solo per i meccanismi di produzione ma anche per l'uso a cui è destinato il prodotto finale.

Come già anticipato, anticamente l'acido acetico era prodotto a partire dalla fermentazione dell'etanolo. Nell'ultimo secolo, invece, sono stati sviluppati processi chimici che prevedono l'uso di catalizzatori inorganici; il primo processo appartenente a questa categoria ad avere un'ampia diffusione a livello industriale si basa sull'ossidazione dell'acetaldeide (reazione 4.8) in presenza di catalizzatori eterogenei a base di manganese o cobalto.

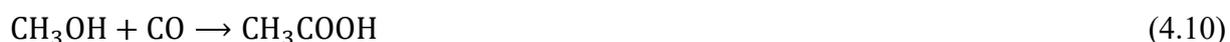


L'acetaldeide usata come reagente è principalmente prodotta secondo il processo Hoechst-Wacker che usa un catalizzatore bimetallico PdCl₂-CuCl₂ per favorire la reazione di ossidazione dell'etilene (reazione 4.9).



La diffusione del processo basato sull'ossidazione dell'acetaldeide accoppiata al processo Hoechst-Wacker è stata ostacolata dalla grande quantità di prodotti secondari generati.

Attualmente, circa l'80% dei processi di produzione dell'acido acetico sfruttano la reazione di carbonilazione del metanolo che viene fatta avvenire in presenza di catalizzatori omogenei a base di rodio o iridio a temperature comprese fra 150 e 200 °C e a pressioni inferiori a 60 bar. Per la realizzazione di questi processi è fondamentale la presenza di promotori alogenati (quali iodometano o acido iodidrico), la cui alta reattività consente di attivare il legame C-O della molecola di metanolo; in questo modo la reazione complessiva (reazione 4.10) avviene in tre passaggi (reazioni 4.11-13) che richiedono energie di attivazione non troppo elevate.



Sono molteplici i processi che sfruttano il meccanismo sopra descritto (tra i più noti Monsanto, Cativa, BASF) e si differenziano per i complessi metallorganici che costituiscono il catalizzatore omogeneo; queste piccole differenze non incidono sulle rese in acido acetico, che in tutti i casi risultano essere superiori al 99%.

L'uso di catalizzatori omogenei nella produzione di acido acetico da carbonilazione del metanolo comporta la necessità di separare i complessi dei metalli preziosi dai prodotti, in quanto questi sono liquidi e corrosivi. Per ovviare a questo inconveniente, recentemente la BP ha sviluppato il processo BP-SaaBre che produce acido acetico a partire da *syngas* (CO e H₂) usando catalizzatori eterogenei; la reazione avviene in più passaggi che coinvolgono la formazione di metanolo, dimetil etere (DME) e acetato di metile come intermedi di reazione (Budiman *et al.*, 2016).

I processi di produzione di acido acetico per via biologica, attualmente, ricoprono circa il 10% della produzione totale mondiale; tuttavia, essi restano fondamentali perché secondo la gran parte delle norme vigenti in tutto il mondo l'aceto usato a scopi alimentari (costituito da una soluzione acquosa contenente il 4-6% di acido acetico) non può essere prodotto per via sintetica.

Il processo di fermentazione più comune si suddivide in due fasi: la prima fase (fermentazione alcolica) avviene in condizioni anaerobiche e prevede la conversione degli zuccheri in etanolo per mezzo di colture di *Saccharomyces cerevisiae* o altri lieviti; nella fase successiva (fermentazione acetica) vengono usati batteri appartenenti al ceppo *Acetobacter* per ossidare, in condizioni aerobiche, l'etanolo in acido acetico (Vidra e Németh, 2018).

La fermentazione può essere lenta o rapida; nel primo caso i batteri sono disposti sulla superficie del liquido a contatto diretto con l'aria e le tempistiche lunghe consentono di ottenere un prodotto più aromatico e di qualità maggiore (Raspor e Goranovič, 2008).

Come già più volte ribadito, i processi biologici sono da preferire a quelli sintetici, fra le altre motivazioni, per le condizioni operative più blande e per la possibilità di usare fonti rinnovabili; tuttavia, i processi di fermentazione sono lenti ed hanno basse produttività. Secondo Pal e Nayak (2017), lo sviluppo di sistemi a membrane sempre più efficienti e performanti, da affiancare ai fermentatori per purificarne le correnti liquide in uscita, consentirebbe di raggiungere produttività e purezze elevate, ottenendo così degli impianti più *green* e con profitti confrontabili con quelli sintetici diffusi attualmente.

4.2.2 Applicazioni

In ambito industriale, l'acido acetico è ampiamente impiegato nella produzione del monomero di vinil acetato (VAM), il cui polimero è usato per la produzione di adesivi, vernici o nel settore tessile. Oltre che per la produzione di VAM, l'acido acetico funge da precursore per la formazione di anidride acetica e di esteri che trovano impiego come solventi.

Come solvente liquido puro è principalmente utilizzato nel processo di produzione dell'acido tereftalico (TPA), precursore del PET, mentre nella sua forma priva di acqua (nota come "glaciale") è un ottimo solvente protico polare (Pal e Nayak, 2017).

Similmente a quanto descritto nella sezione 4.1.2 per l'acido formico, anche l'acido acetico può essere usato per la produzione di idrogeno gassoso attraverso una reazione di steam reforming (reazione 4.14).



L'utilizzo di acido acetico proveniente da fonti rinnovabili, quali il *bio-oil*, porterebbe allo sviluppo di una tecnologia *carbon neutral* e contribuirebbe a risolvere il problema del trasporto e dello stoccaggio dell' H_2 . Tuttavia, i catalizzatori finora analizzati non forniscono risultati soddisfacenti se applicati al *bio-oil* e sono necessari ulteriori studi prima che questa tecnologia possa trovare applicazione a livello industriale (Chen *et al.*, 2017).

Un impiego molto interessante che l'acido acetico può assumere è come precursore per la produzione di bioplastiche. Al Rowaihi *et al.* (2018) riportano lo studio di un sistema che accoppia la produzione di acetato a partire da H_2 e CO_2 per mezzo di *A. woodii* alla produzione di PHB (poli- β -idrossibutirrato) ad opera del microrganismo aerobico *Ralstonia eutropha*. L'idea di base è quella di condurre la fase di produzione di acetato a pressioni moderatamente elevate (2 bar o 5.5 bar), in modo da favorire il *mass transfer* della fase gassosa all'interno del liquido e ridurre le tempistiche della fermentazione, e utilizzare un *medium* ottimizzato che vada bene per entrambe le fasi del processo; in questo modo, si avrebbe un sistema piuttosto semplice che richiede solo la filtrazione e l'aggiustamento del pH del *medium* fra la sezione di fermentazione e quella di produzione di PHB.

4.3 Acetone

L'acetone, noto anche come propanone o dimetilchetone, è il più semplice fra i chetoni alifatici, una classe di composti organici caratterizzata dalla presenza di un gruppo carbonilico (C=O) il cui carbonio è legato a due catene idrocarburiche (**Figura 4.4**).

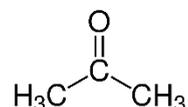


Figura 4.4 Formula di struttura dell'acetone

Appare come un liquido incolore, infiammabile e dall'odore pungente; la presenza del gruppo carbonilico conferisce polarità alla molecola e questa caratteristica rende l'acetone totalmente solubile in acqua e in altri solventi, nonché un ottimo solvente polare che trova impiego in diversi settori (Kirk-Othmer, 2004).

Il mercato globale dell'acetone nel 2020 ammonta a circa 4,7 miliardi di dollari (Market Data Forecast sito web) a cui corrisponde una produzione di 6,9 milioni di tonnellate, valore che secondo le previsioni dovrebbe crescere nei prossimi anni, fino a raggiungere i 7,3 milioni di tonnellate nel 2027 (Research and Markets sito web).

4.3.1 Produzione

Il primo processo industriale utilizzato per la produzione di acetone consiste nella distillazione a secco dell'acetato di calcio che veniva ottenuto dalla distillazione del legno o dalla fermentazione dell'etanolo.

A partire dagli anni '50 e '60 si sono diffusi nuovi metodi, tra cui l'ossidazione del cumene in fenolo e acetone (processo Hock) che attualmente rappresenta il principale metodo di produzione per entrambi i prodotti (Sifniades *et al.*, 2011). Il cumene è prodotto industrialmente mediante l'alchilazione del benzene per mezzo di propilene che avviene in presenza di catalizzatori acidi o, tendenza che si sta diffondendo negli ultimi anni, di zeoliti. La reazione che porta alla formazione di acetone e fenolo a partire da cumene avviene in due passaggi (**Figura 4.5**): inizialmente, avviene l'ossidazione del cumene attraverso un meccanismo di reazione radicalico che porta alla formazione di idroperossido di cumene (CHP); successivamente, il CHP viene decomposto in fenolo e acetone in presenza di un catalizzatore acido che presenta una forte selettività rispetto ai prodotti desiderati.

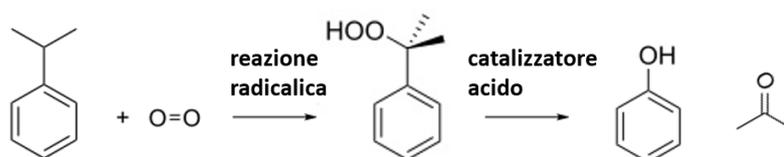


Figura 4.5 Meccanismo di reazione per la produzione di fenolo e acetone per ossidazione del cumene

Una rappresentazione schematica del processo al cumene è riportata in **Figura 4.6**. La sezione in cui avvengono i due step della reazione presenta una parte intermedia in cui avviene la concentrazione dell'idroperossido di cumene; generalmente tale operazione consente di

raggiungere concentrazioni di CHP fino all'85% ed è condotta a pressioni molto basse in maniera tale che l'evaporazione del cumene possa avvenire a temperature minori e il cumene possa essere ricircolato ai reattori all'interno dei quali avviene la reazione di ossidazione radicalica.



Figura 4.6 Schema del processo al cumene (figura tratta da Schmidt, 2004 con modifiche)

La parte finale del processo prevede la separazione e purificazione dei prodotti. La corrente in uscita dalla sezione di decomposizione viene prima neutralizzata per via della presenza degli acidi utilizzati per catalizzare la reazione e successivamente passa all'interno di una colonna la cui corrente di coda è mandata alla sezione di purificazione del fenolo; la corrente di testa entra all'interno di un'ulteriore colonna che separa acetone (in testa) dalle impurità. Con questo sistema la purezza dell'acetone può raggiungere il 99,9%.

La grande diffusione del processo descritto è legata a svariati fattori tra cui l'uso di condizioni operative modeste (e quindi basso consumo energetico), l'alta selettività (fino al 95% molare), il basso consumo di reagenti e l'elevata purezza dei prodotti ottenibile; inoltre, il principale sottoprodotto che si forma è α -metilstirene che può essere venduto come prodotto o idrogenato a cumene e ricircolato al processo, riducendo così ulteriormente il consumo di cumene (Schmidt, 2005; Zakoshansky, 2007).

Un altro metodo utilizzato per la produzione di acetone consiste nella deidrogenazione dell'alcol isopropilico (reazione 4.15).



La reazione, endotermica, è condotta all'interno di un reattore PFR (*Plug Flow Reactor*); a una temperatura intorno ai 200 °C, in presenza di un catalizzatore contenente il 30% in peso di NiO si può raggiungere una conversione del 98% e una selettività del 100% rispetto all'acetone.

Tra i motivi per cui la deidrogenazione dell'alcol isopropilico è considerabile una buona alternativa al processo di ossidazione del cumene ci sono la minor complessità dell'impianto, la formazione di un prodotto secondario altamente valorizzabile come l'idrogeno e, aspetto importante per il mercato, la possibilità di svincolare la produzione di acetone da quella di fenolo (Neamah, 2017; Said *et al.*, 2016).

Per quanto riguarda i processi biologici, il più diffuso e studiato è la fermentazione ABE, il cui nome deriva dalla simultanea produzione di acetone, butanolo ed etanolo. Il genere dei batteri utilizzati per la fermentazione è quello dei *Clostridium*, il cui metabolismo prevede una fase solventogenica che sfrutta i prodotti della precedente fase acetogenica per formare acetone, butanolo ed etanolo (Figura 4.7).

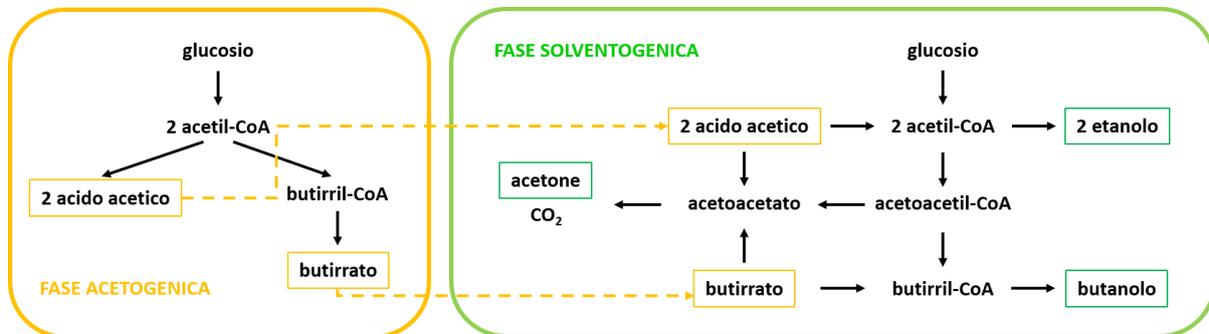


Figura 4.7 Metabolismo di *Clostridium acetobutylicum*. I prodotti della fase acetogenica (a sinistra) sono usati nella fase solventogenica (a destra) (figura tratta da Karimi *et al.*, 2015 con modifiche)

Il microrganismo maggiormente impiegato nei processi industriali (diffusi soprattutto in Cina) è *C. acetobutylicum* che produce una miscela ABE in rapporto 3:6:1 in peso; da questo rapporto emerge come l'importanza di questo tipo fermentazione è principalmente legata alla possibilità di produrre butanolo a partire da biomasse di prima o seconda generazione piuttosto che alla produzione di acetone.

I problemi che si riscontrano nella fermentazione ABE sono principalmente l'inibizione del metabolismo oltre una certa concentrazione degli stessi prodotti e le rese basse; ciò comporta la necessità di complessi sistemi di separazione e purificazione in uscita dal fermentatore (Karimi *et al.*, 2015; Kujawska *et al.*, 2015; Ni e Sun, 2009).

4.3.2 Applicazioni

L'acetone è principalmente usato come solvente o come intermedio per la produzione di altre sostanze. Come solvente trova largo impiego nel trattamento di vernici e smalti e per la produzione di prodotti farmaceutici e cosmetici.

Il polimetilmetacrilato (PMMA), noto comunemente come Plexiglas, è un polimero del MMA molto usato per la produzione di pellicole acriliche, resine o come precursore di ulteriori polimeri o prodotti chimici. Il MMA è realizzato industrialmente a partire dalla reazione di condensazione fra acetone e cianuro di idrogeno (HCN) da cui si genera la relativa cianidrina; successivamente la cianidrina reagisce con acido solforico e metanolo per formare MMA.

Un altro importante composto ottenuto a partire dall'acetone è il bisfenolo A, la cui sintesi avviene a partire da due molecole di fenolo e una di acetone. Il bisfenolo A è usato per la produzione di policarbonati e resine epossidiche; i primi formano delle plastiche molto resistenti che trovano impiego in svariati settori, mentre le resine epossidiche sono usate per la formazione di materiali compositi avanzati (Kirk-Othmer, 2004; Sifniades *et al.*, 2011).

5. Scopo del lavoro

Il presente lavoro di tesi contribuisce al progetto ENGICOIN (Progetto EU ENGICOIN sito web) che si propone di valorizzare per via biologica la CO₂ ottenuta come sottoprodotto del processo di upgrading del biogas, derivante da un impianto di digestione anaerobica, a biometano.

Il progetto ENGICOIN prevede lo sviluppo di tre *microbial factories* (MFs), ciascuna delle quali sfrutta il metabolismo di una determinata specie batterica per la produzione di prodotti ad alto valore aggiunto. Di seguito sono riportati i prodotti di interesse e i microrganismi impiegati in ciascuna delle tre MFs:

- MF1: usa il cianobatterio *Synechocystis* per la produzione di acido lattico, precursore del polilattato;
- MF2: si basa sulla sintesi di poliidrossialcanoati (PHA), impiegati per la produzione di bioplastiche, dal metabolismo di *Ralstonia eutropha*, un batterio aerobico e tollerante ai metalli tossici;
- MF3: sfrutta ceppi di *Acetobacterium woodii* ingegnerizzato per produrre acetone.

Oltre all'anidride carbonica, *A. woodii* richiede H₂ per portare a compimento la via metabolica di riduzione della CO₂; tale reagente viene prodotto in maniera sostenibile mediante un elettrolizzatore PEM (*proton-exchange membrane*) che usa energia elettrica proveniente da fonti rinnovabili.

L'attività sperimentale della presente tesi fa riferimento alla MF3. L'obiettivo degli esperimenti condotti è lo studio dei fattori che influenzano la crescita di *A. woodii* in ambiente autotrofico e di come essi incidono sulla produzione di acetone, acido formico e acido acetico; infatti, sebbene la MF3 abbia come interesse principale la produzione di acetone, anche l'acido acetico risulta interessante ai fini del progetto ENGICOIN in quanto, come riportato nel paragrafo 4.2.2, esso può essere usato come precursore per la produzione di PHB (un poliidrossialcanoato), consentendo, dunque, di accoppiare MF3 e MF2.

La prima parte degli esperimenti studia gli effetti della CO₂ disciolta nel terreno di coltura sulla deviazione del WLP verso la produzione di acido formico. Come prima analisi, sono state effettuate prove in *serum bottle* con concentrazioni variabili di KHCO₃, i cui risultati sono stati confrontati con quelli di campioni contenenti quantità analoghe di KCl. Successivamente, sono state condotte prove in reattore a 9,8 bar con concentrazioni variabili di CO₂ in ingresso (3% e 30%) così da distinguere gli effetti della pressione parziale di CO₂ da quelli della pressione totale.

La seconda parte dell'attività sperimentale mira all'ottimizzazione del terreno di coltura, valutando come variano la crescita e il metabolismo di *A. woodii* se si rimuovono dal *medium* dei componenti che in un impianto di scala industriale avrebbero un forte impatto economico.

6. Materiali e metodi

Nel presente capitolo vengono descritti nel dettaglio i materiali e i metodi impiegati per la realizzazione delle prove sperimentali.

6.1 Materiali

6.1.1 Composizione del terreno eterotrofico

Affinché la crescita microbica avvenga in maniera corretta, è necessario creare un ambiente che contenga tutte le sostanze necessarie per lo sviluppo del metabolismo del microrganismo e per il mantenimento dei parametri di crescita all'interno del loro range ottimale. Per la crescita di *A. woodii* in ambiente eterotrofico sono richiesti i seguenti reagenti:

- fruttosio: costituisce la fonte di carbonio ed energia per lo sviluppo del metabolismo di *A. woodii* nel caso di crescita in condizioni eterotrofiche;
- NaCl: fornisce gli ioni Na^+ necessari per la conservazione energetica nel metabolismo di *A. woodii*;
- NH_4Cl : fonte di azoto, necessario per la crescita;
- estratto di lievito (YE): fornisce amminoacidi e nucleotidi impiegati nella riproduzione cellulare;
- KHCO_3 : fonte aggiuntiva di carbonio in forma inorganica;
- soluzione tampone: costituito da una miscela di fosfato di potassio monobasico (KH_2PO_4) e dibasico (K_2HPO_4), consente di compensare la presenza di moderate quantità di acidi o basi e mantenere il pH intorno a 7,4;
- MgSO_4 : fonte di magnesio, usato come cofattore di alcuni enzimi impiegati nella replicazione del DNA;
- soluzione di vitamine (DSMZ 141): le vitamine fungono da cofattori per alcuni enzimi necessari per la crescita (la composizione della soluzione è riportata in **Tabella 6.1**);
- soluzione di oligoelementi (SL9): fornisce piccole quantità di minerali e metalli necessari per la crescita (la composizione della soluzione è riportata in **Tabella 6.2**);
- soluzione di selenito e tungstato: tracce di selenito e tungstato favoriscono la crescita microbica (la composizione della soluzione è riportata in **Tabella 6.3**);
- resazurina 1%: indica l'eventuale presenza di O_2 ; in presenza di specie ossidate conferisce alla soluzione un colore blu/rosa, mentre in ambiente ridotto è incolore (**Figura 6.1**);
- L-cisteina cloridrato: riduce eventuali tracce di O_2 residuo all'interno del terreno di coltura dopo la procedura di gasaggio con N_2 o H_2 e CO_2 .

Tabella 6.1 Composizione in mg/L della soluzione di vitamine DSMZ 141

Vitamina	Concentrazione (mg/L)
Biotina	2
Acido folico	2
Piridossina cloridrato	10
Tiamina cloridrato x 2 H ₂ O	5
Riboflavina	5
Acido nicotinico	5
Calcio pantotenato	5
Vitamina B12	0,1
Acido p-aminobenzoico	5
Acido lipoico	5

Tabella 6.2 Composizione in g/L della soluzione di oligoelementi SL9

Composto	Concentrazione (g/L)
Acido nitrilotriacetico	12,8
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	2
ZnCl ₂	0,07
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,1
H ₃ BO ₃	0,006
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,19
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,002
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,036

Tabella 6.3 Composizione in mg/L della soluzione di selenito e tungstato

Composto	Concentrazione (mg/L)
NaOH	500
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	3
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	4



Figura 6.1 Effetto della resazurina sul colore del terreno in presenza di O₂: il terreno contenuto nella bottiglia a sinistra (incolore) è ridotto con L-cisteina, mentre quello a destra (rosa) presenta tracce di O₂

Le soluzioni riportate nelle **Tabelle 6.1-3** presentano concentrazioni di soluti molto basse e perciò la loro realizzazione risulta molto difficile; per questo motivo, si utilizzano soluzioni in cui le concentrazioni dei soluti sono 10 volte maggiori rispetto a quelle riportate.

Similmente, la soluzione tampone (**Tabella 6.4**) e la soluzione contenente NaCl, NH₄Cl, KHCO₃ e YE (**Tabella 6.5**) vengono realizzate in concentrazione 10x e poi diluite in fase di preparazione del terreno.

Tabella 6.4 Composizione in g/L della soluzione tampone 10x

Composto	Concentrazione (g/L)
KH ₂ PO ₄	17,6
K ₂ HPO ₄	84,4

Tabella 6.5 Composizione in g/L della miscela di nutrienti 10x

Composto	Concentrazione (g/L)
NaCl	29
NH ₄ Cl	10
KHCO ₃	60
YE	20

Utilizzando le soluzioni in forma concentrata, è possibile preparare agevolmente 1 L di terreno eterotrofico seguendo le indicazioni riportate in **Tabella 6.6**.

Tabella 6.6 Quantità richieste per la preparazione di 1 L di terreno eterotrofico

Soluzione	Quantità
Soluzione tampone 10x	100 mL
Miscela di nutrienti 10x	100 mL
Fruttosio 2 M	10 mL
MgSO ₄ 0,75 M	2 mL
SL9 10x	100 µL
Selenito-tungstato 10x	100 µL
Vitamine DSMZ 141 10x	200 µL
Resazurina 1%	100 µL
Acqua deionizzata	767,5 mL

La cisteina non è riportata nella **Tabella 6.6** in quanto viene aggiunta al terreno solo in seguito alla fase di degasamento in N₂; anche in questo caso si ricorre all'utilizzo di una soluzione madre (50 g/L) che poi viene diluita in rapporto 1:100 rispetto al volume di terreno complessivo in modo da avere una concentrazione finale di L-cisteina pari a 0,5 g/L.

Oltre alla cisteina, prima dell'inoculo è necessario inserire all'interno del terreno H₂SO₄ in rapporto 1:300 in maniera tale da compensare l'aumento del pH in seguito al cambio gas in N₂ e, eventualmente, tiamfenicolo. Quest'ultimo è un antibiotico che viene usato solo nel caso di impiego di ceppi di *A. woodii* ingegnerizzati mediante l'uso di plasmidi, costrutti circolari di DNA inseriti all'interno del citoplasma, che nel caso dei microrganismi impiegati nel presente lavoro contengono sia le sequenze necessarie per la produzione di acetone sia i geni che sviluppano la resistenza agli antibiotici. La presenza di antibiotici all'interno del terreno di coltura rende necessaria, per permettere al batterio di sopravvivere, l'espressione dei sistemi di resistenza agli antibiotici codificati nei plasmidi. Poiché sullo stesso plasmide sono presenti sia i geni di resistenza che i geni responsabili del *pathway* dell'acetone, quando il plasmide viene replicato e mantenuto nella cellula per contrastare la pressione selettiva data dall'antibiotico vengono mantenuti anche i geni per la sintesi di acetone.

6.1.2 Composizione del terreno autotrofico

I reagenti necessari per la crescita ottimale in ambiente autotrofico sono gli stessi del terreno di coltura eterotrofico, con alcune piccole differenze: non si usano fruttosio e KHCO₃ come fonti di carbonio e non è richiesta l'aggiunta di acido solforico in seguito alla fase di degasamento in N₂. Nel terreno autotrofico, infatti, dopo aver rimosso l'aria con azoto puro si ha un ulteriore cambio di gas che prevede l'iniezione di una miscela di H₂ e CO₂, che acidifica il terreno.

Le quantità delle soluzioni impiegate per la preparazione del terreno sono le stesse di quelle riportate nelle tabelle relative al terreno eterotrofico, con l'unica differenza che l'assenza della soluzione 2 M di fruttosio è compensata da un'aggiunta di 10 mL di acqua deionizzata.

6.2 Metodi

Tutte le operazioni che precedono l'inoculo, così come quelle effettuate durante la crescita del batterio devono essere condotte in maniera tale da garantire la sterilità del sistema e il mantenimento della condizione di anaerobiosi; per questo motivo è necessario prendere i dovuti accorgimenti e utilizzare strumentazioni appropriate.

6.2.1 Preparazione del terreno

Il primo step della fase di preparazione del terreno di coltura consiste nella realizzazione della soluzione tampone e della soluzione di nutrienti concentrate 10X: per preparare 250 mL di ciascuna delle due soluzioni, si scioglie l'opportuno quantitativo di reagenti in un volume di acqua deionizzata di poco inferiore a quello totale della soluzione da preparare e successivamente si porta a volume mediante un cilindro graduato.

Ciascuna delle due soluzioni viene poi inserita in una bottiglia di vetro e sterilizzata in autoclave (**Figura 6.2**) per 50 minuti a 121 °C (condizioni impiegate per tutte le operazioni di sterilizzazione), assicurandosi di lasciare le bottiglie non perfettamente chiuse così da evitare la formazione di sottovuoto durante la fase di raffreddamento.



Figura 6.2 Autoclave da laboratorio

Tutte le altre soluzioni sono richieste in quantità molto piccole e dopo la loro preparazione sono state filtrate con filtri sterili da 0,22 µm.

Per garantire la sterilità, le operazioni di miscelazione delle soluzioni vengono eseguite all'interno di una cappa microbiologica a flusso laminare (**Figura 6.3**), usando vetreria e strumenti di laboratorio accuratamente sterilizzati prima del loro utilizzo.

Nel caso di prove condotte all'interno di *serum bottles*, il volume totale è di 160 mL e in ciascuna di esse vengono inseriti 30 mL di terreno preparato in condizioni aerobiche e quindi da sottoporre ad una successiva fase di rimozione dell'ossigeno.



Figura 6.3 Cappa microbiologica a flusso laminare

6.2.2 Degasamento

La fase di degasamento mira alla rimozione dell'ossigeno dal terreno di coltura e dallo spazio di testa della *serum bottle* o del reattore. Ciò si realizza fluxando N_2 per 40 minuti in 30 mL di terreno nel caso di prove in *serum bottle* (**Figura 6.4**), oppure, nel caso di prove in reattore, per 3 ore in 1 L. Affinché tale procedura risulti efficace, bisogna assicurarsi che l'ingresso del gas avvenga al di sotto del livello del liquido in maniera tale da favorire lo scambio gas-liquido. Per mantenere la sterilità, si pone un filtro da $0,22 \mu m$ sterile sul tubo del gas in ingresso a ciascun sistema.



Figura 6.4 Sistema di degasamento delle *serum bottles*

6.2.3 Cambio gas per crescita in condizioni autotrofiche

Come già ribadito in precedenza, la crescita in condizioni autotrofiche prevede l'uso di H₂ e CO₂ come substrato al posto di fruttosio e altre fonti di carbonio inorganiche, quali KHCO₃. Tale miscela è introdotta nelle *serum bottles* collegandole alla linea gas (**Figura 6.5**) e facendo fluire H₂ e CO₂ in rapporto volumico 2,3:1 per 7 minuti; in questo modo ci si assicura che l'azoto introdotto nella precedente fase di degasamento venga sostituito dalla miscela gassosa di H₂ e CO₂. Lo stesso sistema è utilizzato per ripristinare la pressione all'interno delle *serum bottles* durante le fasi di fermentazione autotrofica in *fed-batch*.

Dato l'impiego di correnti continue di gas, tra cui l'idrogeno che è altamente infiammabile, le operazioni sopra descritte sono condotte all'interno di una cappa chimica *walk-in*.



Figura 6.5 Linea gas per il rifornimento di N₂ e della miscela H₂/CO₂. I *mass flow controllers* sono controllati da un software che consente di impostare la portata dei gas

6.2.4 Valutazione della curva di crescita microbica

Per analizzare l'andamento della crescita microbica si preleva qualche mL di coltura e se ne valuta la densità ottica (OD), un parametro che fornisce una stima della torbidità della soluzione ed è tanto maggiore quanto più alto è il numero di cellule presenti. La concentrazione di biomassa (espressa in gCDW/L, dove gCDW indica il peso secco della biomassa in grammi) si calcola a partire dall'OD mediante la formula riportata in equazione 6.1:

$$\text{conc. biomassa } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = 0,38 * \text{OD} \quad (6.1)$$

Nel presente lavoro, l'OD è stata misurata a 600 nm usando due diversi modelli di spettrofotometro UV-vis: Jasco V-730 (**Figura 6.6**) e Hack Lange DR 5000 (**Figura 6.7**). L'uso di due apparecchiature diverse è stato dettato da ragioni organizzative; per ciascuno degli esperimenti che verranno presentati nelle sezioni successive verrà specificato quale dei due modelli è stato impiegato.



Figura 6.6 Spettrofotometro UV-Vis-NIR Jasco V-730



Figura 6.7 Spettrofotometro UV-Vis Hack Lange DR 5000

Per realizzare le curve di crescita, si prelevano campioni di coltura a tempi diversi e si diagramma l'OD di ciascun campione in funzione del tempo dall'inoculo (che per ogni curva costituisce il tempo 0) a cui il prelievo è avvenuto. Nel caso in cui le prove richiedano la riproduzione in duplicato o triplicato di ciascuna condizione, per la realizzazione delle curve si considera la media di tutti i campioni prelevati allo stesso tempo.

6.2.5 Inoculo e condizioni ottimali di crescita

La fase di inoculo si divide in due step: nel primo, la coltura di *A. woodii* conservata a -20°C viene inoculata in terreno eterotrofico in maniera tale che il microrganismo si trovi subito nelle condizioni migliori per la crescita (per una maggiore chiarezza si rimanda alla **Figura 3.1**) e possa riprendere a sviluppare il proprio metabolismo nel minor tempo possibile; dopo circa due giorni dall'inoculo, la coltura ha generalmente raggiunto la parte alta della fase esponenziale della curva di crescita e l'OD si attesta intorno a 1. A questo punto, si sposta all'interno del terreno autotrofico un quantitativo di coltura che consenta di avere un'OD di circa 0,2 in 30 mL di terreno autotrofico; per fare ciò, si misura l'OD della coltura eterotrofica e, tenendo conto

che vi è una relazione lineare fra questa e la concentrazione delle cellule, mediante l'equazione 6.2 si calcola la quantità da trasferire:

$$\text{volume inoculo} = \frac{0,2 \cdot 30 \text{ ml}}{\text{OD}_{\text{eterotrofico}}} \quad (6.2)$$

Effettuato l'inoculo, le *serum bottles* vengono poste all'interno di un incubatore agitato a 200 rpm e a temperatura controllata a 30°C, così da mantenere le condizioni ottimali per la crescita.

6.2.6 Misura della pressione

La variazione della pressione è un aspetto importante da tenere in conto quando si studia la crescita in condizioni autotrofiche, in quanto consente di fare una stima del quantitativo di gas convertito dai batteri.

Dopo l'inoculo e dopo ogni prelievo di campione si impone una leggera sovrappressione all'interno delle *serum bottles* nella maniera descritta nella sezione 6.2.3, il cui valore in termini di mbar è misurato per mezzo di un manometro (**Figura 6.8**). Prima di effettuare il prelievo successivo, viene rimisurata la pressione, cosicché, utilizzando la legge di gas perfetti, si possa valutare il consumo di carbonio gassoso.



Figura 6.8 Manometro

6.2.7 Misura del pH

A. woodii è sensibile al pH del medium di crescita ed è fortemente inibito nella crescita a pH inferiori a 5,7. Oltre all'OD e alla pressione, quindi, ad ogni prelievo viene misurato il pH di ciascun campione mediante un pHmetro da banco (**Figura 6.9**). Tale misura consente di monitorare se sono stati prodotti acidi e se vi sono state variazioni significative tali da rappresentare un ostacolo per la crescita del microrganismo; nel caso in cui si verifichi un importante abbassamento del pH, si aggiunge NaOH 1 M in quantità tale da alzarne il valore a 7,4 - 7,6.



Figura 6.9 pHmetro da banco

6.2.8 Prove in bioreattore

Le prove in bioreattore sono state effettuate in un reattore appositamente sviluppato per questo tipo di processi dal Politecnico di Torino e dalla ditta costruttrice H.E.L. (UK) in grado di operare con pressioni fino a 11 bar. Il cuore del sistema (**Figura 6.10**) è costituito da un *vessel* di 2 litri di capacità, circondato da una camicia attraverso cui passa olio diatermico. Questo sistema permette sia la sterilizzazione del *vessel* che il controllo della temperatura durante gli esperimenti. L'introduzione della fase liquida all'interno del reattore avviene mediante cinque pompe peristaltiche (evidenziate in rosso in **Figura 6.10**) che alimentano, rispettivamente, terreno di coltura, soluzione alcalina, soluzione acida, soluzione di oligoelementi e agenti antischiuma (nel presente lavoro sono impiegate solo le prime tre), mentre l'iniezione dei gas è regolata da quattro *mass flow controllers* (MFC) (evidenziati in giallo in **Figura 6.10**) e avviene attraverso un *microsparger* posto sul fondo del reattore. L'agitazione è garantita dalla presenza di un agitatore (evidenziato in azzurro in **Figura 6.10**) dotato di turbine Rushton a due livelli e, generalmente, è condotta a 600 rpm. La pressione è controllata da una valvola *Back Pressure Regulation* (BPR) che si apre non appena viene superato il valore di setpoint e rilascia i gas responsabili della sovrappressione all'interno della cappa chimica *walk-in*. Il sistema è, inoltre, dotato di una sonda per la misurazione del pH e di una per la misura del potenziale redox della fase liquida; completano la strumentazione due ulteriori MFC e un *Coriolis Mass Flow Meter* (MFM) per la misura della portata di gas in uscita.

Tutta la strumentazione descritta è collegata ad un software che consente di impostare i parametri della fermentazione e di monitorarne la variazione.

Prima di iniziare la fermentazione, è necessario sterilizzare il reattore e assicurarsi che non vi siano tracce residue di O₂: la sterilizzazione è effettuata inserendo 1 L di acqua deionizzata e portando la temperatura del reattore a 121°C per 25 minuti; successivamente, dopo aver rimosso l'acqua ed essersi assicurati che il reattore si sia raffreddato, si insuffla azoto in maniera tale da rimuovere l'atmosfera contenente ossigeno all'interno. Attraverso la pompa peristaltica, i cui tubi sono stati precedentemente sterilizzati con etanolo 70%, si inseriscono 0,8 L di terreno

sterile (gasato con N_2 secondo le modalità descritte nel paragrafo 6.2.2. Prima di inoculare il batterio, si rimuove l'azoto del terreno fluendo una miscela di H_2 e CO_2 in rapporto volumico 2,3:1 per tre ore con una portata di 75 mL/min. L'inoculo avviene in maniera analoga a quanto descritto nel paragrafo 6.2.5 per le *serum bottles*, ovvero inoculando una coltura eterotrofica in fase esponenziale in quantità tale da avere un'OD di 0,2 all'interno del reattore, calcolata secondo l'equazione 6.2.



Figura 6.10 Bioreattore H.E.L. In rosso sono evidenziate le pompe per l'ingresso dei liquidi, in giallo i MFC per la regolazione di gas, in azzurro l'agitatore

Il prelievo dei campioni per la misura dell'OD e per l'analisi HPLC è effettuato mediante un tubo di campionamento che pesca sul fondo del reattore e fuoriesce dalla piastra di testa. Il prelievo viene effettuato sfruttando la sovrappressione presente all'interno del reattore. Prima di ogni campionamento viene effettuato uno spurgo del tubo (generalmente 3 mL), in maniera tale da non contaminare campioni tra loro successivi con il residuo di fermentazione del tubo precedente.

6.2.9 Analisi dei gas in uscita dal reattore

L'analisi dei gas esausti in uscita dal reattore è effettuata mediante un Micro-GC SRA dotato di due colonne: la prima è una colonna Molsieve 5A che usa argon come fase mobile e consente di separare H_2 , N_2 e O_2 per mezzo di una fase stazionaria costituita da zeolite 5A, mentre la seconda è una PoraPLOT U, la cui fase stazionaria è costituita da un solido polare poroso aderente alle pareti del capillare e la fase mobile è una corrente di elio.

Il rivelatore usato è di tipo TCD (*thermal conductivity detector*), il cui funzionamento si basa sulla differenza di conducibilità termica fra il *gas carrier* puro e la miscela in uscita dalla colonna che comporta una differenza di temperatura fra i filamenti su cui passano i due gas e

induce una variazione della resistenza del rivelatore stesso; in corrispondenza del tempo di ritenzione di ciascuna sostanza rivelata, il cromatogramma finale presenta un picco dalla cui ampiezza si risale alla concentrazione della relativa specie gassosa.

6.2.10 Analisi e quantificazione dei prodotti del metabolismo

Per analizzare la concentrazione delle sostanze disciolte all'interno di ogni campione si usa una colonna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid per effettuare la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC); all'interno di tale colonna, mantenuta a 50 °C da un fornetto termostatico, viene fatta scorrere la fase mobile, costituita da una soluzione 0,005 N di H₂SO₄, ad una portata costante di 0,7 mL/min.

L'apparecchiatura è dotata di due diversi rivelatori posti in serie: il primo è un *photodiode-array detector* (PDA), costituito da un serie di diodi che consentono di avere misure di assorbanza a diverse lunghezze d'onde nello spettro UV-visibile, mentre il secondo è un rivelatore a indice di rifrazione (RID) che emette un segnale ogni qualvolta l'indice di rifrazione dell'eluato risulta diverso da quello della fase mobile pura. L'utilità di due diversi rivelatori risiede nel fatto che il rivelatore PDA ha un'alta selettività in virtù della possibilità di selezionare la lunghezza d'onda più appropriata per l'analisi di ciascuna specie, ma non è in grado di rivelare composti che non assorbono nel campo UV-visibile, quali zuccheri e alcoli; in presenza di queste sostanze emerge l'importanza del rivelatore RID, che nonostante abbia una sensibilità meno elevata presenta un ampio campo di applicabilità.

6.2.11 Definizione delle rette di calibrazione per le analisi HPLC

Il principio di funzionamento dell'HPLC è analogo a quello del GC, ovvero il campione da analizzare viene iniettato e trasportato lungo una colonna di separazione (fase stazionaria) dalla fase mobile. Nel cromatogramma risultante si identificano i picchi relativi a ciascuna molecola disciolta e se ne determina l'ampiezza: ognuna di esse infatti è caratterizzata da uno specifico tempo di ritenzione.

C'è una corrispondenza lineare fra la concentrazione di ciascuna delle sostanze separate in HPLC e l'area del picco corrispondente. Per poter correlare l'area dei picchi identificati alla concentrazione delle molecole, è necessario definire delle rette di calibrazione. Per fare ciò si preparano delle soluzioni a concentrazione nota per ciascuna delle molecole di interesse e si interpolano i punti individuati graficando l'area del picco ottenuto in funzione della concentrazione nota. Dalla stessa curva di calibrazione è, inoltre, possibile identificare i tempi di ritenzione precisi per ciascuna molecola.

6.2.11.1 Rette di calibrazione per il rivelatore PDA

Come già anticipato, il rivelatore PDA non consente di individuare la presenza di zuccheri e per questo motivo non è stata realizzata la retta di calibrazione del fruttosio.

Nelle tabelle seguenti (**Tabelle 6.7-9**) sono riportati i valori di concentrazione impiegati per la definizione delle rette di calibrazione di acido formico, acido acetico e acetone, l'area dei relativi picchi e i tempi di ritenzione; inoltre, per ogni composto è specificata la lunghezza d'onda impiegata. Ad ogni tabella è associato un grafico (**Figure 6.11-13**) in cui è riportata la retta di calibrazione risultante con la relativa equazione e il relativo coefficiente di determinazione R².

Tabella 6.7 Concentrazioni impiegate per la retta di calibrazione dell'acido formico con le relative aree e tempi di ritenzione individuati dal rivelatore PDA ad una lunghezza d'onda pari a 206 nm

Concentrazione (mM)	Area picco	Tempo di ritenzione (min)
50	1783984	12,568
100	3726545	12,577
150	5581221	12,573
200	7574531	12,577

Il tempo di ritenzione medio (che verrà preso come riferimento per l'analisi dei dati) risulta essere 12,574.

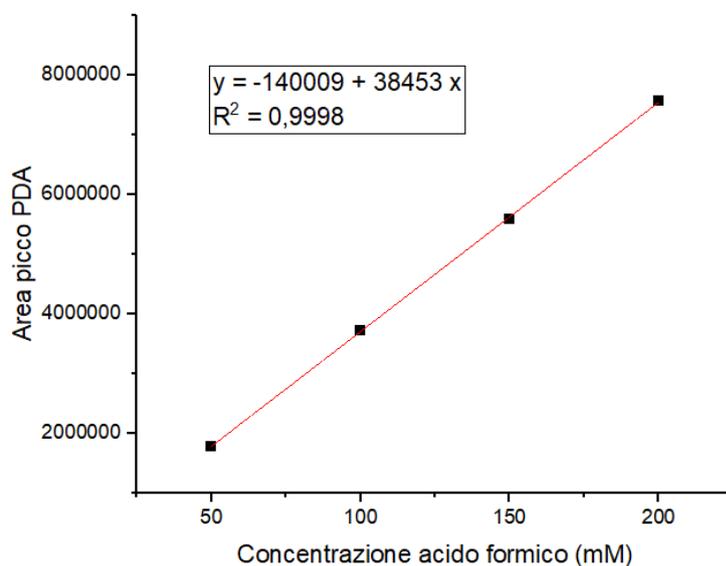


Figura 6.11 Retta di calibrazione dell'acido formico per il rivelatore PDA

Tabella 6.8 Concentrazioni impiegate per la retta di calibrazione dell'acido acetico con le relative aree e tempi di ritenzione individuati dal rivelatore PDA ad una lunghezza d'onda pari a 212 nm

Concentrazione (mM)	Area picco	Tempo di ritenzione (min)
50	1226366	13,691
100	2548659	13,692
150	3843408	13,682
200	5197719	13,679

Il tempo di ritenzione medio risultante è 13,686.

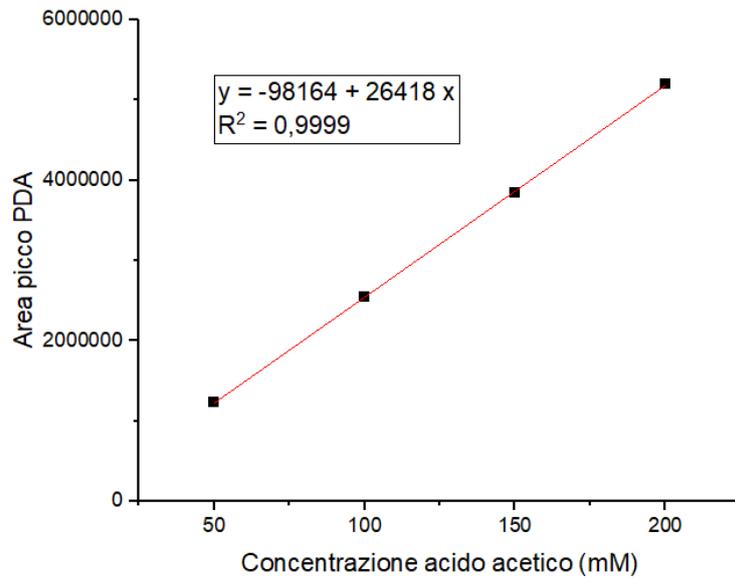


Figura 6.12 Retta di calibrazione dell'acido acetico per il rivelatore PDA

Tabella 6.9 Concentrazioni impiegate per la retta di calibrazione dell'acetone con le relative aree e tempi di ritenzione individuati dal rivelatore PDA ad una lunghezza d'onda pari a 264 nm

Concentrazione (mM)	Area picco	Tempo di ritenzione (min)
5	57648	19,792
10	125839	19,779
15	186090	19,782
20	260404	19,763

Il tempo di ritenzione medio risultante è 19,779.

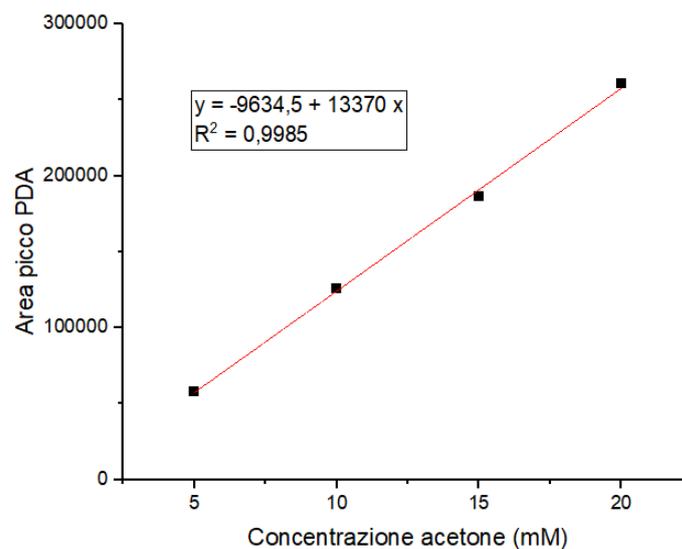


Figura 6.13 Retta di calibrazione dell'acetone per il rivelatore PDA

6.2.11.2 Rette di calibrazione per il rivelatore RID

Il principio di funzionamento del rivelatore RID consente di individuare anche sostanze che non assorbono lunghezze d'onda nel campo UV-visibile; per questo motivo, per questo tipo di rivelatore è stata valutata anche la retta di calibrazione per il fruttosio.

Analogamente alla sottosezione 6.2.11.1, di seguito sono riportate le aree dei picchi e i tempi di ritenzione associati a ciascun campione di riferimento (**Tabelle 6.10-13**) e le rette di calibrazione derivanti dall'interpolazione dei dati (**Figure 6.14-17**); per ciascuna sostanza i tempi di ritenzione risulteranno leggermente maggiori rispetto a quelli del rivelatore PDA semplicemente perché quest'ultimo è posizionato prima rispetto al RID.

Tabella 6.10 Concentrazioni impiegate per la retta di calibrazione del fruttosio con le relative aree e tempi di ritenzione individuati dal rivelatore RID

Concentrazione (mM)	Area picco	Tempo di ritenzione (min)
5	93208	9,364
7,5	137418	9,363
15	291804	9,365

Il tempo di ritenzione medio risultante è 9,364.

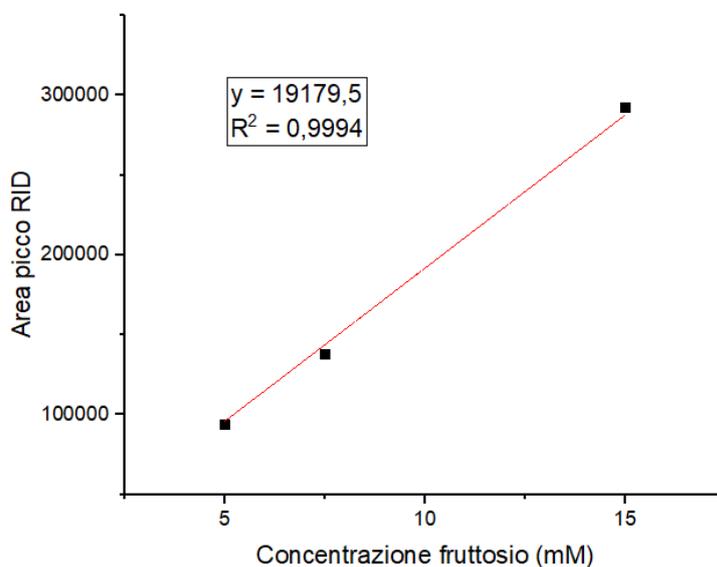


Figura 6.14 Retta di calibrazione del fruttosio per il rivelatore RID

Tabella 6.11 Concentrazioni impiegate per la retta di calibrazione dell'acido formico con le relative aree e tempi di ritenzione individuati dal rivelatore RID

Concentrazione (mM)	Area picco	Tempo di ritenzione (min)
50	83995	12,773
100	175689	12,778
150	263873	12,778
200	359037	12,781

Il tempo di ritenzione medio risultante è 12,778.

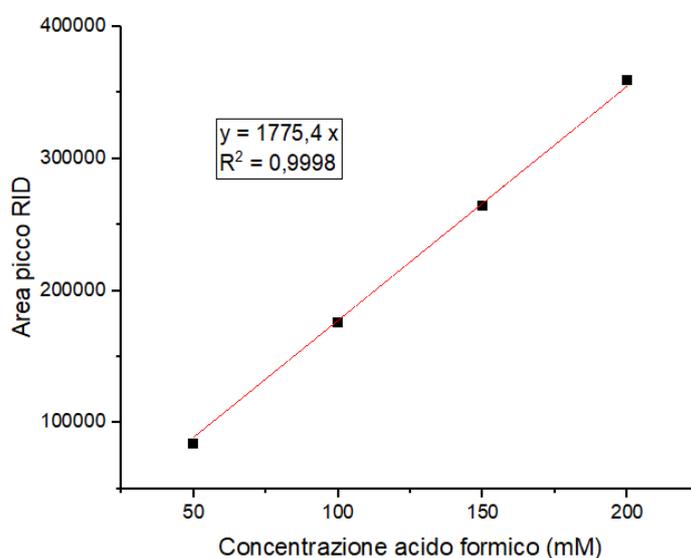


Figura 6.15 Retta di calibrazione dell'acido formico per il rivelatore RID

Tabella 6.12 Concentrazioni impiegate per la retta di calibrazione dell'acido acetico con le relative aree e tempi di ritenzione individuati dal rivelatore RID

Concentrazione (mM)	Area picco	Tempo di ritenzione (min)
50	147073	13,897
100	305371	13,894
150	462856	13,889
200	627801	13,885

Il tempo di ritenzione medio risultante è 13,891.

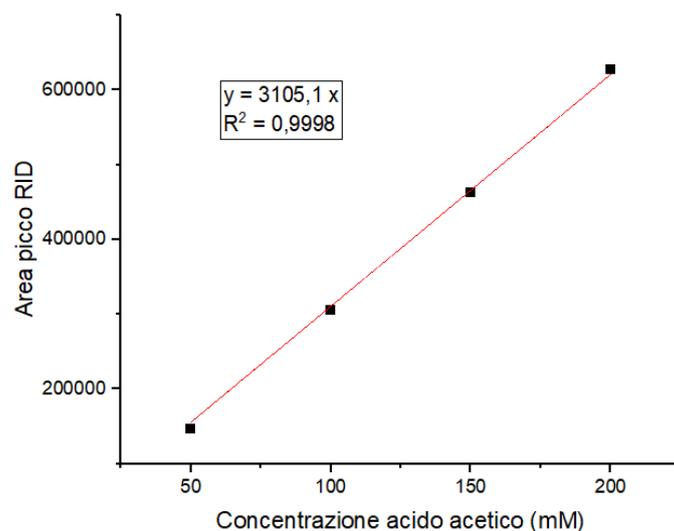


Figura 6.16 Retta di calibrazione dell'acido acetico per il rivelatore RID

Tabella 6.13 Concentrazioni impiegate per la retta di calibrazione dell'acetone con le relative aree e tempi di ritenzione individuati dal rivelatore RID

Concentrazione (mM)	Area picco	Tempo di ritenzione (min)
3	6337	19,981
5	12235	19,994
10	26860	19,981
15	39286	19,988
20	55244	19,973

Il tempo di ritenzione medio risultante è 19,983.

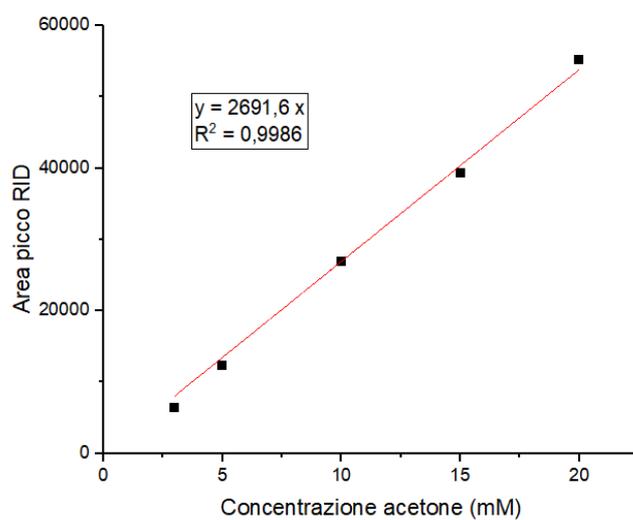


Figura 6.17 Retta di calibrazione dell'acetone per il rivelatore RID

6.2.12 Definizione dei parametri della fermentazione e bilancio al carbonio

Per valutare le prestazioni della fermentazione, per ciascuna prova si calcolano la massima velocità di crescita (μ_{\max}) e la velocità specifica di crescita (μ_{spec}). La prima è intesa come il valore massimo assunto dal rapporto fra la variazione del logaritmo naturale dell'OD fra due prelievi consecutivi e la durata dell'intervallo (equazione 6.3):

$$\mu_{\max} = \left(\frac{\ln \text{OD}(t_{i+1}) - \ln \text{OD}(t_i)}{t_{i+1} - t_i} \right)_{\max} \quad (6.3)$$

La velocità specifica di crescita si ricava dalla pendenza della retta interpolante la variazione del logaritmo naturale dell'OD nella fase esponenziale in funzione del tempo.

Per la valutazione delle rese e delle produttività si effettua un bilancio al carbonio, così da valutare come il carbonio contenuto nel sistema al tempo 0 e quello introdotto durante la durata della prova si trasforma nei prodotti di interesse.

Il carbonio in ingresso è calcolato a partire da:

- concentrazione di fruttosio e di altri composti carboniosi al tempo 0 (valutati dall'analisi in HPLC) moltiplicati per il volume della fase liquida iniziale;
- quantità di CO₂ gassosa presente al tempo 0, calcolata mediante la legge dei gas perfetti considerando la pressione misurata e il volume dello spazio di testa.
- quantità di CO₂ disciolta al tempo 0 calcolata mediante la legge di Henry, assumendo la composizione del gas di testa pari a quella della miscela introdotta;
- la quantità di CO₂ complessivamente introdotta durante la prova, calcolata usando la legge dei gas perfetti considerando la variazione di pressione tra un prelievo e l'altro nel caso delle prove in *serum bottle* o, nel caso di prove in reattore, la quantità di gas introdotta in continuo, nota la portata di gas;
- il carbonio contenuto nella biomassa al tempo 0, calcolando la quantità di biomassa mediante l'equazione 6.1 a partire dall'OD misurata e assumendo che ogni singola cellula contenga 60 atomi di C (considerando come formula bruta di un generico batterio C₆₀H₈₇O₂₃N₁₂P₁).

Per il calcolo della quantità di carbonio convertita in biomassa e nei prodotti di interesse si considera:

- il quantitativo totale dei prodotti del metabolismo identificati con HPLC, moltiplicando la concentrazione di ciascun composto ottenuta dall'analisi HPLC per il volume prelevato ad ogni campionamento; per l'ultimo prelievo si prende in considerazione il volume totale contenuto all'interno del sistema al termine della prova;
- il carbonio contenuto nella biomassa al termine della prova, calcolato a partire dall'OD dell'ultimo prelievo e dal volume finale di liquido. Dato il volume molto ridotto del prelievo durante la prova e la quantità molto bassa di biomassa nei punti iniziali della curva di crescita, il carbonio convogliato verso questa via risulta infatti trascurabile rispetto a tutti gli altri prodotti contenenti carbonio, ad eccezione del punto finale in cui il volume è la quasi totalità del liquido contenuto nel reattore e l'OD è la più alta raggiunta.

7. Determinazione del tempo di desorbimento di N₂

Come descritto nella sezione 6.2.8, la fase di preparazione del *medium* autotrofico nel reattore prevede prima la completa rimozione dell'ossigeno utilizzando N₂ e di sostituire poi a sua volta l'azoto con la miscela gassosa di interesse per la fermentazione autotrofica. Prima di procedere con l'inoculo del batterio, dunque, è necessario rimuovere tutto l'azoto introdotto durante la fase di degasamento, sostituendolo con la miscela di H₂ e CO₂. In letteratura sono riportate le procedure con significativa diversità tra di loro, che prevedono flussi di gasaggio che vanno dai 15 ai 30 L/h e tempi compresi tra le 12 e le 48 ore. La mancanza di una procedura testata e l'impiego di elevate portate per lungo tempo tuttavia rende il processo difficilmente sostenibile. Per questa ragione si è lavorato per definire un protocollo razionale in modo da minimizzare lo spreco di gas utilizzato per preparare il medium in assenza del biocatalizzatore. A tal proposito, sono state effettuate delle prove per validare un modello che consenta di calcolare il tempo necessario per la completa rimozione di N₂ nota la variazione della frazione di azoto nel gas in uscita dal reattore nei primi 30 minuti dell'operazione di cambio gas.

Il modello è stato realizzato fluxando una portata costante di CO₂ all'interno del reattore H.E.L. (4,5 L/h, 400 rpm, 30°C) contenente 800 mL di terreno autotrofico in equilibrio con N₂ presente nello spazio di testa. La curva di desorbimento dell'azoto (**Figura 7.1**) è stata ricavata dall'analisi della composizione del gas in uscita dal reattore; nei primi 40 minuti della prova è stato prelevato un campione ogni circa 4 minuti, intervallo che successivamente è stato incrementato gradualmente fino a 12 minuti.

L'andamento della frazione molare di N₂ nel gas in uscita dal reattore (Y_{N_2}) è stato approssimato mediante un modello esponenziale (equazione 7.1) derivante dall'interpolazione dei punti relativi alla prima mezz'ora della prova.

$$Y_{N_2}(t) = \alpha * e^{-\beta * t} \quad (7.1)$$

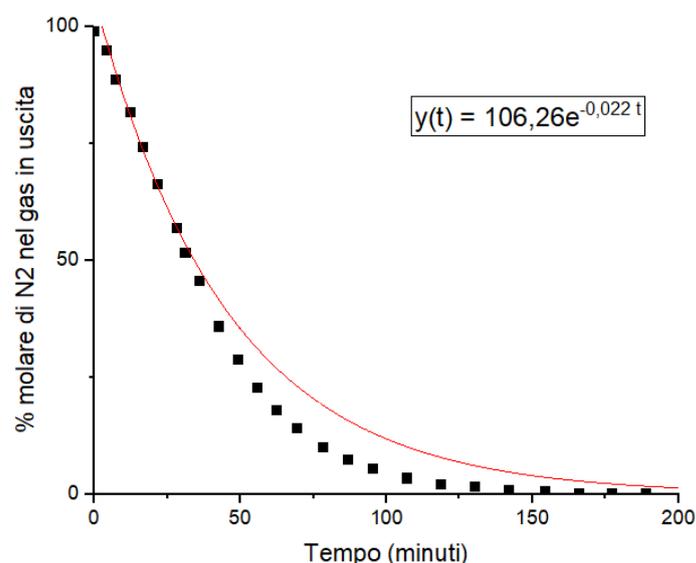


Figura 7.1 Variazione della percentuale di N₂ nel gas in uscita dal reattore in funzione del tempo. La linea rossa e l'equazione riportata sono relativi all'interpolazione dei primi otto punti della curva

Per verificare che un modello matematico di tipo esponenziale sia effettivamente adatto allo scopo della prova, si effettuano i bilanci di materia relativi all'azoto.

L'equazione 7.2 riporta il bilancio globale delle moli di N₂ in funzione della portata molare di azoto in ingresso (F_{N₂,i}) e in uscita (F_{N₂,o}):

$$\frac{dn}{dt} = F_{N_{2,i}} - F_{N_{2,o}} \quad (7.2)$$

La variazione del numero di moli all'interno della fase liquida (n_L) è espressa in funzione del volume di liquido (V_L) e della differenza fra la concentrazione di azoto all'equilibrio (X_L^{*}) e la concentrazione effettiva all'interno del liquido (X_L) (equazione 7.3):

$$\frac{dn_L}{dt} = k_L a * V_L * (X_L^* - X_L) \quad (7.3)$$

Il bilancio nella fase gassosa può essere espresso come la differenza fra l'equazione 7.2 e l'equazione 7.3 oppure in funzione della pressione parziale di N₂ (p_{N₂}) e del volume di gas nello spazio di testa (V_G) sostituendo al numero di moli di azoto presenti all'interno del gas (n_G) la legge dei gas perfetti (equazione 7.4):

$$\frac{dn_G}{dt} = \frac{dp_{N_2}}{dt} * \frac{V_G}{R*T} = F_{N_{2,i}} - F_{N_{2,o}} - k_L a * V_L * (X_L^* - X_L) \quad (7.4)$$

Esprimendo n_L come il prodotto fra V_L e X_L, è possibile valutare la concentrazione di azoto nel liquido in funzione del tempo, della concentrazione all'equilibrio e di una costante C derivante dall'integrazione dell'equazione 7.3 (equazione 7.5):

$$X_L = X_L^* - C * e^{-t*k_L a} \quad (7.5)$$

Sostituendo l'equazione 7.5 nell'equazione 7.4 e tenendo conto che F_{N₂,i} = 0, si ottiene l'equazione 7.6:

$$\frac{dp_{N_2}}{dt} * \frac{V_G}{R*T} + F_{N_{2,o}} = -k_L a * V_L * C * e^{-t*k_L a} \quad (7.6)$$

È possibile esprimere F_{N₂,o} e p_{N₂} in funzione di Y_{N₂}, note la portata totale del gas in uscita (F_o) (equazione 7.7) e la pressione totale all'interno del reattore (p) (equazione 7.8):

$$F_{N_{2,o}} = F_o * Y_{N_2} \quad (7.7)$$

$$p_{N_2} = p * Y_{N_2} \quad (7.8)$$

Infine, esprimendo Y_{N₂} nella forma esponenziale riportata in equazione 7.1, riarrangiando l'equazione 7.6 si ottiene l'equazione 7.9:

$$(F_o * \alpha - \frac{V_G * p}{R*T} * \alpha * \beta) * e^{-t*\beta} = -k_L a * V_L * C * e^{-t*k_L a} \quad (7.9)$$

Se si assumono F_o e p costanti, i termini preesponenziali di entrambi i membri dell'equazione 7.9 risultano essere costanti; si può, dunque, concludere che il modello adottato è coerente con i bilanci di materia e che sono sufficienti i dati relativi ai soli primi 30 minuti della prova per valutare il tempo necessario ad avere la rimozione completa del gas presente all'interno del reattore.

L'andamento della curva riportata in **Figura 7.1** conferma che sono sufficienti tre ore nelle condizioni utilizzate per rimuovere tutto l'azoto contenuto all'interno del reattore, coerentemente a quanto riportato nel paragrafo 6.2.8.

Per dimostrare che il modello descritto sia applicabile anche a gas diversi, è stata effettuata una prova analoga in cui è stato flussato N₂ in un ambiente saturo di CO₂; il sistema e le condizioni

operative impiegate sono le stesse dell'esperimento precedente. La curva sperimentale relativa alla percentuale di CO₂ nel gas in uscita e la curva esponenziale derivante dall'interpolazione dei punti della prima mezz'ora della prova sono riportate in **Figura 7.2**.

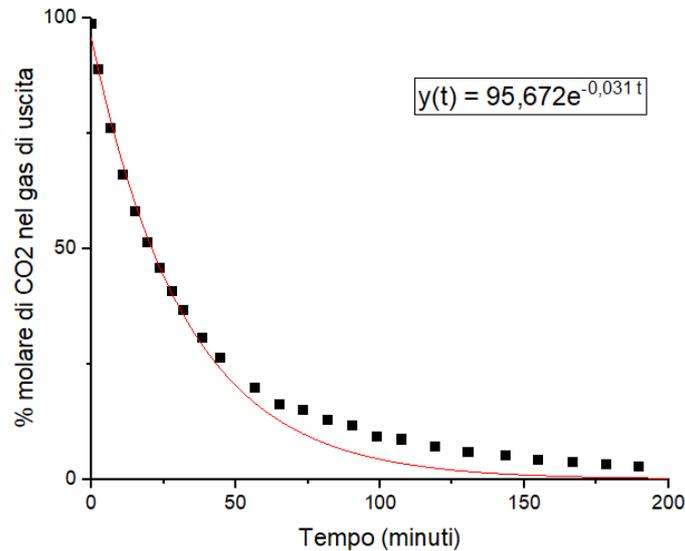


Figura 7.2 Variazione della percentuale di CO₂ nel gas in uscita dal reattore in funzione del tempo. La linea rossa e l'equazione riportata sono relativi all'interpolazione dei primi otto punti della curva

Dalle curve riportate nel grafico, si può dedurre che il modello sia applicabile anche al desorbimento di altre specie gassose.

Per completare la validazione del modello, verrà verificata l'applicabilità in altri tipi di reattore e nello stesso reattore al variare di condizioni operative, quali portata in ingresso, pressione, temperatura, volume e composizione del liquido e velocità di agitazione. Una volta approfondito, tale modello potrebbe essere utilizzato per ricavare una stima del valore del coefficiente di trasporto di materia volumico relativo alla fase liquida (k_{LA}) a partire dall'equazione 7.9.

8. Effetto della CO₂ sul metabolismo di *A. woodii*

Nel presente capitolo viene approfondito il comportamento di *A. woodii* in presenza di pressioni più elevate di quella atmosferica di CO₂ e H₂, cercando di stabilire un legame fra la pressione parziale di CO₂ e la deviazione del WLP verso la produzione di acido formico.

In letteratura è riportata l'inibizione della crescita di *A. woodii* e lo spostamento del flusso di carbonio verso la produzione di acido formico dovuti all'aumento di pressione parziale dell'idrogeno. Più in particolare, nel paragrafo 3.3 si fa riferimento al lavoro Kantzow e Weuster-Botz (2016), nel quale viene riportato come un aumento della pressione parziale di H₂ influisca negativamente sulla crescita cellulare e come in entrambe le prove condotte a 3,5 bar si abbia la formazione di una notevole quantità di acido formico, a scapito della produzione di acido acetico. Un'ulteriore testimonianza dell'effetto inibitorio dell'idrogeno sulla crescita di *A. woodii* è riportata da Braun e Gottschalk (1981) che dimostrano come in un sistema *batch* eterotrofico il cui gas di testa è costituito da una miscela di N₂ e H₂, l'aumento della frazione di quest'ultimo comporti una forte inibizione della crescita microbica.

Il gruppo di ricerca che cura lo sviluppo della *microbial factory 3* del progetto ENGICOIN (e che ha guidato la realizzazione del presente lavoro di tesi) ha condotto in passato diverse prove di fermentazione in pressione con una miscela di CO₂:H₂. I primi esperimenti effettuati hanno confermato quanto riportato in letteratura: in un sistema con continuo di gas (miscela di H₂ e CO₂ in rapporto volumico 2,3:1), aumentando la pressione all'interno del reattore da 1 a 9,8 bar si verifica un'inibizione della crescita microbica e un aumento della produzione di acido formico, indipendentemente dalla portata di gas in ingresso e dall'OD raggiunta dalla coltura microbica al momento dell'innalzamento di pressione.

Successivamente, è stato effettuato un ulteriore test in cui nella fase di preparazione del reattore la pressione del reattore, con solo il terreno di coltura all'interno, è stata portata a 9,8 bar fluendo H₂ e CO₂. Il sistema è stato portato, quindi, a 1 bar, lasciato fluire per tre ore a 80 mL/min e poi inoculato con *A. woodii* seguendo la metodica descritta in precedenza. In maniera inaspettata, all'inizio di questa prova la concentrazione di acido formico ha assunto l'andamento tipico delle fermentazioni ad alta pressione. Tale osservazione ha portato ad ipotizzare che le ragioni dell'aumento di acido formico siano da attribuire non tanto alla pressione parziale dell'idrogeno all'interno del reattore, ma piuttosto alle forme della CO₂ (gassosa, bicarbonato e carbonato) disciolte nel terreno di coltura, ipotesi sostenuta dal fatto che la costante di Henry relativa alla dissoluzione di H₂ in acqua è di due ordini di grandezza inferiore a quella della CO₂.

Per dimostrare quanto ipotizzato in seguito agli esperimenti pregressi, nel presente lavoro sono state condotte prove in *serum bottle* con concentrazioni variabili di KHCO₃. Il bicarbonato di potassio, infatti, in soluzione acquosa libera ioni HCO₃⁻ che il batterio è in grado di trasportare all'interno della cellula e riconvertire in CO₂ per poi proseguire con il WLP (Braus-Stromeier *et al.*, 1997).

Ulteriori prove sono state effettuate in reattore a 9,8 bar. Nella prima è stata alimentata in continuo una miscela gassosa contenente il 70% in volume di H₂, il 3% di CO₂ e il restante 27% di N₂, così da avere una pressione parziale di CO₂ circa uguale a un sistema a 1 bar con un *feed* gassoso 70% H₂ e 30% CO₂. Nella seconda prova, sono state usate condizioni operative analoghe, ma è stato impiegato un gas in ingresso con composizione 70% H₂ e 30% CO₂.

8.1 Fermentazione in serum bottles in presenza di KHCO_3

In questa sezione sono riportati i dati relativi alle prove di fermentazione in *serum bottles* con aggiunta di KHCO_3 e le considerazioni derivanti. Le concentrazioni di bicarbonato impiegate sono state riprese dal lavoro di Schwarz e Müller (2020) su *T. kivui* (0 mM, 50 mM e 300 mM) e in aggiunta è stata effettuata un'ulteriore prova con concentrazione di sale 150 mM.

Tutte le prove sono state effettuate in triplicato e i valori riportati per ciascun parametro fanno riferimento alla media dei tre campioni

In **Figura 8.1** sono riportate le curve di crescita relative a ciascuna delle concentrazioni di KHCO_3 . Per le misure di OD è stato impiegato lo spettrofotometro UV-vis Jasco V-730.

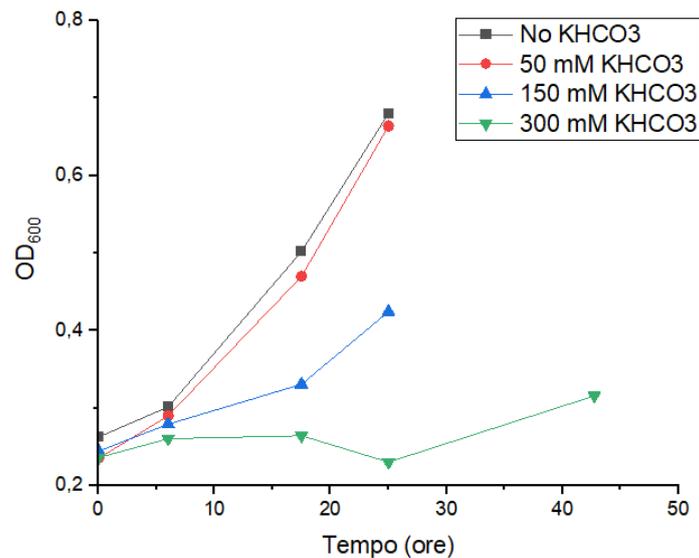


Figura 8.1 Effetto della concentrazione di KHCO_3 sulla crescita microbica

Dal grafico emerge come la crescita microbica rallenti all'aumentare della quantità di bicarbonato disciolta, fino a risultare quasi del tutto inibita a 300 mM.

Le **Figure 8.2-3** riportano, rispettivamente, gli andamenti della concentrazione di acido acetico e di acido formico all'interno del *medium* al procedere della fermentazione. Nei campioni contenenti KHCO_3 300 mM è stata presa una misura a 44 ore dall'inoculo, oltre che quelle effettuata anche per i campioni cresciuti nelle altre condizioni, poiché la crescita è risultata più lenta.

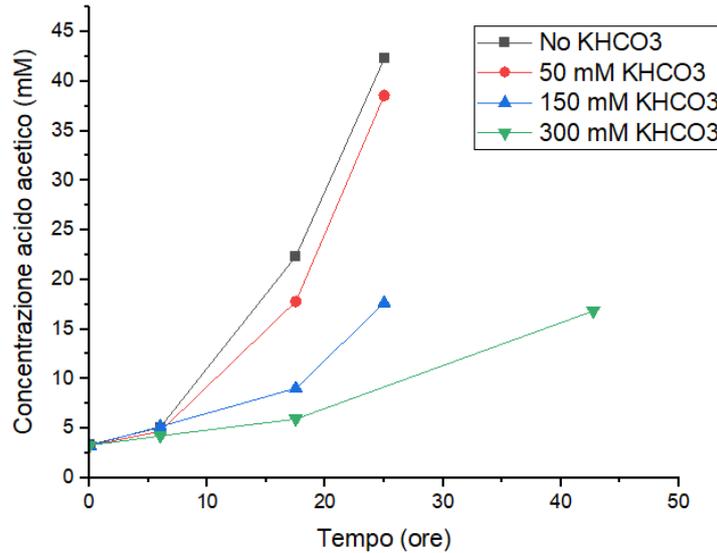


Figura 8.2 Andamento della concentrazione di acido acetico al variare del contenuto di KHCO_3

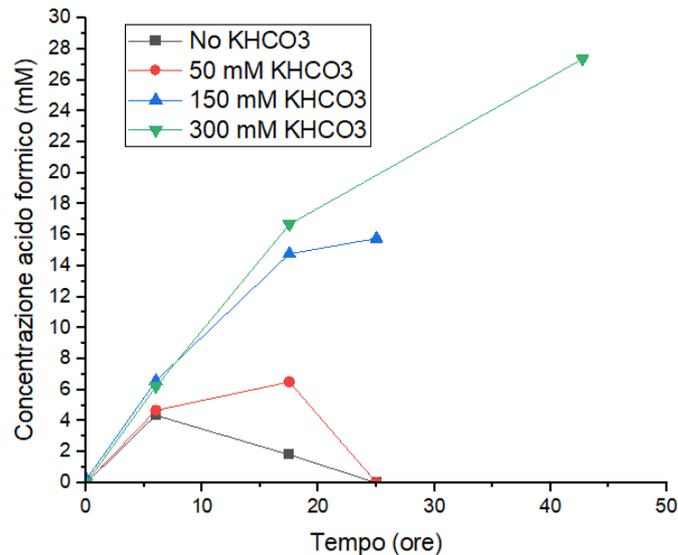


Figura 8.3 Andamento della concentrazione di acido formico al variare del contenuto di KHCO_3

I grafici riportati sembrano confermare quanto ipotizzato in seguito alle precedenti prove in reattore; infatti, all'aumentare della concentrazione di bicarbonato (e quindi della CO_2 disciolta all'interno del terreno di coltura) si ha un significativo aumento della concentrazione di acido formico, a cui corrisponde una riduzione della concentrazione di acido acetico altrettanto significativa.

8.1.1 Confronto fra fermentazione in presenza di KHCO_3 e in presenza di KCl

Per avere conferma che gli andamenti riportati nelle **Figure 8.1-3** siano effettivamente legati alla presenza del bicarbonato e non di un sale generico (inibizione della crescita dovuta all'osmolarità), è stata effettuata un'ulteriore prova in *serum bottles* in cui è stato disciolto KCl in concentrazioni analoghe a quelle impiegate nell'esperimento con KHCO_3 . Per ogni valore di concentrazione, i risultati sono stati confrontati con quelli della prova precedente.

La **Figura 8.4** mostra il confronto delle curve di crescita fra i campioni contenenti KHCO_3 e quelli contenenti KCl . In **Figura 8.4a** sono riportati gli andamenti dell'OD nei campioni di controllo in assenza di sali di entrambe le prove; è presente, infatti, una variabilità fra le curve relative alle due prove che non è legata al tipo sale disciolto, ma piuttosto allo *stock* da cui è stata prelevata la coltura di *A. woodii* impiegata in ciascun esperimento. I grafici mostrano che, parità di concentrazione di sali, gli andamenti delle curve di crescita risultano simili; si può, dunque, affermare che la presenza di un generico sale rallenta la crescita microbica e che tale effetto è tanto maggiore quanto più è alta la concentrazione. A differenza dei campioni contenenti KCl 300 mM, quelli contenenti KHCO_3 300 mM però non presentano un andamento di tipo esponenziale (**Figura 8.4d**).

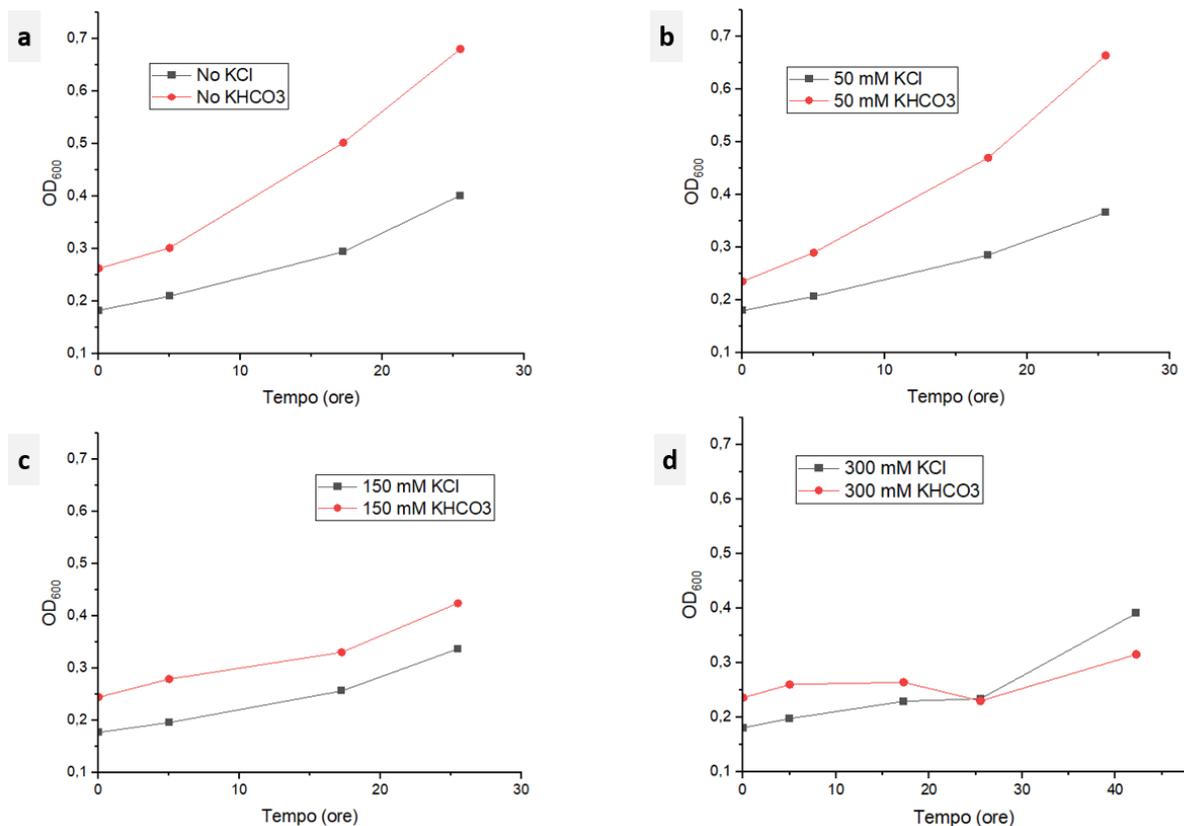


Figura 8.4 Confronto fra le curve di crescita in presenza di KCl e KHCO_3 a parità di concentrazione. **a** No sali; **b** sali 50 mM; **c** sali 150 mM; **d** sali 300 mM

In **Figura 8.5** è riportato il confronto fra l'andamento della concentrazione di acido acetico e acido formico per ciascuna delle prove effettuate a parità di concentrazione dei due sali.

I grafici mostrano come nei campioni contenenti KCl , indipendentemente dalla concentrazione, si abbia la formazione di una modesta quantità di acido formico nelle prime ore della prova, ma che col procedere della fermentazione tale quantità si riduca fino ad annullarsi. Al contrario, la concentrazione di acido acetico aumenta nel tempo in tutti i campioni, suggerendo che in presenza di KCl non vi sia alcuna deviazione del WLP.

In maniera del tutto opposta a quanto sopra descritto, per alte concentrazioni di KHCO_3 (150 mM e 300 mM) la produzione di acido formico aumenta al proseguire della fermentazione e l'effetto è tanto più evidente quanto più è alta la quantità di bicarbonato disciolta. Inoltre,

all'aumento della concentrazione di acido formico corrisponde una diminuzione della quantità di acido acetico prodotta, a conferma del fatto che la presenza di elevate concentrazioni di KHCO_3 devii il flusso del carbonio di *A. woodii*, analogamente a quanto riportato da Schwarz e Müller (2020) nel caso di *T. kivui*.

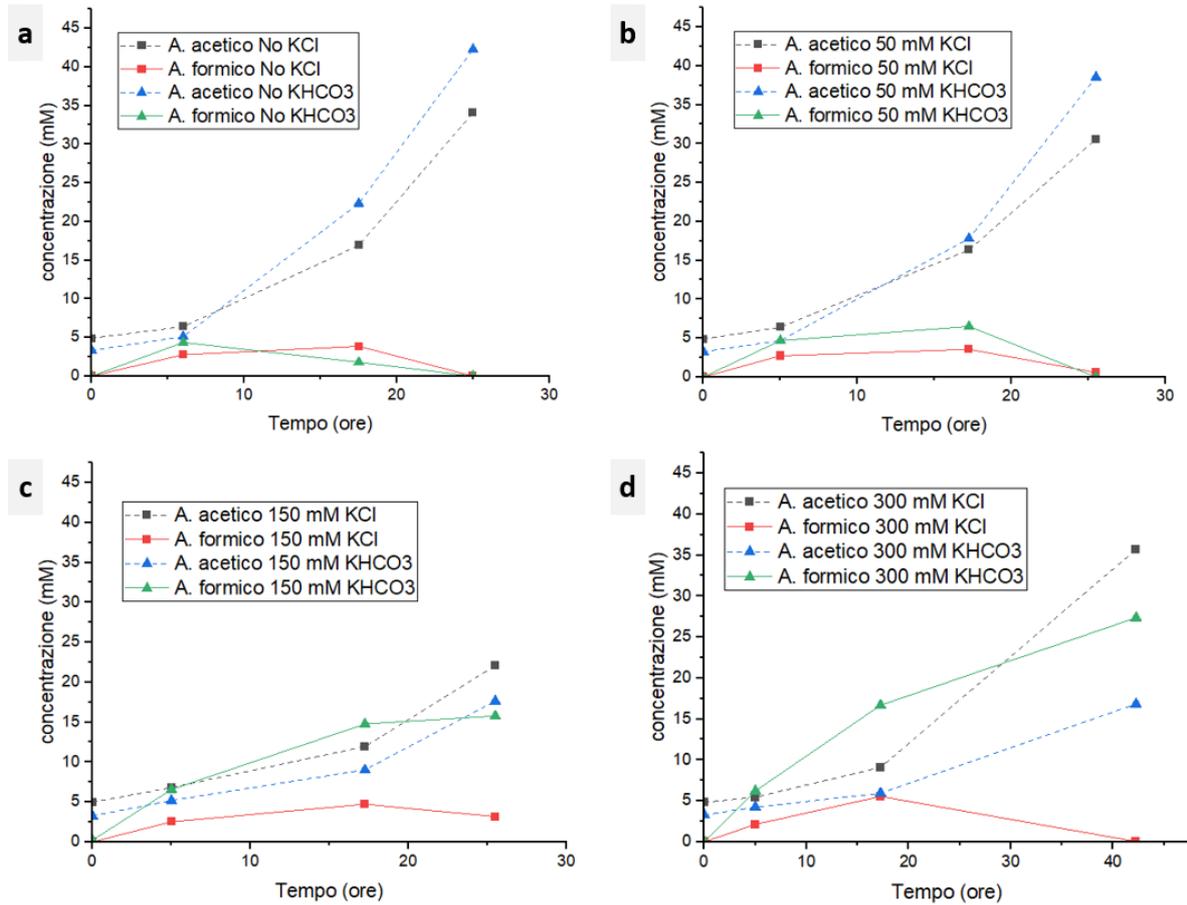


Figura 8.5 Variazione della concentrazione di acido acetico (linee tratteggiate) e acido formico (linee continue) in presenza di KCl e KHCO_3 a parità di concentrazione. **a** No sali; **b** sali 50 mM; **c** sali 150 mM; **d** sali 300 mM

In **Tabella 8.1** sono riportati i valori di velocità massima di crescita (μ_{\max}) e velocità specifica di crescita (μ_{spec}) relativi a ciascuna prova. Per le prove in assenza di sali, per ciascun parametro è riportato il valore medio delle due.

Tabella 8.1 Massima velocità di crescita e velocità specifica di crescita. In verde sono evidenziati i valori relativi alle prestazioni migliori

Prova	μ_{\max} (h ⁻¹)	μ_{spec} (h ⁻¹)
No sali	0,041	0,035
50 mM KHCO ₃	0,046	0,042
50 mM KCl	0,030	0,028
150 mM KHCO ₃	0,033	0,021
150 mM KCl	0,033	0,025
300 mM KHCO ₃	0,018	No andamento esponenziale
300 mM KCl	0,021	0,018

La tabella suggerisce che modeste quantità di KHCO₃ incrementano la velocità di crescita delle cellule, ma che elevate concentrazioni di sali (indipendentemente dal tipo) causano un rallentamento della crescita, coerentemente con quanto riportato in **Figura 8.1** e **Figura 8.4**.

La **Tabella 8.2** mostra le rese e le selettività di ciascuna prova rispetto ad acido acetico, acido formico e al numero di cellule generate. Tali parametri sono calcolati in C-mol_{prodotto}/C-mol_{totali}, ovvero confrontando il numero di moli di carbonio contenute in ciascuno dei prodotti della fermentazione con le moli totali di C introdotte o consumate durante la durata della prova. Per i dettagli sui bilanci effettuati si rimanda al paragrafo 6.2.12. La somma delle selettività non sempre risulta essere 100% per via della possibile presenza di piccole quantità di altre sostanze carboniose all'interno del terreno di coltura che vengono rivelate dall'analisi HPLC ma che non sono state accuratamente identificate e quantificate (ad esempio alcoli e molecole azotate su cui la letteratura sulla sintesi da parte di *A. woodii* riporta dati marginali).

Tabella 8.2 Rese e selettività. In verde sono evidenziati i valori relativi alle prestazioni migliori

Prova	Resa			Selettività		
	A. acetico	A. formico	Biomassa	A. acetico	A. formico	Biomassa
No sali	47,57%	-	3,67%	83,23%	-	6,38%
50 mM KHCO ₃	45,98%	-	4,37%	77,26%	-	7,35%
50 mM KCl	45,62%	-	3,30%	84,89%	-	6,14%
150 mM KHCO ₃	21,86%	13,86%	2,03%	56,81%	37,96%	5,23%
150 mM KCl	26,69%	3,34%	1,83%	69,81%	9,79%	4,70%
300 mM KHCO ₃	17,50%	22,04%	0,10%	43,12%	56,43%	0,44%
300 mM KCl	40,32%	0,46%	1,82%	79,13%	0,86%	3,58%

I valori di rese e selettività riportati confermano quanto emerso dai grafici precedentemente analizzati: all'aumentare della concentrazione di KHCO₃, infatti, aumentano la resa e la

selettività relative all'acido formico, a scapito dell'acido acetico. Questo comportamento, invece, non si verifica in presenza di alte concentrazioni di KCl.

In **Tabella 8.3** sono riportate le produttività volumiche e specifiche di acido acetico e acido formico relative a ciascun esperimento. La produttività volumica (espressa in $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) esprime la quantità di prodotto formata nell'unità di tempo rispetto al volume del terreno di coltura. Invece, la produttività specifica (espressa in $\text{g g}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{h}^{-1}$) fa riferimento a quanto prodotto viene generato nell'unità di tempo da un grammo di cellule in peso secco.

Tabella 8.3 Produttività volumiche e produttività specifiche. In verde sono evidenziati i valori relativi alle prestazioni migliori

Prova	Produttività volumica ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)		Produttività specifica ($\text{g g}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{h}^{-1}$)	
	A. acetico	A. formico	A. acetico	A. formico
No sali	0,078	-	0,378	-
50 mM KHCO_3	0,085	-	0,346	-
50 mM KCl	0,061	-	0,399	-
150 mM KHCO_3	0,035	0,029	0,211	0,181
150 mM KCl	0,040	0,006	0,309	0,048
300 mM KHCO_3	0,019	0,029	0,154	0,247
300 mM KCl	0,044	4e-05	0,294	2e-04

Anche nel caso delle produttività, le massime prestazioni relativamente alla produzione di acido formico si riscontrano con KHCO_3 300 mM, mentre a pari concentrazione di KCl gli stessi parametri assumono valori estremamente bassi. Allo stesso tempo, all'aumentare del bicarbonato disciolto diminuiscono le produttività di acido acetico.

8.2 Fermentazione in reattore a 9,8 bar con N_2 come inerte

Gli effetti della CO_2 sulla crescita microbica e sulla deviazione del WLP verso la produzione di acido formico sono approfonditi ulteriormente nella presente sezione.

Come già anticipato, prove precedenti hanno mostrato che nelle fermentazioni condotte in reattore con continuo di gas (miscela 70% H_2 e 30% CO_2), l'aumento della pressione del sistema comporta un rallentamento della crescita microbica e un aumento della quantità di acido formico prodotto. Per avere un'idea più chiara del contributo della CO_2 su questi due effetti, di seguito è riportata l'analisi di una prova in reattore effettuata con un *feed* gassoso costituito da una miscela contenente il 70% di H_2 , il 3% di CO_2 e il 27% di N_2 ; in questo modo, alzando la pressione del reattore a 9,8 bar, la pressione parziale della CO_2 risulta essere circa uguale a quella che si ha in un sistema a 1 bar contenente H_2 e CO_2 in rapporto volumico 2,3:1.

Nella seconda parte di questa sezione (paragrafo 8.2.1), sono confrontati gli andamenti dell'OD e delle concentrazioni dei prodotti dell'esperimento sopra descritto con quelli di una prova analoga il cui gas alimentato contiene 70% H_2 e 30% CO_2 in volume. Tale analisi risulta utile

per discriminare gli effetti della pressione totale del sistema da quelli della pressione parziale della CO₂.

In **Figura 8.6** è riportata la variazione dell'OD durante la durata della prova, evidenziando l'effetto dell'incremento di pressione.

A 9,8 bar, si ha un rallentamento della crescita microbica e la curva di crescita subisce una deviazione rispetto al consueto andamento esponenziale, similmente a quanto verificato nelle prove precedenti. Il picco di OD che appare in seguito al ripristino della bassa pressione costituisce un'anomalia rispetto ad altre prove analoghe, di cui non si conoscono le cause; per questo motivo, ai fini dell'analisi non viene preso in considerazione, perché necessita di ulteriori analisi.

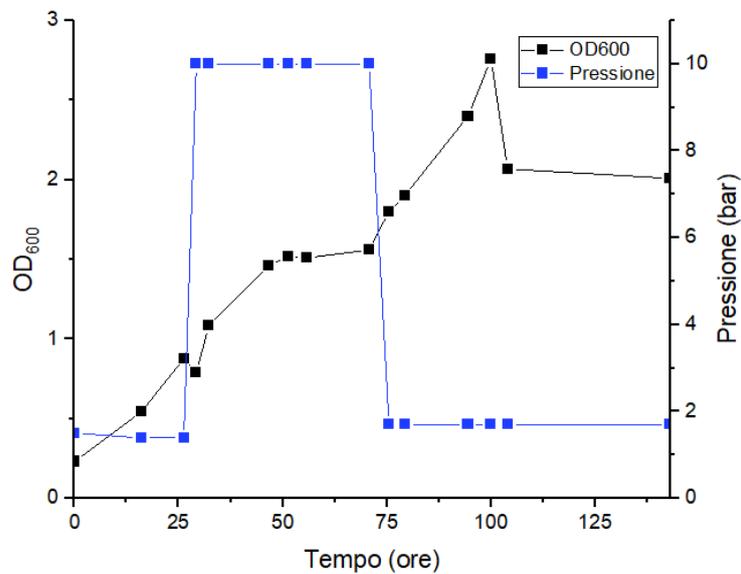


Figura 8.6 Variazione dell'OD in seguito all'aumento di pressione in bioreattore, alimentando una miscela gassosa 70% H₂, 3% CO₂, 27% N₂

La **Figura 8.7** riporta l'andamento delle concentrazioni di acido acetico, acido formico, acetone e fruttosio, mostrando l'influenza dell'innalzamento di pressione.

Il grafico mostra che, nonostante l'aumento della pressione totale, non si ha sintesi di acido formico al termine della prova. Il profilo di concentrazione di acido acetico, invece, risulta essere crescente per tutta la durata della fermentazione e ciò suggerisce che per bassi valori della pressione parziale di CO₂ non si ha alcuna deviazione del WLP. A sostegno di quanto appena affermato, confrontando le curve relative alle concentrazioni di acido acetico e acido formico riportate in **Figura 8.7** con le curve omologhe delle prove in *serum bottles* a basse concentrazioni di KHCO₃ (**Figura 8.5a,b**), emerge che gli andamenti sono simili.

In aggiunta all'acido acetico, il grafico mostra la formazione di acetone, dovuta all'impiego di ceppi di un ceppo di *A. woodii* ingegnerizzato. La presenza di acetone non è riscontrata nelle prove in *serum bottles* per via della minore durata delle fermentazioni.

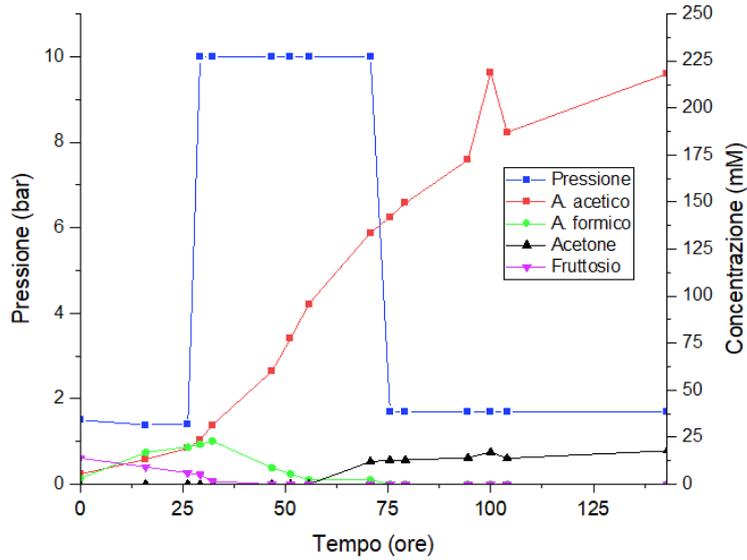


Figura 8.7 Andamento delle concentrazioni delle specie consumate o prodotte dal metabolismo di *A. woodii* nella fermentazione in bioreattore alimentato con una miscela 70% H₂, 3% CO₂, 27% N₂

8.2.1 Fermentazione a 9,8 bar: confronto fra alta e bassa frazione di CO₂ nel *feed*

La **Figura 8.8** riporta la curva di crescita relativa alla prova condotta in reattore la cui corrente in ingresso è costituita da una miscela 70% di H₂ e 30% di CO₂ e al cui interno la pressione è stata alzata a 9,8 bar durante il procedere della fermentazione.

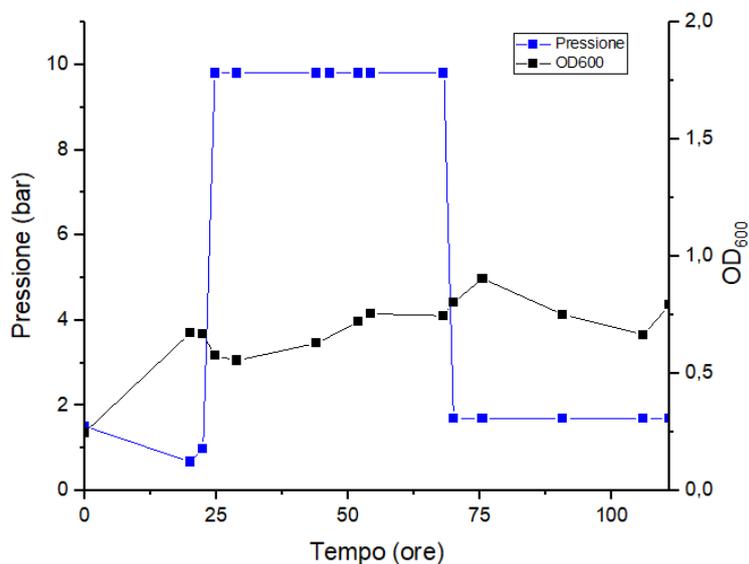


Figura 8.8 Variazione dell'OD in seguito all'aumento di pressione in bioreattore, alimentando una miscela gassosa 70% H₂ e 30% CO₂

Seppur meno pronunciata, la curva di crescita riportata in **Figura 8.8** è coerente con quella riportata in **Figura 8.6**; infatti, in entrambi i casi l'aumento della pressione a 9,8 bar comporta

un rallentamento della crescita microbica, indipendentemente dalla pressione parziale di CO₂ e, di conseguenza, della quantità disciolta di CO₂ nel terreno di coltura.

La **Figura 8.9** mostra la variazione della concentrazione di acido acetico, acido formico, acetone e fruttosio nella prova condotta con H₂ e CO₂ in rapporto 2,3:1.

Rispetto alla prova con basso contenuto di CO₂, in questo caso, tuttavia, all'aumento della pressione segue la formazione di una notevole quantità di acido formico a cui corrisponde una riduzione della concentrazione di acido acetico. Il successivo ripristino della bassa pressione all'interno del reattore comporta la riduzione del contenuto di acido formico, a vantaggio della produzione di acido acetico. Ciò costituisce un'ulteriore conferma del fatto che la dissoluzione di una notevole quantità di CO₂ all'interno del terreno di coltura causa una deviazione del WLP. Questo aspetto influisce anche sulla produzione di acetone. La via sintetica dell'acido acetico e dell'acetone è infatti comune per la maggioranza degli *step* della via metabolica, differenziandosi solo nelle catalisi enzimatiche finali. La concentrazione finale di acetone nel caso di deviazione metabolica verso l'acido formico risulta essere notevolmente inferiore rispetto al caso precedente.

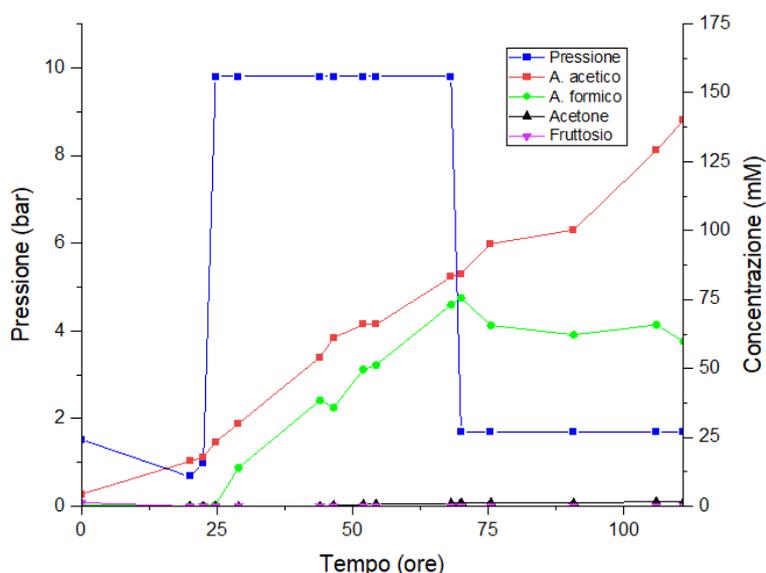


Figura 8.9 Andamento delle concentrazioni delle specie consumate o prodotte dal metabolismo di *A. woodii* nella fermentazione in bioreattore alimentato con una miscela 70% H₂ e 30% CO₂

Per via dell'andamento non esponenziale assunto dalle curve di crescita relative entrambe le prove in seguito all'aumento di pressione, in **Tabella 8.4** sono riportate soltanto le massime velocità di crescita (μ_{\max}) assunte in ciascuno dei due sistemi analizzati.

Tabella 8.4 Massima velocità di crescita assunta a 9,8 bar

CO ₂ in ingresso	μ_{\max} (h ⁻¹)
3%	0,020
30%	0,020

I valori riportati in tabella coincidono fra loro e sono simili a quelli ottenuti nelle prove in *serum bottles* con concentrazione 300 mM di sali. Ciò conferma che la presenza di alte pressioni, così come la presenza di elevate concentrazioni di sali, ha un effetto negativo sulla crescita microbica. Inoltre, come riportato in letteratura, anche l'elevata pressione parziale dell'idrogeno inibisce la crescita, pur non essendo la causa della sintesi dell'acido formico.

In **Tabella 8.5** sono riportate le rese relative ai prodotti delle due fermentazioni a 9,8 bar.

Tabella 8.5 Rese delle fermentazioni a 9,8 bar

CO ₂ in ingresso	Resa			
	A. acetico	A. formico	Acetone	Biomassa
3%	42,06%	-	8,63%	3,13%
30%	3,01%	1,83%	0,08%	0,07%

La grande discrepanza fra i valori delle due prove è legata al fatto che sebbene nella seconda vi sia una quantità di CO₂ in ingresso pari a circa 10 volte quella della prima, le quantità dei prodotti delle due prove hanno lo stesso ordine di grandezza. Tuttavia, viene confermato che ad alte pressioni parziali di CO₂ la resa di acido formico è circa confrontabile con quella di acido acetico.

Di seguito sono riportati i valori di produttività volumica (**Tabella 8.6**) e di produttività specifica (**Tabella 8.7**) per ciascuno dei prodotti delle due prove.

Tabella 8.6 Produttività volumiche delle fermentazioni a 9,8 bar

CO ₂ in ingresso	Produttività volumica (g L ⁻¹ h ⁻¹)		
	A. acetico	A. formico	Acetone
3%	0,159	-	0,017
30%	0,082	0,077	0,001

Tabella 8.7 Produttività specifiche delle fermentazioni a 9,8 bar

CO ₂ in ingresso	Produttività specifica (g g _{biomassa} ⁻¹ h ⁻¹)		
	A. acetico	A. formico	Acetone
3%	0,269	-	0,028
30%	0,288	0,272	0,005

I valori di produttività riportati confermano che ad alte pressioni parziali di CO₂ si ha un peggioramento delle prestazioni legate alla produzione di acido acetico ed acetone.

Confrontando la produttività volumica e la resa di acetone ottenute a 9,8 bar con 3% di CO₂ in ingresso con quelle riportate da Hoffmeister *et al.* (2016) relative ad un sistema analogo a pressione atmosferica (**Tabelle 3.1-2**), si nota come l'aumento di pressione abbia effettivamente comportato un aumento di tali parametri.

L'analisi delle prove in *serum bottles* e delle prove in reattore ad alta pressione ha mostrato che, se da un lato il rallentamento della crescita microbica è legato alla presenza di elevate concentrazioni di sali (indipendentemente dalla natura) e di alte pressioni (indipendentemente dalla composizione del gas in ingresso), la produzione di significative quantità di acido formico si verifica solo se il sale disciolto è un bicarbonato e se all'interno del reattore vi è un'elevata pressione parziale di CO₂. In conclusione, dunque, si può affermare che elevate quantità di CO₂ disciolte nel terreno di coltura provocano una deviazione del WLP, indipendentemente dal fatto che essa provenga da sali presenti all'interno del *medium* o dal gas contenuto nello spazio di testa nel reattore.

9. Ottimizzazione del terreno di coltura

L'analisi riportata nel presente capitolo mira all'ottimizzazione del terreno di coltura autotrofico di *A. woodii*, analizzando quali componenti risultano effettivamente necessari per la crescita e per il corretto sviluppo del metabolismo. Tale analisi assume un importante rilievo nell'ottica di un futuro sviluppo di un impianto su grande scala basato sulla fermentazione anaerobica di *A. woodii* ingegnerizzato.

Fra i componenti del terreno di coltura di *A. woodii*, descritti nella sezione 6.1, quelli che hanno un maggiore impatto economico sono la soluzione di vitamine, le due soluzioni di metalli (soluzione SL9 e soluzione selenito-tungstato) e l'estratto di lievito. L'analisi seguente studia come variano la crescita e le concentrazioni finali dei prodotti del metabolismo se si rimuovono dal terreno di coltura, uno per volta, i componenti sopra elencati, in modo da trovare, se possibile, un bilanciamento tra la loro implementazione nel terreno di coltura e il mantenimento delle rese di processo.

La procedura impiegata per le prove in *serum bottles* analizzate in questo capitolo prevede un passaggio in più rispetto a quella descritta nella sezione 6.2: prima di essere introdotta nel terreno autotrofico privo di uno dei componenti, la coltura viene prelevata dal *medium* eterotrofico completo e inserita in un ulteriore terreno eterotrofico privo del componente di cui si vuole verificare l'essenzialità per la crescita; solo dopo che la coltura si è sviluppata nel nuovo ambiente e che essa ha raggiunto un'OD sufficientemente alta, viene effettuato l'inoculo all'interno del terreno autotrofico. Con questa procedura si ha la certezza che nel terreno autotrofico non vi siano tracce del componente rimosso derivanti dal terreno eterotrofico completo all'interno del quale è stata inoculata la coltura proveniente dallo *stock*, in maniera tale da creare all'interno delle *serum bottles* un ambiente analogo a quello che si avrebbe in un ipotetico impianto industriale basato sulla fermentazione anaerobica di *A. woodii* in terreno ottimizzato.

Tutte le prove in terreno autotrofico sono state effettuate in triplicato e i valori riportati per ciascun parametro fanno riferimento alla media dei tre campioni.

Per ciascuna delle prove verranno confrontate la curva di crescita e le curve relative alle variazioni di concentrazione prodotti della fermentazione con quelle di una prova realizzata in condizioni operative analoghe usando come substrato terreno autotrofico completo. Per avere un'analisi più approfondita, inoltre, verranno confrontati, quando possibile, i parametri relativi alla crescita e alla produzione delle sostanze di interesse. Per le misure di OD è stato impiegato lo spettrofotometro Hack Lange DR 5000.

9.1 Fermentazione in assenza di vitamine

In **Figura 9.1** è mostrato il confronto fra la curva di crescita relativa alla fermentazione condotta in assenza di vitamine e quella condotta in terreno autotrofico completo.

Gli andamenti dell'OD delle due prove risultano essere praticamente coincidenti, suggerendo che l'assenza della soluzione di vitamine non abbia alcun effetto significativo sul corretto sviluppo della crescita di *A. woodii*.

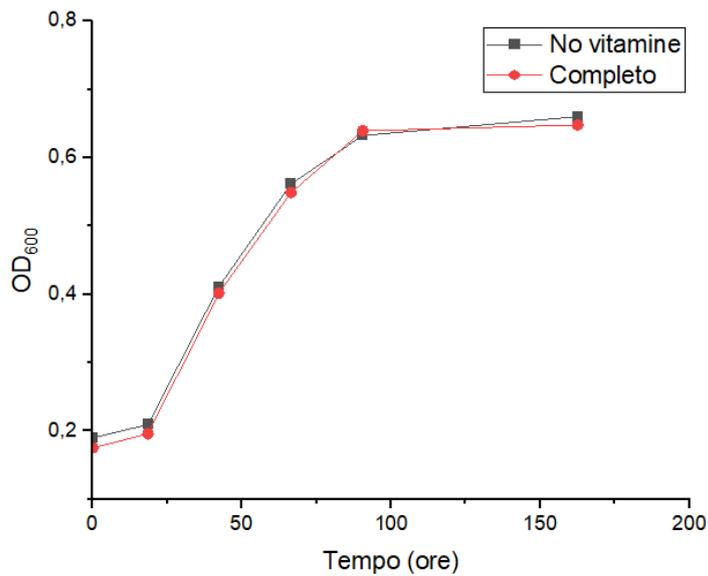


Figura 9.1 Curve di crescita in terreno autotrofico completo e in assenza di vitamine

La **Figura 9.2** riporta gli andamenti delle concentrazioni dei prodotti della fermentazione nelle due prove. Nel grafico sono state impiegate due scale diverse: quella a sinistra è relativa alla concentrazione di acido acetico, mentre quella a destra consente di avere una rappresentazione più chiara della concentrazione di acetone, molto minore rispetto a quella di acido acetico. In nessuna delle due prove è stata riscontrata la formazione di acido formico.

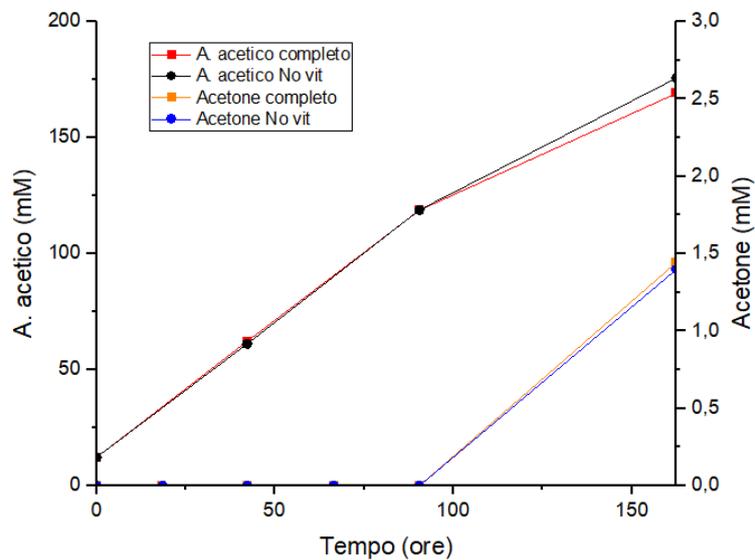


Figura 9.2 Andamento delle concentrazioni di acido acetico e acetone in terreno autotrofico completo e in assenza di vitamine

Anche nel caso delle concentrazioni dei prodotti della fermentazione non si hanno significative differenze tra le due prove e le curve risultano pressoché coincidenti.

In **Tabella 9.1** sono riportati i valori di velocità massima di crescita (μ_{\max}) e velocità specifica di crescita (μ_{spec}).

Tabella 9.1 Massima velocità di crescita e velocità specifica di crescita

Prova	μ_{\max} (h⁻¹)	μ_{spec} (h⁻¹)
Terreno completo	0,030	0,021
No vitamine	0,028	0,021

Dall'analisi delle velocità di crescita non si evidenzia alcuna differenza significativa fra i due casi.

La **Tabella 9.2** mostra le rese e le selettività di acido acetico, acetone e biomassa relativi alle due prove. Analogamente, in **Tabella 9.3** sono riportate le produttività volumiche e specifiche.

Tabella 9.2 Rese e selettività

Prova	Resa			Selettività		
	A. acetico	Acetone	Biomassa	A. acetico	Acetone	Biomassa
Terreno completo	74,73%	0,92%	3,23%	80,15%	0,99%	3,46%
No vitamine	83,22%	0,96%	3,57%	86,04%	1,00%	3,70%

Tabella 9.3 Produttività volumiche e produttività specifiche

Prova	Produttività volumica (g L⁻¹ h⁻¹)		Produttività specifica (g g_{biomassa}⁻¹ h⁻¹)	
	A. acetico	Acetone	A. acetico	Acetone
Terreno completo	0,058	5e-04	0,170	0,002
No vitamine	0,060	5e-04	0,173	0,001

I dati riportati nelle due tabelle mostrano che anche i parametri legati ai prodotti della fermentazione non presentano differenze significative fra le due prove.

Alla luce dei risultati mostrati in questa sezione, si può affermare che le vitamine non influenzano lo sviluppo della crescita microbica né tantomeno la loro presenza ha effetti significativi sui prodotti della fermentazione. Si può, dunque, concludere che la soluzione di vitamine non riveste un ruolo di primaria importanza per la crescita e lo sviluppo del metabolismo di *A. woodii* e che la rimozione dal terreno di coltura può costituire un'importante fonte di risparmio nell'estensione del processo a scala industriale senza avere un impatto negativo sulle produttività.

9.2 Fermentazione in assenza di estratto di lievito

I campioni contenenti terreno eterotrofico privo di estratto di lievito dopo 48 ore dall'inoculo (tempo generalmente impiegato dalla coltura per raggiungere un'OD prossima ad 1 in terreno eterotrofico) non hanno raggiunto un livello di OD tale da procedere con l'inoculo in terreno autotrofico; nonostante la coltura sia stata mantenuta nelle condizioni ottimali di crescita per ulteriori due giorni, il contenuto di cellule è risultato comunque essere non sufficiente per il passaggio in terreno autotrofico e la prova è stata interrotta.

Questa prova è stata fatta in duplicato per verificare che la mancata crescita fosse dovuta effettivamente all'assenza dell'estratto di lievito e non ad un danneggiamento dello *stock* di partenza.

Entrambe le prove hanno mostrato lo stesso risultato. Si può, dunque, concludere che l'estratto di lievito risulta fondamentale per la crescita di *A. woodii* e che la realizzazione di un impianto di scala industriale basato sulla fermentazione di *A. woodii* non può prescindere da esso.

9.3 Fermentazione in assenza di metalli

Per la realizzazione di questa prova sono stati rimossi dal terreno di coltura sia la soluzione di oligoelementi SL9 sia la soluzione di selenito e tungstato.

In **Figura 9.3** sono riportate le curve di crescita relative alla prova condotta in assenza di metalli e alla prova in terreno autotrofico completo.

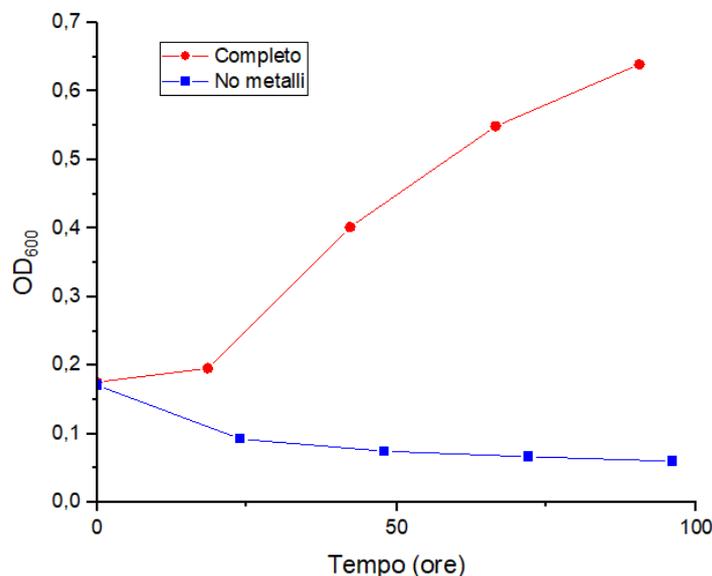


Figura 9.3 Curve di crescita in terreno autotrofico completo e in assenza di metalli

Le curve riportate mostrano andamenti molto diversi fra loro. Infatti, sebbene in ambiente eterotrofico privo di metalli la crescita avvenga in maniera corretta e in due giorni venga raggiunta un'OD prossima ad 1, una volta inoculata la coltura all'interno del terreno autotrofico corrispondente si ha un arresto della crescita; l'OD diminuisce già nelle prime ore dall'inoculo e poi assume un andamento lievemente decrescente.

Per completezza, è riportato il confronto fra gli andamenti delle concentrazioni dei prodotti della fermentazione nelle due prove (**Figura 9.4**). È stato omesso l'acetone in quanto non ve ne è produzione nel caso di terreno autotrofico senza metalli, mentre è riportata la concentrazione di acido formico.

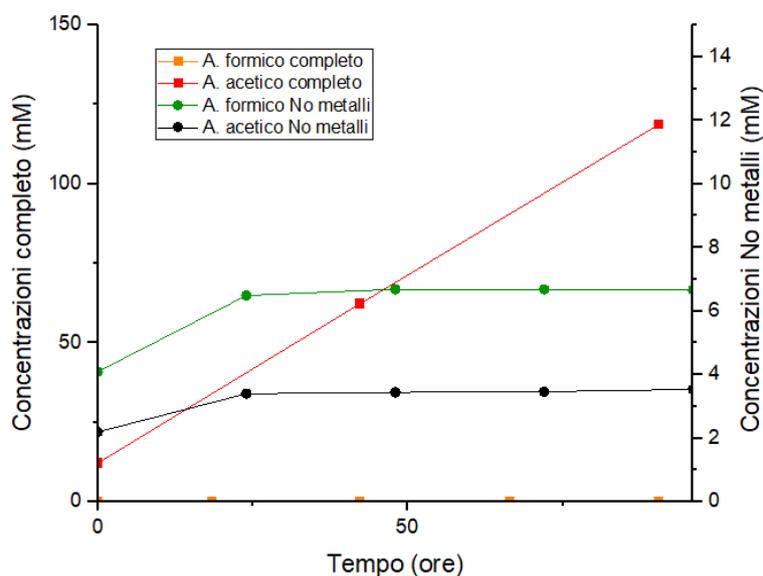


Figura 9.4 Andamento delle concentrazioni di acido acetico e acido formico in terreno autotrofico completo e in assenza di metalli

Dai grafici si nota come nei campioni senza metalli si abbia una produzione di acido formico superiore a quella di acido acetico, ma che comunque le concentrazioni finali di entrambi i prodotti siano ben lontane da quella dell'acido acetico ottenuta dalla fermentazione in terreno autotrofico completo. Dunque, l'assenza di metalli oltre ad inibire la crescita, causa un'alterazione del WLP.

Oltre alle anomalie nella crescita e nel WLP, è stato riscontrato che la pressione all'interno delle *serum bottles* aumenta fra una misura e l'altra. Ciò induce a pensare che in assenza di metalli, il metabolismo di *A. woodii* sia drasticamente alterato tanto da indurre la formazione di gas (la cui composizione non è stata indagata in quanto il volume di campione in tale sistema risulta essere minore rispetto a quello minimo richiesto dalla strumentazione analitica) e che il carbonio impiegato per la produzione di acido acetico e acido formico derivi più dalla degradazione del fruttosio residuo che dalla CO₂ introdotta.

Alla luce di quanto mostrato in questa sezione, così come l'estratto di lievito, anche i metalli risultano essere imprescindibili per la realizzazione di un impianto industriale basato sulla fermentazione anaerobica di *A. woodii* in ambiente autotrofico e che l'unica fonte di risparmio possibile è costituita dall'assenza di vitamine.

Conclusioni e sviluppi futuri

Nel presente lavoro è stato riportato lo studio della fermentazione anaerobica di *Acetobacterium woodii*, un batterio che per sua natura, in assenza di fonti di carbonio più complesse, è in grado di convertire CO₂ e H₂ in acido acetico. Tale caratteristica rende questo microrganismo interessante nell'ottica dello sviluppo di processi industriali mirati alla riduzione delle emissioni di CO₂ e alla conversione della stessa in prodotti ad alto valore aggiunto.

Questa tesi contribuisce al progetto ENGICOIN che usa CO₂ proveniente dal processo di *upgrading* (a biometano) del biogas ottenuto da un impianto di digestione anaerobica, mirando così allo sviluppo di una tecnologia *carbon negative*; nell'ottica della realizzazione di un processo che si dimostri interamente sostenibile, l'idrogeno impiegato come reagente è ottenuto mediante un elettrolizzatore PEM alimentato da energia elettrica rinnovabile. I microrganismi impiegati sono dei ceppi di *A. woodii* ingegnerizzato al fine di produrre acetone.

I processi biologici presentano notevoli vantaggi rispetto ai processi convenzionali, tra cui l'assenza di catalizzatori inorganici e l'impiego di temperature miti; questi due aspetti, fra gli altri, comportano un significativo risparmio in termini economici e soprattutto, ai fini della transizione verso un'economia circolare, in termini energetici. Tuttavia, vi sono anche diversi aspetti negativi che limitano la diffusione di processi di questo genere, tra cui la complessità del *mass transfer* dei reagenti dalla fase gas al terreno di coltura, che si traduce in una riduzione delle produttività. Per risolvere questo problema, l'approccio proposto in questo lavoro di tesi consiste nell'aumento della pressione del sistema.

La prima parte dell'attività sperimentale condotta nel presente lavoro studia gli effetti della pressione sulla crescita e sul metabolismo di *A. woodii*. Le prove sono state condotte a 9,8 bar all'interno di un reattore alimentato in continuo da gas e con fase liquida in *batch*. Nonostante le alte pressioni, impiegando una miscela gassosa contenente il 70% di H₂, il 3% di CO₂ e il 27% di N₂ in volume, è stata ottenuta una produttività di acetone pari a 0,017 kg m⁻³ h⁻¹, ben lontana dagli 8 kg m⁻³ h⁻¹ fissati come obiettivo del progetto ENGICOIN. Le curve di crescita delle prove ad alta pressione hanno mostrato una deviazione rispetto al consueto andamento esponenziale (fenomeno già riscontrato in studi riportati in letteratura) e per elevati contenuti di CO₂ è stata riscontrata la formazione di acido formico, intermedio del *Wood-Ljungdahl pathway* (WLP) che rappresenta la via metabolica seguita da *A. woodii* per la produzione di acido acetico da CO₂ e H₂. La produzione di acido formico è stata approfondita confrontando i risultati di prove condotte in reattore a 9,8 bar con diverse frazioni di CO₂ (3% e 30%) in ingresso: a basse pressioni parziali, al termine della prova non è stata riscontrata la presenza di acido formico, che invece costituisce il prodotto principale della fermentazione condotta con il 30% di CO₂ in ingresso, a conferma dell'effetto di deviazione della CO₂ sul WLP. Questo aspetto è stato confermato da ulteriori prove condotte in *serum bottles* con concentrazioni variabili di KHCO₃ che hanno evidenziato come ad alte concentrazioni di bicarbonato si abbia la formazione di una notevole quantità di acido formico. Alla luce di ciò, si può, dunque, concludere che elevate quantità di CO₂ disciolta nel terreno di coltura (indipendentemente dalla modalità di dissoluzione) comportano una deviazione del WLP verso la produzione di acido formico, mostrando come da *A. woodii* possano essere ottenuti più prodotti in base alle condizioni operative adottate. Tuttavia, le massime produttività di acido acetico e acido formico risultanti dalle due prove (rispettivamente 0,288 e 0,272 kg m⁻³ h⁻¹) risultano non essere sufficienti, allo stato attuale, per lo sviluppo del processo su grande scala.

La seconda parte dell'attività sperimentale mira all'ottimizzazione del terreno di coltura, individuando quali componenti non risultano di primaria importanza per la crescita e lo

sviluppo del metabolismo di *A. woodii*, così da ridurre i costi per la conduzione di un futuro impianto industriale basato sulla fermentazione anaerobica di *A. woodii* in ambiente autotrofico. Fra tutti i componenti del terreno di coltura, quelli che hanno un maggiore impatto economico sono le vitamine, l'estratto di lievito e i metalli. Dall'analisi è emerso che, se da un lato in assenza di vitamine non si ha alcuna variazione significativa né dei parametri relativi alla crescita dei microrganismi né di quelli riguardanti i prodotti della fermentazione, dall'altro i metalli e l'estratto di lievito risultano di vitale importanza per il corretto andamento della fermentazione e non si può prescindere dalla loro presenza, sebbene ciò abbia un impatto sui costi operativi dell'impianto.

Per ottimizzare ulteriormente il processo così da poter realizzare un impianto su grande scala che si riveli competitivo sul mercato, in futuro si potrebbero condurre ulteriori studi mirati all'individuazione del valore ottimale di pressione che favorisca un incremento del *mass transfer* rispetto alla pressione atmosferica ma che allo stesso tempo non abbia effetti negativi sulla crescita microbica. Successivamente, si potrebbero indagare in maniera più approfondita gli effetti della CO₂ sul metabolismo di *A. woodii* in maniera tale da individuare un *range* di concentrazione nel terreno di coltura per il quale si abbia la completa deviazione del WLP verso la formazione di acido formico, così da poter realizzare impianti industriali specifici per la produzione di acido acetico o acido formico. Infine, in merito alla produzione di acetone, i metodi attualmente impiegati per la realizzazione di ceppi di *A. woodii* ricombinanti non hanno portato ai risultati sperati e, dunque, sono richiesti ulteriori sforzi che portino allo sviluppo di *A. woodii* ingegnerizzati maggiormente performanti, la cui espressione dei geni legati alla sintesi di acetone consenta di raggiungere produttività consistenti.

Elenco dei simboli

ABE	Acetone-butanol-ethanol fermentation
a_w	Attività dell'acqua
BPR	Back pressure regulation
C	Costante di integrazione
CCS	Carbon capture and storage
CCU	CO ₂ conversion and utilisation
CDH	CO ₂ dehydrogenation
CDW	Cell dry weight
DFAFC	Direct formic acid fuel cells
Eh	Potenziale di ossido-riduzione
EOR	Enhanced oil recovery
F	Portata molare totale
$F_{i,i}$	Portata molare del componente i in ingresso al sistema
$F_{i,o}$	Portata molare del componente i in uscita dal sistema
F_o	Portata molare totale in uscita dal sistema
FADH	Formic acid dehydrogenation
H_i	Costante di Henry del componente i
HPLC	High performance liquid chromatography
k_{La}	Coefficiente di scambio di materia volumico
K_s	Costante di mezza saturazione
MF	Microbial factory
MFC	Mass flow controller
MFM	Coriolis mass flow meter
Micro-GC	Micro gascromatografo
n	Numero di divisioni cellulari
n_s	Numero di molecole di soluto
n_{sv}	Numero di molecole di solvente
OD	Densità ottica
p	Pressione all'interno del sistema
p_i	Pressione parziale del componente i
P	Tensione di vapore dell'acqua in soluzione

P₀	Tensione di vapore dell'acqua pura
PDA	Photodiode-array detector
PEM	Proton-exchange membrane
PEMFC	Proton-exchange membrane fuel cells
PFR	Plug flow reactor
R	Costante dei gas perfetti
RID	Refractive index detector
S	Concentrazione di substrato
SL9	Soluzione di oligoelementi
t	Tempo
t₀	Tempo di inizio della prova
t_i	Tempo della <i>i</i> -esima misura
T	Temperatura
TCD	Thermal conductivity detector
V_G	Volume della fase gas
V_L	Volume della fase liquida
WLP	Wood-Ljungdahl pathway
X	Numero di cellule
X₀	Numero di cellule al tempo 0
X_{i,L}	Concentrazione del componente <i>i</i> nella fase liquida
X_{i,L}[*]	Concentrazione del componente <i>i</i> all'equilibrio
Y_i	Frazione molare del componente <i>i</i> nella fase gas
YE	Yeast extract
μ_{max}	Massima velocità di crescita
μ_{spec}	Velocità specifica di crescita
$\frac{dn}{dt}$	Variazione del numero di moli all'interno del sistema
$\frac{dn_G}{dt}$	Variazione del numero di moli all'interno della fase gas
$\frac{dn_L}{dt}$	Variazione del numero di moli all'interno della fase liquida

Bibliografia

Al Rowaihi I. S., Kick B., Grötzinger S. W., Burger C., Karan R., Weuster-Botz D., Eppinger J., Arold S. T., 2018, A two-stage biological gas to liquid transfer process to convert carbon dioxide into bioplastic. *Bioresource Technology Reports* **1**, 61-68.

Álvarez A., Bansode A., Urakawa A., Bavykina A. V., Wezendonk T. A., Makkee M., Gascon J., Kapteijn F., 2017, Challenges in the Greener Production of Formates/Formic Acid, Methanol, and DME by Heterogeneously Catalyzed CO₂ Hydrogenation Processes. *Chemical Reviews* **117**(14), 9804-9838.

Anastas P., Eghbali N., 2010, Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301–312.

Babin A., Vaneeckhaute C., Iliuta M.C., 2021, Potential and challenges of bioenergy with carbon capture and storage as a carbon-negative energy source: A review. *Biomass and Bioenergy* **146**.

Braun K., Gottschalk G., 1981, Effect of molecular hydrogen and carbon dioxide on chemo-organotrophic growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium aceticum*. *Archives of Microbiology* **128**(3), 294-298.

Braus-Stromeier S.A., Schnappauf G., Braus G.H., Gossner A.S., Drake H.L., 1997, Carbonic anhydrase in *Acetobacterium woodii* and other acetogenic bacteria. *Journal of Bacteriology* **179**(22), 7197-7200.

Bruhn T., Naims H., Olfe-Kräutlein B., 2016, Separating the debate on CO₂ utilisation from carbon capture and storage. *Environmental Science and Policy* **60**, 38-43.

Budiman A. W., Nam J. S., Park J. H., Mukti R. I., Chang T. S., Bae J. W., Choi M. J., 2016, Review of Acetic Acid Synthesis from Various Feedstocks Through Different Catalytic Processes. *Catalysis Surveys from Asia* **20**(3), 173-193.

Bui M., Adjiman C. S., Bardow A., Anthony E. J., Boston A., Brown S., Fennell P. S., Fuss S., Galindo A., Hackett L. A., Hallett J. P., Herzog H. J., Jackson G., Kemper J., Krevor S., Maitland G. C., Matuszewski M., Metcalfe I. S., Petit C., Puxty G., Reimer J., Reiner D. M., Rubin E. S., Scott S. A., Shah N., Smit B., Trusler J. P. M., Webley P., Wilcox J., Mac Dowell N., 2018, Carbon capture and storage (CCS): The way forward. *Energy and Environmental Science* **11**(5), 1062-1176.

Bulushev D. A., Ross J. R. H., 2018, Towards Sustainable Production of Formic Acid. *ChemSusChem* **11**(5), 821-836.

Chen G., Tao J., Liu C., Yan B., Li W., Li X., 2017, Hydrogen production via acetic acid steam reforming: A critical review on catalysts. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **79**, 1091-1098.

Chen X., Liu Y., Wu J., 2020, Sustainable production of formic acid from biomass and carbon dioxide. *Molecular Catalysis* **483**, 110716.

Choi S.-H., 2013, Design and implementation of the prevention system of molds growth using wireless sensor networks. *International Journal of Distributed Sensor Networks* **2013**, 102542.

Commissione Europea, sito web: https://ec.europa.eu/clima/policies/international/negotiations/paris_it, ultimo accesso 15/04/2021.

- Demler M., Weuster-Botz D., 2011, Reaction engineering analysis of hydrogenotrophic production of acetic acid by *Acetobacterium woodii*. *Biotechnology and Bioengineering* **108**(2), 470-474.
- Drake H. L., Gößner A. S., Daniel S. L., 2008, Old acetogens, new light. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**, 100-128.
- Eppinger J., Huang K.-W., 2017, Formic Acid as a Hydrogen Energy Carrier. *ACS Energy Letters* **2**(1), 188-195.
- Hoffmeister S., Gerdom M., Bengelsdorf F. R., Linder S., Flüchter S., Öztürk H., Blümke W., May A., Fischer R.-J., Bahl H., Dürre P., 2016, Acetone production with metabolically engineered strains of *Acetobacterium woodii*. *Metabolic Engineering* **36**, 37-47.
- Howard W. L., 2004, Acetone, in “*Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology Vol. I*”, (Kirk-Othmer K.). John Wiley & Sons, Inc. All.
- Kantow C., Weuster-Botz D., 2016, Effects of hydrogen partial pressure on autotrophic growth and product formation of *Acetobacterium woodii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **39**(8), 1325-1330.
- Karimi K., Tabatabaei M., Horváth I. S., Kumar R., 2015, Recent trends in acetone, butanol, and ethanol (ABE) production. *Biofuel Research Journal* **2**(4), 301-308.
- Kujawska A., Kujawski J., Bryjak M., Kujawski W., 2015, ABE fermentation products recovery methods - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **48**, 648-661.
- Maier R. M., Pepper I. L., 2015, Bacterial Growth, in “*Environmental Microbiology: Third Edition*”, (Pepper I. L., Gerba C. P., Gentry T. J.), Cap. 4. Academic Press, Amsterdam and Boston (Massachusetts), pp 37-56.
- Market Data Forecast, sito web <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/acetone-market>, ultimo accesso 28/04/2021.
- Mordor Intelligence, acido formico, sito web: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/formic-acid-market>, ultimo accesso 20/04/2021.
- Mordor Intelligence, acido acetico, sito web: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/acetic-acid-market>, ultimo accesso 24/04/2021.
- Müller V., Aufurth S., Rahlfs S., 2001, The Na⁺ cycle in *Acetobacterium woodii*: Identification and characterization of a Na⁺ translocating F₁F₀-ATPase with a mixed oligomer of 8 and 16 kDa proteolipids. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1505**(1), 108-120.
- Müller V., Imkamp F., Biegel E., Schmidt S., Dilling S., 2008, Discovery of a ferredoxin:NAD⁺-oxidoreductase (Rnf) in *Acetobacterium woodii*: A novel potential coupling site in acetogens. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**, 137-146
- Neamah A. I., 2017, Acetone Production. *The Hilltop Review* **9**(2), 128-145. Disponibile online su <https://scholarworks.wmich.edu/hilltopreview/vol9/iss2/12>.
- Ni Y., Sun Z., 2009, Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**(3), 415-423.
- NOAA Climate, sito web: <https://www.climate.gov/news-features/understanding-climate/climate-change-atmospheric-carbon-dioxide>, ultimo accesso 02/05/2021.
- Our World in Data, sito web: <https://ourworldindata.org/emissions-by-sector>, ultimo accesso 29/03/2021.

Pal P., Nayak J., 2017, Acetic Acid Production and Purification: Critical Review Towards Process Intensification. *Separation and Purification Reviews* **46**(1), 44-61.

Patrignani F., Tabanelli G., 2013, Fattori che influenzano il metabolismo dei microrganismi negli alimenti, in “*Manuale di microbiologia predittiva*”, (Gardini F., Parente E.), Cap. 2. Springer-Verlag Mailand, pp. 15-34.

Progetto EU ENGICOIN, sito web: <https://engicoin.eu/>, ultimo accesso 28/06/2021

Ragsdale S.W., 2008, Enzymology of the Wood-Ljungdahl pathway of acetogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**, 129-136.

Raspor P., Goranovič D., 2008, Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology* **28**(2), 101-124.

Raza A., Gholami R., Rezaee R., Rasouli V., Rabiei M., 2019, Significant aspects of carbon capture and storage – A review. *Petroleum* **5**(4), 335-340.

Rees N.V., Compton R.G., 2011, Sustainable energy: a review of formic acid electrochemical fuel cells. *Journal of Solid State Electrochemistry* **15**(10), 2095-2100.

Research and Markets, sito web: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5029954/acetone-global-market-trajectory-and-analytics>, ultimo accesso 28/04/2021.

Said A. E.-A. A., Abd El-Wahab M. M. M., Goda M. N., 2016, Selective synthesis of acetone from isopropyl alcohol over active and stable CuO-NiO nanocomposites at relatively low-temperature. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* **3**(4), 357-365.

Salehizadeh, H., Yan, N., Farnood, R., 2020, Recent advances in microbial CO₂ fixation and conversion to value-added products. *Chemical Engineering Journal* **390**.

Schiel-Bengelsdorf B., Dürre P., 2012, Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS Letters* **586**(15), 2191-2198.

Schmidt R. J., 2005, Industrial catalytic processes - Phenol production. *Applied Catalysis A: General* **280**(1), 89-103.

Schuchmann K., Müller V., 2013, Direct and reversible hydrogenation of CO₂ to formate by a bacterial carbon dioxide reductase. *Science*, **342**(6164) 1382-1385.

Schwarz F.M., Müller V., 2020, Whole-cell biocatalysis for hydrogen storage and syngas conversion to formate using a thermophilic acetogen. *Biotechnology for Biofuels* **13**(1), 32.

Sifniades S., Levy A. B., 2005, Acetone, in “*Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*”, (F. Ullmann). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Tcvetkov P., Cherepovitsyn A., Fedoseev S., 2019, Public perception of carbon capture and storage: A state-of-the-art overview. *Heliyon* **5**(12).

Tech Thoroughfare, sito web: <https://www.techthoroughfare.com/series/chemical-element-carbon/what-is-the-carbon-cycle>, ultimo accesso 02/05/2021.

ThoughtCo, sito web: <https://www.thoughtco.com/bacterial-growth-curve-phases-4172692>, ultimo accesso 11/05/2021.

Van Hecke W., Bockrath R., De Wever H., 2019, Effects of moderately elevated pressure on gas fermentation processes. *Bioresource Technology* **293**, 122129.

Vidra A., Németh Á, 2018, Bio-produced acetic acid: A review. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* **62**(3), 245-256.

Weissermel K., Arpe H.-J., 2003, *Industrial Organic Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Westphal L., Wiechmann A., Baker J., Minton N.P., Müller V., 2018, The Rnf complex is an energy-coupled transhydrogenase essential to reversibly link cellular NADH and ferredoxin pools in the acetogen acetobacterium woodii. *Journal of Bacteriology* **200**(21), e00357.

Yoneda N., Kusano S., Yasui M., Pujado P., Wilcher, S., 2001, Recent advances in processes and catalysts for the production of acetic acid. *Applied Catalysis A: General* **221**(1-2), 253-265.

Zakoshansky V.M., 2007, The cumene process for phenol-acetone production. *Petroleum Chemistry* **47**(4), 273-284.

Ringraziamenti

Ringrazio la professoressa Fino e la professoressa Tommasi per avermi accolto all'interno del loro gruppo di ricerca e Loredana per l'infinita disponibilità e pazienza mostrate dal primo all'ultimo giorno della realizzazione di questa tesi.

Un infinito grazie va a Maria Chiara perché non riesco a immaginare come sarebbero stati questi ultimi quattro anni e mezzo senza di lei. Mi ritengo estremamente fortunato di avere accanto una persona che sia da stimolo continuo e che dopo tutto questo tempo ogni giorno riesca ancora a sorprendermi. Grazie per essermi stata accanto in ogni singolo momento, bello o brutto che fosse, e per riuscire a farmi provare quotidianamente delle emozioni che non pensavo mi appartenessero.

Ringrazio Christian, una delle prime persone che ho conosciuto al mio arrivo a Torino. Fin da subito si è mostrato quell'amico sincero che avevo sempre desiderato e in breve tempo fra noi si è instaurata un'intesa incredibile che ha portato alla condivisione di una serie infinita di partite di calcio, birre, canzoni cantate a squarciagola con la chitarra e confidenze.

Ringrazio Erica, perché la sua presenza nell'ultimo anno e mezzo è stata di fondamentale importanza sotto mille diversi aspetti. Per citare lei stessa, siamo troppo simili, tanto che i nostri confronti si concludono spesso senza risolvere apparentemente nulla. Ma spesso avere qualcuno accanto che ci comprende vale molto di più di avere qualcuno che ci risolve la vita.

Ringrazio Simona e Chiara, perché sebbene negli ultimi anni le mie permanenze ad Enna per le vacanze siano sempre state volutamente molto brevi, ogni volta che ci ritroviamo ho sempre la tentazione di rimandare il viaggio di ritorno per accorciare il tempo che ci separa dal nostro prossimo incontro.

Ringrazio mio fratello Danilo, perché da sempre è stato un modello per me e per essere stato un punto fermo nella mia vita, specialmente in questi anni del mio percorso universitario, mettendo sempre a disposizione la sua esperienza e tendendomi prontamente una mano nei momenti di difficoltà.

Volutamente per ultimi ringrazio i miei genitori, perché nulla di tutto ciò che precede queste ultime parole sarebbe stato possibile senza i loro sacrifici e senza il loro perenne sostegno. Rimpiango di non aver ascoltato sempre i loro consigli, perché solo ora mi rendo conto di quanto fossero preziosi e di quanto ne avrei tratto giovamento. Grazie per aver creduto in me molto più di quanto lo abbia fatto io stesso.