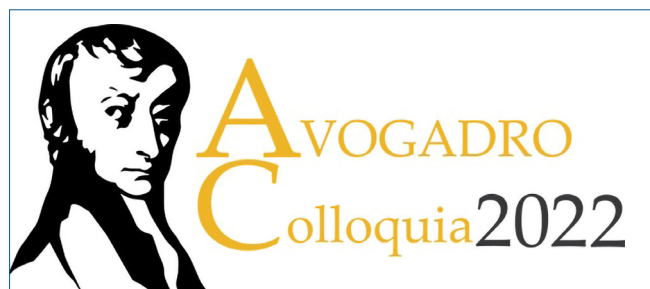




“IDROGENO VERDE” DA MECCANISMI BIOLOGICI DI CONSERVAZIONE DELL'ENERGIA

Un nuovo pathway di fermentazione chiamato “Capnophilic Lactic Fermentation” (CLF) è stato identificato e brevettato nel batterio anaerobico ipertermofilo *Thermotoga neapolitana*. Il processo permette la sintesi biologica di idrogeno verde e la valorizzazione della CO₂ in acido L-lattico (95% e.e.) a partire da zuccheri e sottoprodotti agro-alimentari (Fig. 1).



La produzione biologica di idrogeno si basa sulla capacità di alcuni microrganismi di ridurre i protoni a idrogeno attraverso enzimi chiave quali idrogenasi e nitrogenasi, dissipando, quindi, l'energia in eccesso secondo la reazione:



Gli elettroni per la reazione provengono da percorsi di ossidazione biologica, come la scissione dell'acqua negli organismi fotosintetici o l'ossidazione del glucosio in microrganismi anaerobici.

La produzione di idrogeno è, quindi, essenzialmente un meccanismo fisiologico di dissipazione dell'energia finalizzato a mantenere l'omeostasi cellulare. Per poter sfruttare a livello biotecnologico la produzione di bio-idrogeno, è essenziale conoscere le interconnessioni tra la sintesi dell'idrogeno e le altre vie metaboliche correlate.

L'idrogeno biologico si basa completamente su fonti rinnovabili e l'idrogeno prodotto nello spazio di testa dei bioreattori è altamente puro, privo di altri gas e non richiede alcun pretrattamento prima dell'uso nelle celle a combustibile per la generazione di elettricità.

I microrganismi generano idrogeno sfruttando due vie principali: la fotosintesi e la fermentazione. Le microalghe producono idrogeno dalla biofotolisi diretta dell'acqua, mentre alcuni cianobatteri se-

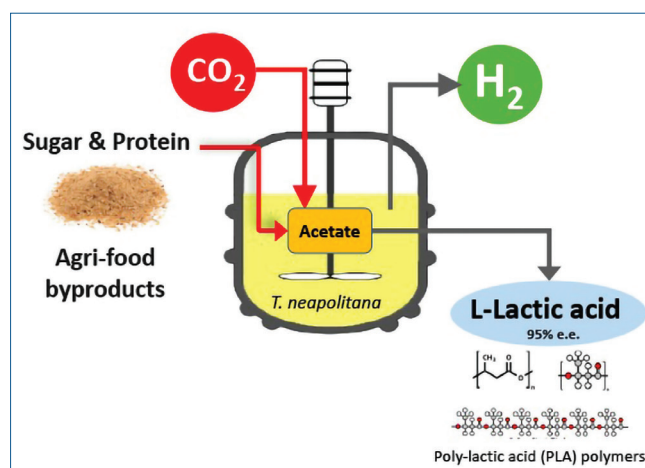


Fig. 1 - Capnophilic Lactic Fermentation (CLF-fermentazione lattica capnofilica), via biologica identificata e brevettata dal CNR (EP2948556B1) in *Thermotoga neapolitana* che consente la sintesi di idrogeno e acido L-lattico a partire da zuccheri e sottoprodotti agroalimentari



Fig. 2 - *Thermotoga neapolitana* (foto su cortesia di Prof. Zhaohui Xu)

parano temporalmente o spazialmente la fotosintesi dalla produzione di idrogeno mediante fotolisi indiretta. Poi abbiamo batteri fotoeterotrofi, come i batteri rossi, che utilizzano acidi organici come fonte organica, la luce come fonte di energia e un particolare enzima chiamato nitrogenasi. Infine, abbiamo batteri anaerobici che durante la fermentazione al buio (*dark fermentation*) producono idrogeno utilizzando i carboidrati come substrati.

In termini di produttività, la fermentazione al buio rappresenta uno dei modi più promettenti per la produzione biologica di idrogeno rispetto ad altri percorsi biologici.

Nel processo di fermentazione del glucosio in idrogeno, l'ossidazione del piruvato in acetil-CoA è un passaggio chiave per la riduzione della ferredossina che, insieme all'ossidazione del NADH e alla riduzione dei protoni da parte dell'idrogenasi, porta alla produzione di idrogeno. La produzione di lattato e di metaboliti ridotti influenzano l'efficienza del percorso, riducendo la disponibilità di piruvato e NADH per le idrogenasi.

In questo contesto, abbiamo iniziato a lavorare sulla produzione di idrogeno nel 2005. Il nostro organismo modello è *Thermotoga neapolitana*, un batterio anaerobico ipertermofilo con una temperatura ottimale di crescita di 80 °C, isolato da sistemi idrotermali nel Golfo di Pozzuoli nel 1986, caratterizzato da una spessa membrana (toga) costituita da peptidoglicani che avvolgono e proteg-

gono l'intera cellula procariotica (Fig. 2). Il processo di fermentazione acetica è stato ottimizzato per la produzione di idrogeno lavorando su diversi parametri di coltura, come agitazione, correzione del pH, sparging di azoto, rapporto spazio di testa/volume di coltura, consumo di glucosio e così via, consentendo di ottenere una resa di idrogeno molto vicina al valore teorico di 4 moli di idrogeno per mole di glucosio e un alto tasso di produzione di idrogeno. Le condizioni sono state testate su piccoli reattori da 100 ml e convalidate su fermentatori da 3 litri (Fig. 3). L'idrogeno prodotto nello spazio di testa dei bioreattori è altamente puro, privo di altri gas e non richiede alcun trattamento prima

dell'uso nelle celle a combustibile per la generazione di elettricità.

Durante la coltivazione di questo batterio viene utilizzato un flusso di azoto per garantire un ambiente anaerobico. Ma qual è l'effetto della somministrazione di CO₂ alla coltura?

L'insufflazione di CO₂ causava una significativa accelerazione del processo di fermentazione con un incremento della curva di crescita e del tasso di consumo di glucosio. La CO₂ non impattava sulla produzione complessiva di idrogeno, riduceva la produzione di acido acetico e aumentava i livelli di acido lattico. La riduzione dell'acido acetico indotta dalla CO₂ era, quindi, quasi bilanciata dall'aumento dei livelli di acido lattico pur lasciando inalterati i livelli di idrogeno. Questo era alquanto strano, considerando che, come detto precedentemente, la sintesi di idrogeno e di acido lattico competono per un pool comune di NADH.

Oltre all'effetto cinetico della CO₂ sulla fermentazione, in *Thermotoga neapolitana* la CO₂ viene fissata nel carbonio 1 dell'acido L-lattico, mediante carbossilazione riduttiva dell'acetato. Ciò è stato dimostrato inequivocabilmente mediante NMR e MS, seguendo il percorso di substrati esogeni marcati con ¹³C. La carbossilazione riduttiva enzimatica dell'acetato in lattato offre un meccanismo biologico per convertire la CO₂ in prodotti chimici ad alto valore aggiunto e quindi di notevole significato biotecnologico. Ancor più se pensiamo che,



Thermostated Shaker, Serum Bottles 0,1-1L



3L CSTR Fermenter



56 L Fermenter

Fig. 3 - Sistemi di coltivazione di *Thermotoga neapolitana* utilizzati da CNR-ICB per la produzione di idrogeno verde

fino ad oggi, sono poche le vie biologiche non-fotosintetiche per la conversione della CO_2 in prodotti chimici di base. I *pathways* sono stati descritti in alcuni microrganismi anaerobici, come Archaea e chemiolitotrofi, tuttavia in nessuno di questi batteri è stata segnalata una concomitante produzione di idrogeno poiché, nella maggior parte dei casi descritti, l'idrogeno è un reagente e mai un prodotto. Ma quanto è diffuso questo meccanismo negli altri batteri ipertermofili? Lo screening di diverse specie del genere *Thermotoga* e *Pseudothermotoga* ha rivelato che il meccanismo, oltre che in *Thermo-*

toga neapolitana (DSMZ 4359), è presente soltanto in *T. neapolitana subsp. capnolactica* (ceppo proprietario generato nel nostro laboratorio in concentrazioni saturanti di CO_2) e in *Thermotoga sp. strain RQ7*, che ha una sequenza genomica completa ed è più facilmente trasformabile con tecniche genetiche essendo naturalmente competente. Questo rende più fattibile la manipolazione genetica di *Thermotoga*, aprendo nuove strade per l'indagine molecolare del percorso e l'ingegnerizzazione del *pathway*.

Abbiamo inoltre investigato quali possano essere le fonti di carbonio, alternative al glucosio, per alimentare il processo. Grazie alla presenza di numerosi enzimi idrolitici, *Thermotoga neapolitana* è in grado di internalizzare, idrolizzare e fermentare una grande varietà di monosaccaridi, disaccaridi (es. saccarosio e lattosio) e polisaccaridi complessi (es. amido e cellulosa), mantenendo la capacità di riciclare CO_2 in acido lattico e produrre idrogeno con alti tassi, senza alcun tipo di pretrattamento delle matrici. Ciò è interessante nell'ottica di valorizzare i rifiuti a base di zucchero in un approccio

di economia circolare, come i sottoprodotti dell'industria dolciaria (a base di amido), dell'industria dello zucchero (a base di saccarosio), dei rifiuti alimentari organici (varie), dell'industria lattiero-casearia (a base di lattosio) e dell'industria del biodiesel (a base di glicerolo).

Nel complesso, abbiamo chiamato questa via biosintetica "Capnophilic Lactic Fermentation" (CL-F-fermentazione lattica capnofilica), dove capnofilico significa "che richiede CO_2 " (Fig. 1).

La via, identificata e brevettata dai ricercatori del CNR (EP2948556B1) in *Thermotoga neapolitana*



consente la sintesi di idrogeno e acido L-lattico con rese elevate da zuccheri e CO₂. Le rese di idrogeno sono prossime al valore massimo teorico di 4 moli di idrogeno per mole di glucosio, e l'acido L-lattico è quasi enantiomericamente puro, essendo anche la forma principale utilizzata per scopi industriali (ad esempio sintesi del PLA). Inoltre, i rifiuti organici a base di zucchero possono essere utilizzati come materie prime di carboidrati per la produzione di bioidrogeno senza fase di idrolisi chimica o enzimatica della matrice grezza. Si tratta di una questione cruciale considerando che la fase di saccarificazione rappresenta attualmente uno dei maggiori colli di bottiglia economici nei processi di bioraffineria.

La CLF è un processo sostenibile e biotecnologicamente attraente per la produzione biologica di "idrogeno verde" e la valorizzazione della CO₂ in prodotti chimici di base. Il processo è attualmente ottimizzato e validato su fermentatore da circa 50 L (Fig. 3), nel quale abbiamo stimato una resa di 1 q glucosio/35 m³ H₂ (10,8 kW/h; 39 MJ)/5-20 m³ cultura con un tasso di 100-1000 mL H₂/L cultura/h, con una conversione dello zucchero del 75% e una produzione di acido L-Lattico di 0,5-1 q/q di glucosio.

Lo sviluppo di questo processo in chiave biotecnologica è stato reso possibile dall'intenso studio effettuato da CNR-ICB delle reciproche interazioni dei percorsi relazionati alla biosintesi di idrogeno. Gli studi chimici e biochimici ci hanno permesso di accumulare importanti indicazioni riguardanti la riorganizzazione cellulare e metabolica indotta dalla CO₂. Le reazioni chiave della produzione di idrogeno e della fissazione della CO₂ nel lattato in *Thermotoga neapolitana* fanno parte in effetti di una complessa rete metabolica, che coinvolge il bilancio del carbonio, il bilancio dell'idrogeno e la gestione del potere riducente, che hanno offerto interessanti spunti di ricerca di respiro internazionale per gli autori [1-20].

BIBLIOGRAFIA

- [1] Z. Xu, G. d'Ippolito, *Trends in Microbiology*, 2023, **31**(1), 107.
- [2] N. Esercizio et al., *International Journal of*

- Molecular Sciences*, 2022, **23**, 12049.
- [3] N. Esercizio et al., *Microorganisms*, 2021, **9**(8), 1688.
- [4] G. d'Ippolito et al., *Bioresource Technology*, 2021, **319**, 124078.
- [5] N. Esercizio et al., *Resources*, 2021, **10**, 4.
- [6] M. Lanzilli et al., *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**(1), 341.
- [7] G. d'Ippolito et al., *Frontiers in Microbiology*, 2020, **11**, 17.
- [8] G. Nuzzo et al., *Fermentation*, 2019, **5**(2), 34.
- [9] G. Dreschke et al., *International Journal of Hydrogen Energy*, 2019, **44**(36), 19698.
- [10] N. Pradhan et al., *Biomass and Bioenergy*, 2019, **125**, 17.
- [11] G. Dreschke et al., *International Journal of Hydrogen Energy* 2018, **43**(29), 13072.
- [12] L. Dipasquale et al., in *Grand Challenges in Marine Biotechnology*, P. Rampelotto, A. Trincone (Eds.) 2018, 217.
- [13] N. Pradhan et al., *International Journal of Hydrogen Energy*, 2017, **42**(25), 16023.
- [14] N. Pradhan et al., *Energies*, 2017, **10**, 665.
- [15] N. Pradhan et al., *Water Research*, 2016, **99**, 225.
- [16] N. Pradhan et al., *International Journal of Hydrogen Energy*, 2016, **41**(9), 4931.
- [17] L. Dipasquale et al., *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014, **39**(10), 4857.
- [18] G. d'Ippolito et al., *ChemSusChem*, 2014, **7**(9), 2678.
- [19] G. d'Ippolito et al., *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, **35**(6), 2290.
- [20] A. Fontana, G. d'Ippolito, L. Dipasquale, EP2948556B1, Appl. 24/01/2014, grant 14/06/2017.

"Green Hydrogen" from Biological Mechanisms of Energy Conservation

A new fermentation pathway called "Capnophilic Lactic Fermentation" (CLF) has been identified and patented in the hyperthermophilic anaerobic bacterium *Thermotoga neapolitana*. The process enables the biological synthesis of green hydrogen and the valorization of CO₂ into L-lactic acid (95% e.e.) starting from sugars and agri-food byproducts (Fig. 1).