

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

Valorizzazione di scarti alimentari per la produzione di bioidrogeno



**Politecnico
di Torino**

Relatrice

prof.ssa Tonia Tommasi

Correlatrice

prof.ssa Francesca Demichelis

Candidato

Francesco Birgitta

Marzo 2024

Indice

1. Introduzione	1
2. Economia circolare	3
3. Rifiuti alimentari	4
3.1. <i>Gestione dei rifiuti</i>	4
3.2. <i>Pretrattamento dei rifiuti alimentari</i>	6
4. Metodi per la produzione di idrogeno da biomassa	8
4.1. <i>Gassificazione</i>	8
4.2. <i>Biogas reformation</i>	9
4.3. <i>Foto-fermentazione</i>	9
4.4. <i>Cella di elettrolisi microbica</i>	10
5. Dark fermentation	11
5.1. <i>Descrizione del processo</i>	11
5.2. <i>Pretrattamento dell'inoculo</i>	12
5.2.1. <i>Pretrattamento termico</i>	12
5.2.2. <i>Aerazione</i>	12
5.2.3. <i>Pretrattamento acido e basico</i>	13
5.2.4. <i>Irradiazione</i>	13
5.2.5. <i>Inibizione chimica</i>	13
5.2.6. <i>Pretrattamento degli acidi grassi a catena lunga</i>	14
5.3. <i>Parametri di processo</i>	14
5.3.1. <i>Temperatura</i>	14
5.3.2. <i>pH</i>	14
5.3.3. <i>Umidità</i>	15
5.3.4. <i>Tempo di ritenzione idraulica</i>	15
5.3.5. <i>Ioni metallici</i>	15
5.3.6. <i>Design del bioreattore</i>	16
5.4. <i>Digestione anaerobica a doppio stadio</i>	16
6. Materiali e metodi	18
6.1. <i>Obiettivo dell'esperimento</i>	18
6.2. <i>Campagna sperimentale 1: ottimizzazione dell'inoculo</i>	18
6.3. <i>Campagna sperimentale 2: valorizzazione delle biomasse</i>	20
6.4. <i>Campagna sperimentale 3: digestione anaerobica a doppio stadio</i>	23
6.4.1. <i>Primo stadio: dark fermentation</i>	24
6.4.2. <i>Secondo stadio: digestione anaerobica</i>	26
6.5. <i>Analisi eseguite</i>	27
6.5.1. <i>Monitoraggio della produzione giornaliera di biogas</i>	27
6.5.2. <i>Analisi elementare</i>	27
6.5.3. <i>Analisi al gas cromatografo</i>	27
6.5.4. <i>Analisi dei solidi totali e analisi dei solidi volatili</i>	28
6.5.5. <i>Misurazione del pH</i>	28
6.6. <i>Calcolo del potere calorifico superiore</i>	28
7. Risultati ottenuti	30
7.1. <i>Campagna sperimentale 1: ottimizzazione dell'inoculo</i>	30
7.2. <i>Campagna sperimentale 2: valorizzazione delle biomasse</i>	36
7.3. <i>Campagna sperimentale 3: digestione anaerobica a doppio stadio</i>	45
7.3.1. <i>Primo stadio: dark fermentation</i>	45
7.3.2. <i>Secondo stadio: digestione anaerobica</i>	50

7.3.3. Confronto valori di produzione di idrogeno e metano	55
8. Conclusioni	58
9. Sviluppi futuri	60
Bibliografia	61
Ringraziamenti	64

Indice delle figure

Figura 1.1 – Ruolo del bioH ₂ nell'economia circolare tratta da (Ubando et al., 2022)	1
Figura 3.1 – Gerarchia dello spreco alimentare tratta da (Salemdeeb et al., 2017)	4
Figura 3.2 – Caratteristiche chimico-fisiche dei rifiuti alimentari tratta da Mohanakrishna et al. (2023)	5
Figura 3.3 – Pretrattamenti per i rifiuti alimentari tratta da (Rajesh Banu et al., 2020)	6
Figura 4.1 – Sistema di gassificazione tratto da (Yagmur Goren et al., 2023)	8
Figura 4.2 – Schema di biogas reformation tratto da (Yagmur Goren et al., 2023)	9
Figura 4.3 – Rappresentazione fotobioreattore anaerobico tratta da (Yagmur Goren et al., 2023)	10
Figura 4.4 – Cella di elettrolisi microbica tratta da (Yagmur Goren et al., 2023)	10
Figura 5.1 – Rappresentazione dell'utilizzo dei prodotti di fermentazione per ottenimento di una economia circolare tratta da (Dahiya et al., 2021)	17
Figura 6.1 – Configurazioni prima campagna sperimentale	19
Figura 6.2 - Configurazioni seconda campagna sperimentale	21
Figura 6.3 – Rappresentazione del gas cromatografo	27
Figura 7.1 – Diagramma a colonne rappresentante le variazioni di pH per le configurazioni della prima campagna sperimentale	31
Figura 7.2 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioH ₂ della prima campagna sperimentale	31
Figura 7.3 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioCH ₄ della prima campagna sperimentale	32
Figura 7.4 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di anidride carbonica della prima campagna sperimentale	33
Figura 7.5 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di biogas della prima campagna sperimentale	33
Figura 7.6 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “SACC” della prima campagna sperimentale	34
Figura 7.7 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “SACCTERM” della prima campagna sperimentale	34
Figura 7.8 – Diagramma a colonne rappresentante le variazioni di pH per le configurazioni della seconda campagna sperimentale	37
Figura 7.9 - Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioH ₂ della seconda campagna sperimentale	38
Figura 7.10 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioCH ₄ della seconda campagna sperimentale	38
Figura 7.11 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di CO ₂ della seconda campagna sperimentale	39

Figura 7.12 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di biogas della seconda campagna sperimentale	40
Figura 7.13 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “ORTSACCmA” della seconda campagna sperimentale	41
Figura 7.14 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “ORTMARMmA” della seconda campagna sperimentale	41
Figura 7.15 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “ORTMARMmB” della seconda campagna sperimentale	42
Figura 7.16 - Diagramma a colonne rappresentante le variazioni di pH per le configurazioni del primo stadio della terza campagna sperimentale	46
Figura 7.17 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioH ₂ per il primo stadio della terza campagna sperimentale	46
Figura 7.18 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioCH ₄ per il primo stadio della terza campagna sperimentale	47
Figura 7.19 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di CO ₂ per il primo stadio della terza campagna sperimentale	47
Figura 7.20 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di biogas per il primo stadio della terza campagna sperimentale	48
Figura 7.21 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “BIOTERM/INOC” del primo st. della campagna sperimentale 3	49
Figura 7.22 – Diagramma a colonne rappresentante le variazioni di pH per le configurazioni del secondo stadio della terza campagna sperimentale	50
Figura 7.23 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioCH ₄ per il secondo stadio della terza campagna sperimentale	51
Figura 7.24 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di CO ₂ per il secondo stadio della terza campagna sperimentale	52
Figura 7.25 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioH ₂ per il secondo stadio della terza campagna sperimentale	53
Figura 7.26 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di biogas per il secondo stadio della terza campagna sperimentale	53
Figura 7.27 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “BIOTERM/INOC” del secondo st. della campagna sperimentale 3	54

Indice delle tabelle

Tabella 6.1 – Solidi totali e solidi volatili su solidi totali dell'inoculo	18
Tabella 6.2 – Composizione elementare dell'inoculo	18
Tabella 6.3 – Contenuto delle configurazioni della prima campagna sperimentale	19
Tabella 6.4 – Solidi totali e solidi volatili su solidi totali dell'inoculo inspessito e non inspessito	20
Tabella 6.5 – Solidi totali e solidi volatili su solidi totali delle biomasse utilizzate	20
Tabella 6.6 – Composizione elementare delle biomasse utilizzate	20
Tabella 6.7 – Configurazioni della seconda campagna sperimentale	23
Tabella 6.8 – Solidi totali e solidi volatili su solidi totali dei digestati del primo stadio fermentativo della terza campagna sperimentale	24
Tabella 6.9 – Analisi elementare dei digestati del primo stadio fermentativo della terza campagna sperimentale	24
Tabella 6.10 – Configurazioni del primo stadio della terza campagna sperimentale	26
Tabella 6.11 – Configurazioni del secondo stadio della terza campagna sperimentale	26
Tabella 7.1 – Riepilogo configurazioni della prima campagna sperimentale	30
Tabella 7.2 – Rappresentazione dei valori di pH prima e dopo il processo della prima campagna sperimentale	30
Tabella 7.3 – Rappresentazione dei valori dei solidi totali e dei solidi volatili su solidi totali dei digestati per ogni configurazione della prima campagna sperimentale	35
Tabella 7.4 – Composizione elementare dei digestati per ogni configurazione reattoristica della prima campagna sperimentale	36
Tabella 7.5 – Rappresentazione dei valori di pH prima e dopo il processo della seconda campagna sperimentale	36
Tabella 7.6 – Rappresentazione dei valori dei solidi totali e dei solidi volatili su solidi totali dei digestati per ogni configurazione reattoristica della campagna sperimentale 2	44
Tabella 7.7 – Composizione elementare dei digestati per ogni configurazione reattoristica della seconda campagna sperimentale	44
Tabella 7.8 – Riepilogo configurazioni del primo st. della campagna sperimentale 3	45
Tabella 7.9 – Rappresentazione dei valori di pH prima e dopo il processo nel primo stadio della terza campagna sperimentale	45
Tabella 7.10 – Rappresentazione dei valori dei solidi totali e dei solidi volatili su solidi totali dei digestati per ogni configurazione reattoristica del primo stadio della terza campagna sperimentale	49
Tabella 7.11 – Analisi elementare dei digestati per ogni configurazione reattoristica del primo stadio della terza campagna sperimentale	50
Tabella 7.12 – Rappresentazione dei valori di pH prima e dopo il processo del secondo stadio della terza campagna sperimentale	50

Tabella 7.13 – Rappresentazione dei valori dei solidi totali e dei solidi volatili su solidi totali dei digestati per ogni configurazione del secondo st. della campagna sperimentale 3 54

Tabella 7.14 – Composizione elementare dei digestati per ogni configurazione reattoristica del secondo stadio della terza campagna sperimentale 55

Tabella 7.15 – Rappresentazione relativa ai valori del potere calorifico superiore per i digestati delle configurazioni reattoristiche del secondo stadio della terza campagna sperimentale e scarti alimentari 55

1. Introduzione

Il bioidrogeno può essere considerato come futuro vettore energetico, in quanto presenta calore di combustione estremamente elevato (142.9 kJ/g) ed è considerato una fonte di energia pulita poiché ha un unico prodotto di combustione e non produce contaminanti. Inoltre, ha un'efficienza termica più alta del 30-60% rispetto a quella delle fonti tradizionali di energia (Zheng et al., 2022). Attualmente il 95% della sua produzione deriva dai combustibili fossili. Questi ultimi venti anni hanno visto un crescente interesse nella produzione biologica di idrogeno tramite *dark fermentation*. In particolare, lo sviluppo di sistemi su scala pilota è fondamentale per dimostrare la fattibilità della produzione di bioidrogeno su larga scala. Modalità alternative e sostenibili per la produzione di idrogeno e metano possono portare alla riduzione dell'utilizzo dei combustibili fossili e promuovere l'uso della biomassa come risorsa. Attualmente, l'idrogeno prodotto biologicamente da materie prime rinnovabili sta incrementando la sua popolarità per il suo potenziale nell'ambito della decarbonizzazione. Per competere con i processi che utilizzano combustibili fossili come materia prima, i processi biologici necessitano di uno scale up, che possa essere economicamente percorribile. La produzione dai fossili non è sostenibile e, nonostante questo, è la modalità più economica e utilizzata (Mohanakrishna et al., 2023).

Un aspetto fondamentale è relativo all'economia circolare (CE), un modello secondo il quale si dovrebbe cercare di ridurre il consumo di risorse e gli impatti ambientali massimizzando il servizio di una risorsa, allungandone la durata. Le risorse da utilizzare dovrebbero essere rinnovabili, così da sfruttare risorse che altrimenti rimarrebbero inutilizzate come i rifiuti. La produzione di idrogeno, tramite *dark fermentation*, è una valida soluzione per la realizzazione di un'economia decarbonizzata e per la valorizzazione dei rifiuti. L'idrogeno e l'anidride carbonica sono i prodotti principali del processo. L'idrogeno può essere trasportato e utilizzato per diverse applicazioni (Ubando et al., 2022). La *figura 1.1* indica il ruolo del bioidrogeno nella CE.

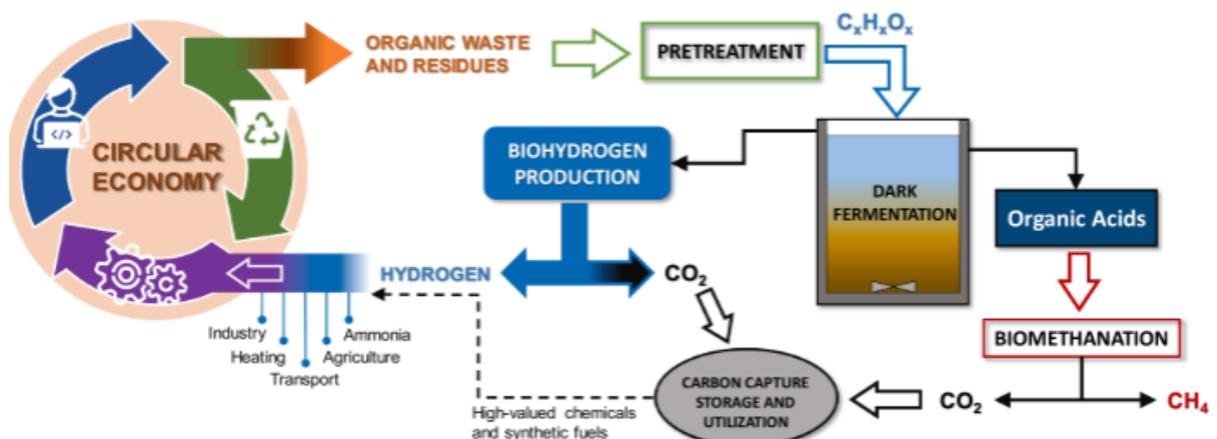


Figura 1.1 – Ruolo del $bioH_2$ nell'economia circolare tratta da (Ubando et al., 2022)

I rifiuti alimentari costituiscono la maggioranza dei rifiuti organici generati nel mondo. Le tecniche tradizionali di smaltimento sono l'incenerimento e il rilascio in discarica, le quali possono generare danni all'ambiente. Tuttavia, tali rifiuti possono essere convertiti tramite *dark fermentation* in idrogeno, sfruttando dei microrganismi anaerobi (Ubando et al., 2022). In questo modo si può evitare l'accumulo dei rifiuti, valorizzandoli. Inoltre, lo scarto della *dark fermentation*, chiamato digestato, è un substrato interessante per un ulteriore stadio di digestione anaerobica in quanto contiene carbonio al suo interno. Tramite un processo di digestione anaerobica a doppio stadio si può valorizzare la biomassa di scarto producendo

idrogeno attraverso *dark fermentation* e convertendone in metano il digestato tramite la tradizionale digestione anaerobica.

Il presente lavoro di tesi concerne la valorizzazione di scarti agro-alimentari per la produzione di bioidrogeno. L'attività di tesi è stata suddivisa in tre campagne sperimentali: la prima campagna è stata realizzata per studiare e ottimizzare l'inoculo per la produzione di idrogeno; la seconda è stata realizzata per testare il processo di *dark fermentation* su scarti agro-alimentari considerando la migliore configurazione di inoculo della campagna precedente; la terza campagna si è concentrata sulla digestione anaerobica a doppio stadio degli stessi scarti per verificare la resa di due vettori energetici: H₂ e CH₄.

2. Economia circolare

L'economia circolare è un modello che mira a ridurre i rifiuti, condividere le risorse e allungare il ciclo di vita di un prodotto. Enfaticamente l'uso di materie prime di derivazione biologica, cosicché si possa trovare un'alternativa ai combustibili fossili. L'utilizzo di materie prime di origine biologica presenta anche dei rischi. Ad esempio, possono sussistere problematiche ambientali e sociali; in particolare, tra le popolazioni indigene sono state documentate condizioni di lavoro pessime all'interno dell'industria dei biocarburanti. La consapevolezza dei rischi può aiutare ad utilizzare questo modello con successo come esposto dallo studio di Marshall et al. (2023) che suggerisce cinque principi guida per la transizione verso una economia circolare. In particolare, si parla di:

- Ecologia. Bisogna adottare un pensiero ecologico, sviluppando norme e valori che prevedano la conservazione degli ecosistemi. Inoltre, le aziende devono comprendere la potenzialità dell'utilizzo di alternative come le biomasse. Parallelamente, bisogna considerare ecosistemi costituiti da risorse *bio-based*.
- Autenticità. Bisogna garantire il raggiungimento dell'economia circolare ed evitare il *biowashing*, ovvero la strategia di certe aziende finalizzata a costruire una propria immagine positiva sotto il profilo dell'impatto ambientale. In questo modo, si trascurano i danni che l'uso di materiali di derivazione biologica può provocare sull'ambiente e sui profitti dell'azienda. Conseguentemente, bisogna applicare autenticamente i principi sostenibili piuttosto che cercare di apparire come tali ed è necessario che le aziende garantiscano la gestione ottimale di questa tipologia di risorse.
- Resilienza. Il passaggio all'economia circolare avrà effetti significativi sulla resilienza dell'azienda, sull'ambiente naturale e sui sistemi sociali coinvolti. A livello operativo, le aziende avranno bisogno di flessibilità organizzativa per affrontare l'elevata incertezza ambientale e la complessità dei prodotti.
- Trasformazione. La transizione verso un'economia sostenibile comporta una trasformazione totale di interi settori. Bisogna modificare il modo di pensare, rivalutare le idee di proprietà, consumo e valore all'interno della società. I governi e i consumatori incentivano e incoraggiano questa trasformazione e questa tendenza non potrà che aumentare in futuro.
- Olistico. È necessario incorporare il pensiero sistemico nel processo decisionale, individuale e organizzativo. Questa pratica fornisce alle aziende una prospettiva multilivello dell'economia circolare tramite la creazione di strategie e pratiche che tengano in considerazione l'organizzazione, le sue catene di fornitura e le sue reti, nonché la società e l'ambiente. Il pensiero olistico richiede un approccio relazionale per sviluppare nuove connessioni lungo l'intera *value – chain*, comprese le relazioni non tradizionali con governi, accademie, fornitori e consumatori. Solo le organizzazioni che considerano questo tipo di economia come un sistema olistico completo svilupperanno la mentalità e la cultura organizzativa necessarie per incorporare gli altri quattro principi.

Il passaggio all'economia circolare offre alle aziende l'opportunità di prosperare, creare posti di lavoro, diventare competitive tra le industrie che utilizzano risorse biologiche, essere più sostenibili e arricchire le comunità. Queste aziende possono avere successo seguendo i cinque principi sopra citati. In questo modo, svolgeranno un ruolo fondamentale nella transizione verso una società giusta, resiliente ed ecologicamente sostenibile per tutti (Marshall et al., 2023).

3. Rifiuti alimentari

3.1. Gestione dei rifiuti

In questi anni, i sistemi di produzione alimentare sono diventati molto efficienti, ma non sono completamente sostenibili in quanto il suolo si sta deteriorando, l'uso di fertilizzanti, pesticidi e antimicrobici è troppo elevato e molto cibo viene sprecato. L'Unione Europea descrive lo spreco alimentare, come "qualsiasi sostanza o oggetto di cui il detentore si disfa o vuole disfarsi", e dovrebbe essere ridotto (Focker et al., 2022). Lo spreco alimentare è un problema globale ed è una sfida per quanto riguarda la gestione dei rifiuti. I metodi di trattamento convenzionali dei rifiuti sono la messa in discarica, il compostaggio, l'incenerimento e la pirolisi, i quali si sono rilevati non sostenibili (Mohanakrishna et al., 2023). Le discariche producono grandi quantità di gas serra, così come l'incenerimento e il compostaggio. L'Unione Europea fornisce linee guida su quali tecnologie sono preferibili da utilizzare. La gerarchia dello spreco alimentare definisce come i governi dovrebbero dare priorità alla gestione dei rifiuti alimentari. Dal più al meno preferibile si ha:

- (1) Ridurre lo spreco alimentare.
- (2) Ridistribuire i vari scarti.
- (3) Riciclare scarti come mangime per animali.
- (4) Compostaggio.
- (5) Recuperare energia attraverso la digestione anaerobica.
- (6) Utilizzare la discarica.

Tuttavia, l'utilizzo di rifiuti alimentari come mangime per animali è illegale nella maggior parte dei Paesi dell'Unione Europea (Salemdeeb et al., 2017).

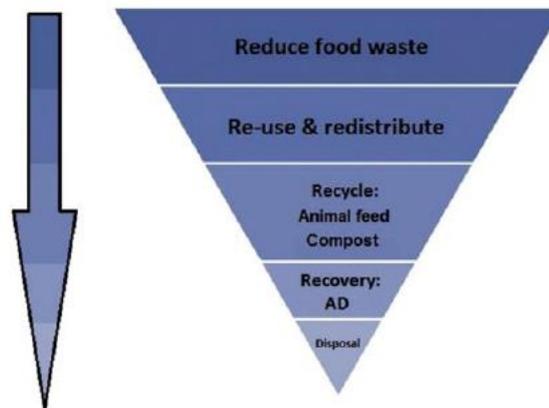


Figura 3.1 – Gerarchia dello spreco alimentare tratta da (Salemdeeb et al., 2017)

Il riciclaggio e il riutilizzo hanno un forte impatto sulla sicurezza alimentare, sulla qualità degli alimenti, sullo sviluppo economico e sullo sfruttamento dei prodotti agricoli al fine di preservare l'ambiente naturale. Secondo la Food and Agriculture Organization (FAO), circa un terzo del cibo generato annualmente viene sprecato per un totale di circa 1.3 miliardi di tonnellate. Secondo il 2021 World Economic Forum, nel 2019 sono state prodotte circa 9.3 milioni di tonnellate di rifiuti, di cui il 61 % generato dalle famiglie e il 26 % generato dalle industrie di trasformazione alimentare. L'utilizzo di biomasse e acque reflue, come materie prime per la generazione di energia, può essere vista come gestione dei rifiuti in modo sostenibile. In particolare, i rifiuti alimentari sono dei materiali di scarto emergenti con un elevato contenuto organico biodegradabile, il quale può essere sfruttato da microrganismi anaerobi per la produzione di idrogeno biologico. I rifiuti alimentari sono ricchi in amido,

il quale è un polisaccaride che può essere idrolizzato a monosaccaridi, come glucosio e maltosio, tramite idrolisi acida o idrolisi biologica (o enzimatica). Esistono varie tipologie di rifiuti alimentari. In genere, le industrie alimentari generano una quantità di rifiuti enorme a causa delle fasi di imballaggio, conservazione e lavorazione inadeguate. La maggior parte degli scarti viene generata dal consumatore finale. Le caratteristiche chimico-fisiche dei rifiuti alimentari dipendono principalmente dal processo di generazione, dall'età dei rifiuti, dalla stagione e dal contenuto di liquidi. I paesi sviluppati generano un'enorme quantità di rifiuti, mentre i paesi in via di sviluppo ne producono una quantità inferiore. La gestione inadeguata di questi scarti e le leggi poco specifiche, in termine di protezione ambientale, sono le ragioni principali della generazione di scarti alimentari. Paesi in via di sviluppo, come Cina e India, contribuiscono alla loro generazione a causa dell'elevata popolazione, della cattiva gestione, delle tecniche di raccolta inadeguate e della mancanza di adeguate infrastrutture di stoccaggio, lavorazione e confezionamento. Il compostaggio domestico potrebbe aiutare, ma solo in piccola parte. La maggioranza dei rifiuti tende a essere smaltita nelle discariche. Lo smaltimento a lungo termine dei rifiuti solidi in discarica rilascia gas e inquinanti tossici che causano gravi danni, inquinando l'aria, le falde acquifere e il suolo. Quantità abbondanti di gas serra, come metano e anidride carbonica vengono rilasciati nell'atmosfera. Metodi biotecnologici come la digestione anaerobica, *dark fermentation* e foto-fermentazione favoriscono la tutela dell'ambiente attraverso la stabilizzazione dei rifiuti alimentari (Mohanakrishna et al., 2023). Nella figura 3.2 si riporta uno schema riassuntivo delle caratteristiche chimico – fisiche dei rifiuti alimentari.

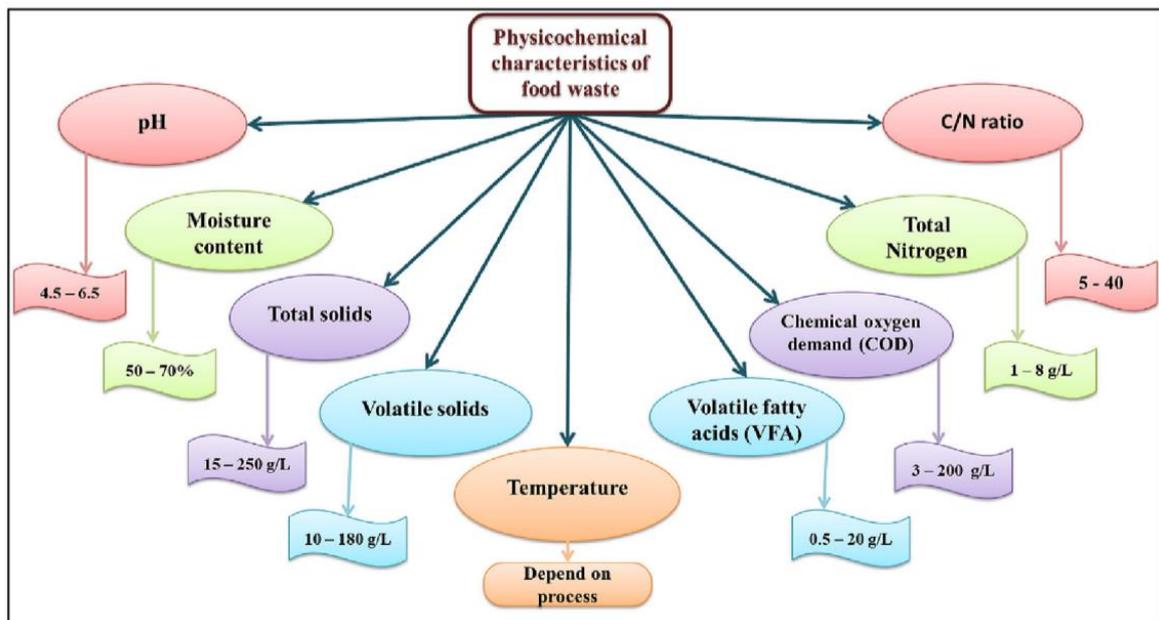


Figura 3.2 – Caratteristiche chimico-fisiche dei rifiuti alimentari tratta da Mohanakrishna et al. (2023).

I rifiuti alimentari, per essere utilizzati dai microrganismi durante il processo di fermentazione o altri processi biologici, devono essere pretrattati attraverso metodi specifici. In questo modo può avvenire l'idrolisi di carboidrati complessi generando zuccheri più semplici, i quali possono essere più facilmente degradati dai microrganismi (Mohanakrishna et al., 2023).

3.2. Pretrattamento dei rifiuti alimentari

Le tecnologie di pretrattamento comuni per le materie prime utilizzate per la produzione di bioidrogeno includono metodi fisici, meccanici, chimico-fisici, chimici e biologici (Rajesh Banu et al., 2020) come riportato in *figura 3.3*.

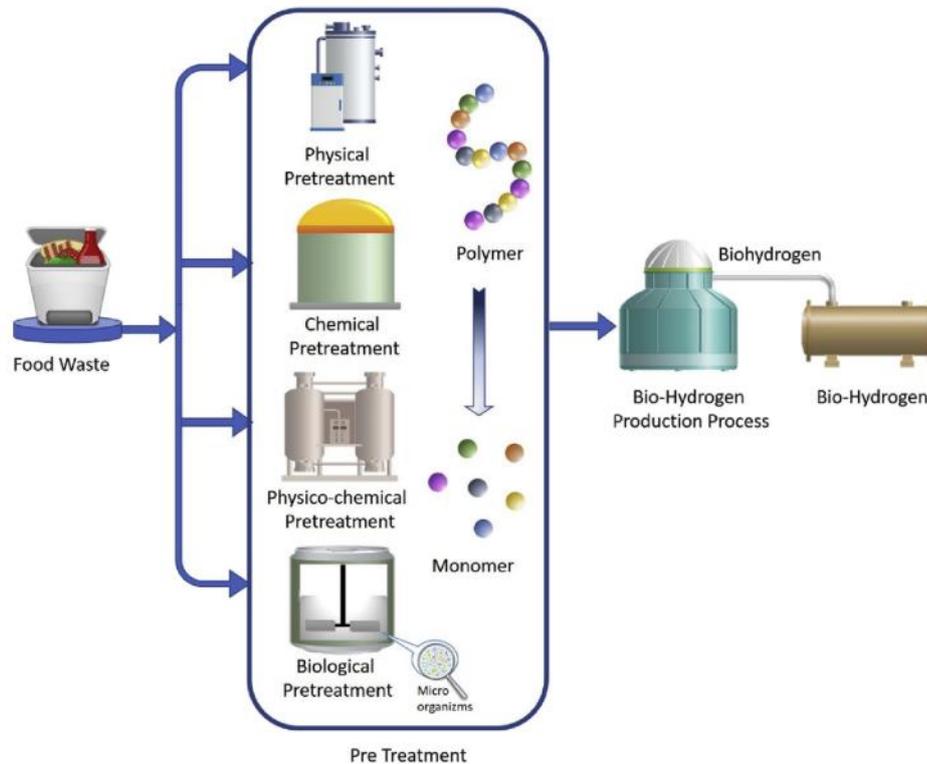


Figura 3.3 – Pretrattamenti per i rifiuti alimentari tratta da (Rajesh Banu et al., 2020)

- Pretrattamento termico: induce la decomposizione della biomassa e può essere di due tipologie, in funzione della temperatura: a bassa temperatura, utilizzando temperature minori o uguali di 100 °C; ad alta temperatura, utilizzando temperature superiori ai 100 °C. Ad alte temperature, la maggior parte degli zuccheri presenti nella biomassa viene solubilizzata. Il trattamento permette anche di rimuovere i microrganismi controproducenti presenti nel substrato alimentare, in quanto potrebbero ridurre la produzione di biogas durante i processi biologici di *dark fermentation* e digestione anaerobica (Rajesh Banu et al., 2020).
- Pretrattamento con microonde: le microonde vengono assorbite dai componenti intracellulari della biomassa, i quali iniziano a vibrare generando un calore disintegrando la parete cellulare. Questa tipologia di pretrattamento fornisce un riscaldamento più uniforme rispetto ai metodi convenzionali e solubilizza più biopolimeri (Rajesh Banu et al., 2020).
- Pretrattamento con ultrasuoni: induce la formazione di migliaia di bolle di vuoto per effetto della pressione, le quali collassano nella soluzione mediante cavitazione. Questo fenomeno provoca una forte vibrazione che genera una grande quantità di energia. Le onde sonore generano una quantità di calore tale da rompere le pareti cellulari dei rifiuti alimentari (Rajesh Banu et al., 2020).
- Pretrattamento con acqua calda compressa: prevede l'uso di acqua mantenuta a temperature elevate (sopra i 180 °C) sotto pressione. In queste condizioni, l'acqua può raggiungere il punto critico, dove le fasi liquida e gassosa diventano indistinguibili. Può essere utilizzato per idrolizzare i componenti ligno-cellulosici nei rifiuti alimentari. È un metodo promettente

per l'idrolisi dei polisaccaridi, che genera anche prodotti di degradazione, i quali possono influenzare l'attività batterica (Rajesh Banu et al., 2020).

- Pretrattamento in autoclave: metodo di sterilizzazione utilizzato da molti anni, che prevede lo sviluppo di vapore in un recipiente sotto pressione. Il pretrattamento termico prevede l'uso di vapore ad alta pressione. In generale, le condizioni operative dipendono dalla quantità di rifiuti immessa. Per scarti alimentari, la temperatura può variare da 121 a 127 °C per un'ora. Permette l'idrolisi dell'emicellulosa e della cellulosa. Genera un aumento nel contenuto di carbonio e, conseguentemente, incrementa il rapporto carbonio – azoto del substrato. È considerato un metodo ideale, in quanto offre numerosi vantaggi rispetto ad altri metodi, come l'assenza di sostanze chimiche o la possibilità di preservare i nutrienti presenti nei rifiuti (Rajesh Banu et al., 2020).
- Pretrattamento acido: i composti maggiormente utilizzati per questa tipologia di trattamento sono l'acido cloridrico, l'acido solforico, il perossido d'idrogeno e l'acido acetico. Grazie a questo metodo, i composti complessi possono essere decomposti in composti più semplici. In questo modo, migliora la solubilizzazione del substrato e la velocità di idrolisi (Rajesh Banu et al., 2020).
- Pretrattamento basico: i composti maggiormente utilizzati nei pretrattamenti alcalini sono l'ammoniaca acquosa, l'idrossido di sodio, l'idrossido di potassio, l'idrossido di calcio e l'idrossido di magnesio. L'uso di questi composti genera un rigonfiamento della biomassa, ottenendo un aumento della superficie interna con conseguente riduzione del grado di polimerizzazione. Pertanto, il processo è in grado di rompere la struttura della lignina e i legami glicosidici dei carboidrati presenti nella biomassa (Rajesh Banu et al., 2020).
- Pretrattamento biologico: tale processo prevede un tempo di ritenzione maggiore in quanto sono coinvolti microrganismi in grado di decomporre i carboidrati presenti nella biomassa. È necessario mantenere una coltura pura di batteri, ottimizzando le loro condizioni di crescita. Utilizzare microrganismi può generare una competizione con i microrganismi nativi per le fonti di carbonio presenti. Lo svantaggio di questo pretrattamento è la necessità di un sistema di controllo molto restrittivo sul processo. L'aerazione è un metodo alternativo che può essere accoppiato ad una degradazione biologica e migliorarne la velocità di idrolisi anche di substrati recalcitranti attraverso la mobilitazione degli enzimi. Questo metodo può modificare le caratteristiche chimico-fisiche e biologiche dei rifiuti, ma la buona riuscita del processo dipende dall'ottimizzazione delle condizioni biologiche (Rajesh Banu et al., 2020).
- Pretrattamento enzimatico: è una valida alternativa ai metodi fisici e chimici, i quali possono richiedere molta energia, l'utilizzo di prodotti chimici aggressivi o condizioni operative rigorose, che possono portare a formazione di sottoprodotti tossici. Si utilizzano enzimi in grado di decomporre la lignina e le emicellulose nella biomassa. Si possono utilizzare enzimi in forma pura o microrganismi, in grado di secernere l'enzima specifico durante il processo fermentativo. È fondamentale mantenere le condizioni operative ottimali. Non sono richieste condizioni di trattamento particolari e non è un metodo che rilascia sottoprodotti tossici. È un processo lento e costoso rispetto ai metodi tradizionali. L'aggiunta dei microrganismi è preferibile dal punto di vista economico, mentre l'uso di enzimi puri comporta una spesa importante, pari al 25 % del costo totale del processo (Rajesh Banu et al., 2020).

4. Metodi per la produzione di idrogeno da biomassa

L'idrogeno può essere prodotto a partire da diverse materie prime, come biomassa, combustibili fossili e acqua. Una produzione sostenibile di idrogeno può diventare possibile utilizzando materie prime rinnovabili. In particolare, la biomassa è la fonte di energia rinnovabile più significativa al mondo. I metodi che utilizzano biomassa come materia prima sono la gassificazione, *dark fermentation*, *biogas reformation*, foto-fermentazione e cella di elettrolisi microbica (Yagmur Goren et al., 2023).

4.1. Gassificazione

La gassificazione è la conversione della biomassa di scarto in prodotto ad alto livello energetico, utilizzando un processo ad alta temperatura (500 – 1400 °C).

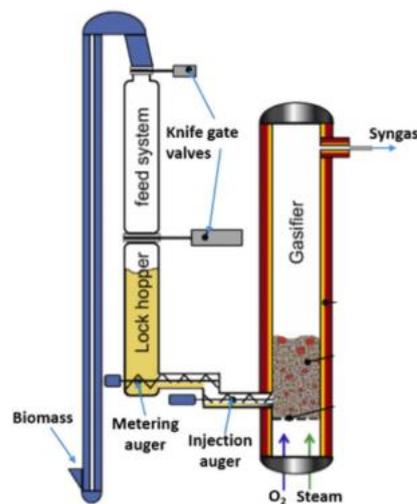


Figura 4.1 – Sistema di gassificazione tratto da (Yagmur Goren et al., 2023)

La gassificazione della biomassa prevede la conversione della materia prima in idrogeno, monossido di carbonio, metano, anidride carbonica e idrocarburi ad alte temperature, utilizzando il vapore acqueo come agente di gassificazione. La temperatura e il rapporto biomassa – vapore sono i parametri operativi più importanti, in quanto influenzano il contenuto di idrogeno nel gas prodotto. Le principali reazioni del processo sono la gassificazione del carbonio, water-gas shift, reforming del metano e idrocarburi, le quali sono rispettivamente le reazioni 4.1, 4.2, 4.3, 4.4:



La gassificazione presenta i seguenti svantaggi: impossibilità di utilizzo di biomassa ad elevato contenuto di umidità, richiesta di spazio, impatto ambientale negativo, tempo di avviamento lungo, sensibilità alla formazione di scorie, breve vita dei componenti, elevato livello di calore sensibile nel gas prodotto (Yagmur Goren et al., 2023).

4.2. Biogas reformation

Biogas reformation è un metodo di produzione di idrogeno in cui la biomassa viene alimentata a un essiccatore per eliminare il contenuto di umidità, per poi essere trasferita a un processo di pirolisi per la decomposizione in bio-olio, carbone e gas. I sottoprodotti vengono immessi in un gassificatore per generare syngas. Dopo il raffreddamento e la compressione, il gas prodotto viene trasferito in un serbatoio di stoccaggio per una ulteriore lavorazione. In questo processo il syngas reagisce con il vapore caldo, per produrre un gas che contiene una notevole quantità di idrogeno. I processi sono endotermici e richiedono un apporto di calore.

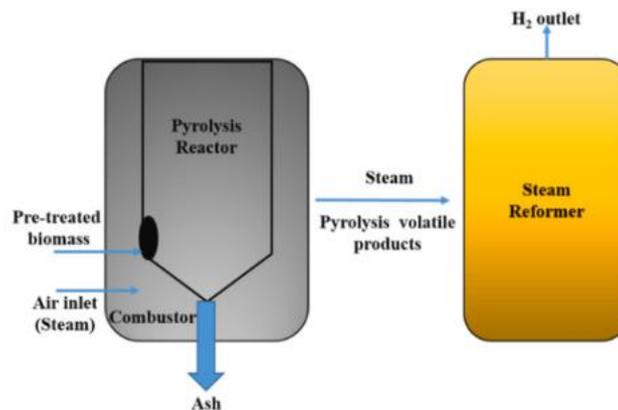


Figura 4.2 – Schema di biogas reformation tratto da (Yagmur Goren et al., 2023)

Il metodo permette di ottenere la massima resa di idrogeno, mantenere la stabilità durante l'operazione, utilizzare l'anidride carbonica, non impiegare ossigeno e lavorare a una temperatura operativa bassa. Tuttavia, presenta alcuni svantaggi: richiesta di calore continua; emissioni atmosferiche elevate; formazione elevata di materiale a base carboniosa; complessità del sistema (Yagmur Goren et al., 2023).

4.3. Foto-fermentazione

La foto-fermentazione è un metodo che funziona efficacemente in condizioni anaerobiche e in presenza di luce. I batteri fotosintetici possono convertire acidi organici in bioidrogeno e anidride carbonica. L'enzima principale utilizzato dai batteri fotosintetici è la nitratosi e la sua sintesi è promossa in presenza di luce. Le reazioni di produzione foto-fermentativa di idrogeno da parte dei batteri fotosintetici possono essere descritte dalle reazioni 4.5 e 4.6:



Il processo trasforma efficacemente i composti organici in idrogeno, con un tasso di conversione e rese molto elevate. Tuttavia, questo processo presenta tre limiti: utilizzo dell'enzima nitratosi, che ha un elevato fabbisogno energetico; bassa efficienza di conversione della luce; necessità di fotobioreattori complessi. Conseguentemente, il processo non è economicamente sostenibile (Yagmur Goren et al., 2023).

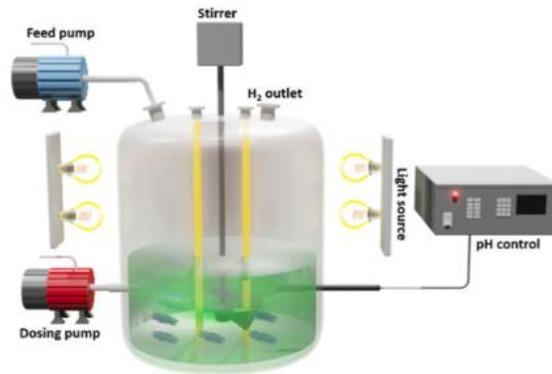


Figura 4.3 – Rappresentazione fotobioreattore anaerobico tratta da (Yagmur Goren et al., 2023)

4.4. Cella di elettrolisi microbica

La cella di elettrolisi microbica è costituita dai compartimenti anodo – desalificazione e desalinificazione – catodo, che sono separati rispettivamente da una membrana a scambio anionico e da una membrana a scambio cationico. La materia organica viene convertita in anidride carbonica, elettroni e ioni idrogeno da microrganismi elettro-chimicamente attivi che si formano sulla superficie dell’anodo. Gli ioni idrogeno, che diffondono dalla cella anodica alla cella catodica, si ricombinano con gli elettroni, i quali passano dal circuito elettrico per generare idrogeno molecolare. I microrganismi sul catodo possono ridurre gli ioni idrogeno sulla superficie dell’elettrodo attraverso idrogenasi o citocromi della membrana esterna. Le reazioni che avvengono all’anodo e al catodo sono rispettivamente le reazioni 4.7 e 4.8:

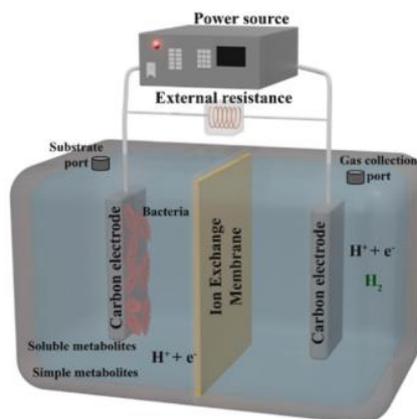
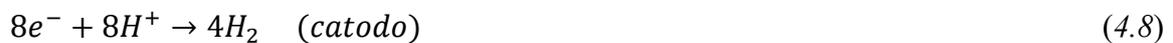
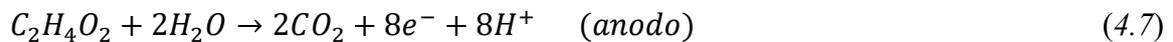


Figura 4.4 – Cella di elettrolisi microbica tratta da (Yagmur Goren et al., 2023)

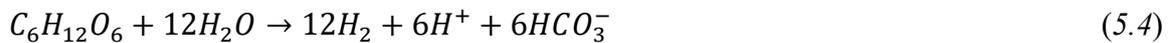
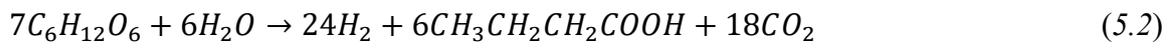
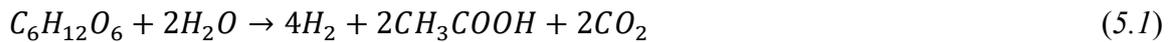
È un metodo che non produce inquinanti e presenta elevate prestazioni di rimozione del COD, elevato recupero di idrogeno e zero emissioni. Tuttavia, prevede un’elevata degradazione della biomassa, un elevato costo, una bassa purezza dell’idrogeno e problemi di stabilità (Yagmur Goren et al., 2023).

5. Dark fermentation

L'idrogeno è un vettore energetico efficiente che non emette inquinanti quando viene consumato, e può essere generato da biomasse. La produzione di bioidrogeno mediante fermentazione viene comunemente chiamata *dark fermentation*. È un metodo promettente ed efficace per la conversione di biomassa, con un rapporto energetico netto di 1.9. Inoltre, è uno dei metodi biotecnologici meglio compresi. La materia prima viene convertita in idrogeno grazie a microrganismi anaerobi in assenza di luce (Yagmur Goren et al., 2023).

5.1. Descrizione del processo

La *dark fermentation* è un processo biologico, in cui la biomassa viene parzialmente convertita in idrogeno da microrganismi anaerobi. I due enzimi fondamentali per il processo sono le idrogenasi Fe-Fe e Ni-Fe. Le Ni-Fe idrogenasi facilitano prevalentemente l'ossidazione dell'idrogeno molecolare, mentre le Fe-Fe idrogenasi sono più attive nella sua produzione. Generalmente, possono essere usati diversi composti organici come substrato (carboidrati, zuccheri, proteine e lipidi), ma la reazione di biotrasformazione del glucosio in acetato è considerata uno standard per la stima della resa teorica di idrogeno fermentativo. Durante la fermentazione, le reazioni di produzione di idrogeno da glucosio sono rispettivamente le reazioni 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4:



La quantità di idrogeno prodotto viene ridotta dalla formazione di numerosi sottoprodotti finali, tra cui acido acetico, acido butirrico, acido propionico, butanolo e metanolo. È stato riportato che la miscela di diverse sostanze chimiche, come sottoprodotto finale, riduce la resa di produzione a 1 – 2,5 moli di idrogeno per mole di glucosio. Inoltre, la resa può variare in funzione di numerosi parametri operativi, come la temperatura, la tipologia di biomassa, la tipologia di inoculo, la velocità di miscelazione, il pH e il design del reattore (Yagmur Goren et al., 2023). La *dark fermentation* è simile alla digestione anaerobica, in particolare consiste nelle prime tre fasi: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi. La digestione anaerobica comprende anche la fase di metanogenesi ed è considerato uno dei processi più efficaci per il trattamento dei rifiuti e per la produzione di energia.

Il processo di *dark fermentation* viene condotto utilizzando un consorzio di microrganismi anaerobi. Per produrre prodotti acidogeni, le attività sintrofiche dei microrganismi in questo processo sono fondamentali, in quanto permettono di degradare la materia organica in idrogeno e altri prodotti della fase acidogena inoltre, il trasferimento interspecie di massa ed elettroni diventa un meccanismo chiave per la produzione di idrogeno e acidi grassi. È fondamentale sopprimere nella coltura microbica iniziale i microrganismi metanigeni, al fine di avere solo microrganismi produttori di idrogeno. Diverse tipologie di materia organica possono essere convertite attraverso percorsi differenti, e con vari rendimenti energetici. La tipologia di rifiuto utilizzato come substrato gioca un ruolo chiave nel determinare la via metabolica per la sua decomposizione. Teoricamente, si possono

produrre 2 – 4 moli di idrogeno per una mole di esoso. La combinazione della *dark fermentation* con altri processi, insieme all'ottimizzazione delle condizioni operative, sono la base per le future ricerche per cercare di incrementare la resa di idrogeno e la sostenibilità del processo (Hosseinzadeh et al., 2022).

I principali produttori di bioidrogeno sono divisi in tre gruppi: anaerobi obbligati sporigeni (produttori principali), anaerobi obbligati non sporigeni (funzionamento ausiliario) e anaerobi facoltativi. Il produttore più efficiente è *Clostridium sp.*, che fa parte della prima categoria, e produce da 1.5 a 3 moli di idrogeno su una mole di esoso, ma è molto sensibile agli acidi (pH < 5). I metanigeni consumano idrogeno e anidride carbonica per produrre metano, influenzando la resa di idrogeno mentre la formazione dell'acido propionico necessita di idrogeno come reagente; conseguentemente, deve esserne inibita la formazione. In assenza di metanigeni, gli omoacetogeni svolgono il ruolo principale di consumo dell'idrogeno. La presenza di attività omoacetogenica può essere stimata dalla concentrazione di acetato nel sistema, sebbene possa essere fuorviata dalla simultaneità dell'attività dei metanigeni. Per eliminare questi consumatori di idrogeno è necessario utilizzare una serie di pretrattamenti per l'inoculo (Dahiya et al., 2021).

5.2. Pretrattamento dell'inoculo

L'inibizione dei microrganismi che consumano idrogeno, come metanigeni, omoacetogeni, batteri produttori di acido lattico, batteri produttori di acido propionico e riduttori di solfato, è uno dei passaggi principali per la produzione di idrogeno tramite *dark fermentation*. I metanigeni contribuiscono maggiormente al consumo di idrogeno, riducendone la resa. L'obiettivo principale è mantenere in vita i batteri produttori di idrogeno e sopprimere quelli che lo consumano. Le tecniche di pretrattamento sfruttano la capacità dei microrganismi produttori di idrogeno di sporificare in condizioni ambientali estreme di pH, temperatura, etc., mentre i consumatori, non essendo sporigeni, non resistono a condizioni estreme e vengono eliminati. I batteri che sporificano sono in grado di tornare nuovamente nella loro forma attiva, se le condizioni ambientali diventano nuovamente idonee (Rafieenia et al., 2018).

5.2.1. Pretrattamento termico

Il pretrattamento termico è il metodo più utilizzato per inibire i microrganismi consumatori di idrogeno in colture microbiche miste. I principali produttori presenti nelle comunità miste anaerobiche appartengono al genere *Clostridium spp.* e *Bacillus spp.*. I metanigeni sono molto sensibili al calore, mentre i produttori di idrogeno, sporificando, sono in grado di resistere alle alte temperature. La presenza dei batteri lattici non è favorita nel processo di fermentazione a causa della competizione con il substrato, e possono essere inattivati a temperature superiori a 50 °C. La durata del pretrattamento termico e la temperatura sono i due parametri fondamentali da ottimizzare. Tempi brevi o temperature basse potrebbero non essere efficaci per inibire la maggior parte dei consumatori di idrogeno, mentre tempi lunghi o temperature troppo elevate potrebbero generare una perdita di microrganismi produttori (Rafieenia et al., 2018). Lo studio condotto da Rafieenia et al., (2018) suggerisce un intervallo di temperatura ottimale tra 65 e 100 °C mentre l'intervallo di tempo ottimale varia tra i quindici minuti e le due ore.

5.2.2. Aerazione

I microrganismi metanigeni sono strettamente anaerobi. Conseguentemente, l'aerazione può inibire tutti i consumatori anaerobi di idrogeno, mentre i produttori sporificano in condizioni estreme per poi ripristinare la loro attività, tornati in condizioni anaerobiche.

Utilizzando questo pretrattamento la resa di idrogeno è ancora inferiore rispetto alla resa ottenuta utilizzando altri metodi. Inoltre, questo metodo è dispendioso in termini di tempo e potrebbe diventare problematico se fosse necessaria una ripetizione frequente. È sfavorevole economicamente, vista l'alta intensità energetica (Rafieenia et al., 2018).

5.2.3. Pretrattamento acido e basico

I batteri consumatori di idrogeno non sporigeni non sono resistenti a condizioni di pH estreme. Gli acidi più comunemente utilizzati sono l'acido cloridrico, l'acido perclorico, l'acido solforico e l'acido nitrico. Le basi più comuni sono l'idrossido di sodio e l'idrossido di potassio. Queste modalità di pretrattamento sono state ampiamente utilizzate per selezionare colture produttrici di idrogeno. Tuttavia, l'efficienza è ancora inferiore rispetto al pretrattamento termico e ha solo effetti a breve termine; conseguentemente, sono necessarie aggiunte ripetute di acido o base per la produzione continua, imponendo maggiori difficoltà al processo. Un inconveniente su larga scala potrebbe essere la necessità di aggiustare il pH a seguito del pretrattamento. Un aspetto da considerare nella progettazione del reattore è la compatibilità dei materiali rispetto al pH da utilizzare (Rafieenia et al., 2018).

5.2.4. Irradiazione

Esistono diverse tipologie di irradiazione impiegate come pretrattamento dell'inoculo: microonde, ultrasuoni, radiazioni gamma e infrarosse. Queste radiazioni creano un ambiente ostile in cui i batteri non sporigeni, principalmente consumatori di idrogeno, non sono in grado di sopravvivere.

L'irradiazione a ultrasuoni utilizza le onde sonore per creare condizioni di alta temperatura e alta pressione nel mezzo. In condizioni così estreme possono formarsi radicali reattivi che distruggono la parete cellulare degli organismi maggiormente sensibili.

L'irradiazione con microonde prevede l'utilizzo di onde elettromagnetiche con frequenze da 300 MHz a 300 GHz per generare attrito e calore nei liquidi polari, portando alla rottura della parete cellulare.

L'irradiazione gamma è una tecnologia ionizzante emergente che modifica le proprietà chimiche, fisiche e biologiche delle soluzioni acquose. Permette la reazione tra i radicali liberi e il DNA di specie non sporigene, portando alla rottura della parete cellulare.

L'infrarosso è una radiazione elettromagnetica con frequenze superiori alle microonde, che produce calore nell'ambiente, rompendo la parete cellulare degli organismi sensibili.

I metodi di irradiazione sono tecnologie emergenti. Tuttavia, dovrebbero essere eseguiti studi sulle analisi dei costi e dei benefici per calcolare se una maggiore resa di idrogeno può compensare il fabbisogno energetico necessario al pretrattamento (Rafieenia et al., 2018).

5.2.5. Inibizione chimica

È stato dimostrato che diverse sostanze chimiche sono in grado di inibire i microrganismi metanigeni. Conseguentemente, possono essere utilizzate per selezionare microrganismi produttori di idrogeno, aumentando la resa di produzione. Il bromoetanosolfonato (BES) è una sostanza chimica ampiamente utilizzata per sopprimere i metanigeni poiché è una sostanza analoga del coenzima-M, il quale è responsabile del trasferimento di un gruppo metilico nel metano nella fase finale della metanogenesi. La sua aggiunta può ostacolare il processo di formazione del metano ma è un metodo piuttosto costoso.

Il cloroformio mira a inibire il completamento della fase finale della metanogenesi, al pari del BES tramite la soppressione di metil-CoM riduttasi e, quindi, la riduzione del gruppo metilico di metil-CoM a metano. Non è in grado di inibire tutti i consumatori di idrogeno.

L'acetilene mira a interrompere il gradiente di ioni idrogeno nella membrana cellulare e riduce l'energia disponibile per la metanogenesi, inibendo la sintesi di adenosintrifosfato (ATP). È un composto economico per il pretrattamento dell'inoculo. I risultati riguardo l'inibizione dei metanigeni sono promettenti, ma è un composto infiammabile. L'inibizione chimica sembra essere un pretrattamento economicamente fattibile su larga scala, in quanto non richiede elevati requisiti energetici o costi eccessivi. Tuttavia, vi è la presenza di sostanze chimiche tossiche negli effluenti, che potrebbero causare seri problemi ecologici (Rafieenia et al., 2018).

5.2.6. Pretrattamento degli acidi grassi a catena lunga

Gli acidi grassi a catena lunga (LCFA) possono essere assorbiti dalla parete cellulare dei metanigeni, riducendone la permeabilità e limitando il trasporto di substrati solubili. Il loro assorbimento può anche distruggere la membrana mediante acidificazione e inibire la maggior parte delle reazioni enzimatiche nella cellula che non avvengono a pH inferiori a sette. Gli LCFA sono poco costosi rispetto agli inibitori chimici e non sono tossici per l'ambiente. Rispetto ad altri metodi, è richiesta meno energia ed è più sostenibile economicamente. Inoltre, sembra essere ripetibile durante la fermentazione. Il metodo è stato studiato poco; quindi, sarebbe interessante indagare l'effetto di questi acidi grassi sulla produzione di idrogeno a partire da rifiuti organici (Rafieenia et al., 2018).

5.3. Parametri di processo

La resa di bioidrogeno può variare in funzione di diversi parametri, tra cui la concentrazione di substrato, il rapporto carbonio – azoto del substrato, i microrganismi e le condizioni ambientali (temperatura, pH e tempo di ritenzione idraulica) (Zheng et al., 2022).

5.3.1. Temperatura

La crescita, il metabolismo e la produzione di idrogeno vengono effettuati tramite sotto enzimi intracellulari, i quali sono altamente sensibili alla temperatura. Le temperature influenzano la permeabilità delle membrane cellulari microbiche, interferendo anche con lo scambio di nutrienti. Inoltre, influenzano le vie metaboliche dei microrganismi. I vari studi sulla produzione di bioidrogeno sono condotti utilizzando tre regimi di temperatura:

- Fermentazione mesofila (25 – 40 °C).
- Fermentazione termofila (65 – 80 °C).
- Fermentazione ipertermofila (> 80 °C).

È stato scoperto che, quando batteri misti producono bioidrogeno utilizzando xilosio come substrato, due picchi compaiono a 35 e 55 °C. A temperature comprese tra 35 e 60 °C, i principali metaboliti sono l'acido acetico e l'acido butirrico. Infine, a 65 °C il principale sottoprodotto è l'etanolo. I risultati dell'identificazione dei batteri, dominanti a differenti temperature, hanno mostrato che per temperature mesofile il principale batterio produttore è *Clostridium*, mentre a 45-60 °C il batterio principale è *Thermoanaero*. Invece, a 65 °C esistono entrambi i generi batterici (Zheng et al., 2022).

5.3.2. pH

I principali effetti del pH sulla produzione di idrogeno riguardano tre aspetti:

- Il pH influenza la fluidità della membrana cellulare microbica, le caratteristiche delle proteine sulla membrana e la carica superficiale, nonché l'attività enzimatica nelle cellule e nel substrato.

- I cambiamenti di pH influenzano la ionizzazione molecolare e l'equilibrio idrolitico nel materiale che fermenta, nonché le concentrazioni di vari ioni nell'ambiente di crescita dei microrganismi.
- Quando il pH cambia, il percorso attraverso il quale i microrganismi metabolizzano la fonte di carbonio varia producendo diversi acidi organici metabolici a seconda del caso che influenzano così le prestazioni della produzione di bioidrogeno.
I microrganismi possono essere suddivisi in acidofili (pH compreso tra 1 e 5.5), batteri neutrofilici (pH compreso tra 5.5 e 8.5) e batteri basofili (pH compreso tra 8.5 e 11.5). Il pH ottimale per una buona produzione dipende dal tipo di substrato e dal ceppo da cui derivano i microrganismi scelti (Zheng et al., 2022).

5.3.3. Umidità

L'umidità del substrato è un parametro fondamentale per definire le caratteristiche di un processo biologico. In funzione del contenuto di solidi totali, si possono definire tre tipologie di processo:

- Processo a umido per un contenuto di solidi totali inferiore al 10 %.
- Processo semisecco per un contenuto di solidi totali compreso tra il 10 e il 20 %.
- Processo a secco per un contenuto di solidi totali superiore al 20 %.

In genere, la gestione dei processi a secco risulta difficoltosa per l'elevato contenuto di solidi totali (Abbassi-Guendouz et al., 2012).

5.3.4. Tempo di ritenzione idraulica

Il tempo di ritenzione idraulica è il tempo medio di permanenza del substrato nel reattore. Un tempo troppo breve potrebbe causare problemi, ad esempio l'utilizzo insufficiente del substrato da parte dei microrganismi e la loro forte diluizione, che possono determinare una diminuzione della resa di processo. Allo stesso tempo, un tempo eccessivamente lungo potrebbe causare l'inibizione dei metaboliti microbici e la ridotta attività dei microrganismi produttori, diminuendo le prestazioni di produzione del reattore (Zheng et al., 2022).

5.3.5. Ioni metallici

Gli ioni metallici hanno effetti importanti sui microrganismi:

- Partecipano alla composizione dei materiali della struttura cellulare, al trasferimento di energia, al mantenimento dello stato colloidale protoplasmatico e al controllo della penetrazione cellulare.
- Possono agire come attivatori per aumentare l'attività enzimatica.
- Svolgono un ruolo nel trasporto di gruppi acilici, gruppi funzionali coinvolti in reazioni redox e cofattori.

Il Fe^{2+} e Ni^{2+} sono i componenti principali del sito attivo dell'idrogenasi. Gli ioni Mg^{2+} trasportano l'adenosintrifosfato (ATP) nella cellula e sono anche componente attiva di molti enzimi. Lo Zn^{2+} e Mn^{2+} hanno molteplici funzioni nella produzione di idrogeno. Il ferro ha maggiore influenza nel promuovere la produzione di idrogeno rispetto agli altri ioni, perché è un componente del centro enzimatico attivo nel processo di produzione. Gli ioni metallici, come quelli di ZnSO_4 , CuSO_4 , CoCl_2 , CaCl_2 , Fe^0 e FeSO_4 , miscelati nel sistema di fermentazione, in determinate proporzioni, promuovono la produzione di idrogeno. In questo modo la resa risulterebbe superiore rispetto all'utilizzo di un singolo elemento metallico. Gli ioni di dimensione nanometriche hanno buona conduttività elettrica e possono essere utilizzati come trasportatori per il trasferimento di elettroni nel processo metabolico (Zheng et al., 2022).

5.3.6. Design del bioreattore

La progettazione del bioreattore ha un'influenza significativa sulla produzione di bioidrogeno. Studi recenti hanno indagato il potenziale di fermentazione su scala di laboratorio, utilizzando sistemi batch, continui o semicontinui. I microrganismi in un serbatoio batch sono statici, mentre in un bioreattore agitato possono essere miscelati uniformemente con i substrati. Tuttavia, persistono bassi tassi di fermentazione, in quanto gli sforzi di taglio dovuti all'agitazione possono rompere le cellule. Un reattore con microrganismi immobilizzati, rispetto a un bioreattore sospeso, necessita dell'aggiunta di un materiale per l'immobilizzazione e presenterà molte cellule per unità di volume, un processo di produzione stabile, un tasso di ritenzione più elevato, una forte adattabilità all'ambiente ed elevata attività metabolica. In generale, si possono avere bioreattori a letto impaccato e bioreattori a biofilm in base alla posizione di attacco delle cellule sui trasportatori. Un bioreattore a letto impaccato separa le cellule microbiche dal mezzo di coltura, accumulando i microrganismi nella cavità del bioreattore. Tuttavia, l'adesione di microrganismi riduce il tasso di utilità della luce e il tasso metabolico. Inoltre, alcuni materiali granulari sono suscettibili alla deformazione. L'applicazione industriale su larga scala è difficoltosa. Invece, i bioreattori a biofilm immobilizzano i microrganismi su una superficie portante. I bioreattori a colonne e a piastre sono le tipologie più utilizzate. I biofilm forniscono un'ampia area, aumentando la biomassa nel reattore e il tasso di produzione di idrogeno. Migliorano l'efficienza di utilizzo della luce e riducono la resistenza al trasferimento di massa. Per ottenere elevate produzioni, la struttura deve essere ragionevolmente progettata (Zheng et al., 2022).

5.4. Digestione anaerobica a doppio stadio

Durante la *dark fermentation*, i prodotti co-generati e il substrato non utilizzato non vengono riciclati dopo il processo iniziale. L'integrazione di un processo di produzione di idrogeno con un altro processo potrebbe massimizzare la sintesi del prodotto e il recupero delle risorse, utilizzando i residui per un'ulteriore conversione dell'energia e raffinazione dei sottoprodotti (Dahiya et al., 2021). Lo sviluppo di un modello di bioraffineria integrato e sostenibile, in grado di utilizzare i flussi di rifiuti per la produzione di prodotti commercialmente importanti, è un'alternativa ecocompatibile e sostenibile per la gestione olistica dei rifiuti. Gli acidi grassi volatili prodotti dall'acidogenesi possono fungere da substrati per la produzione di alcoli, bioplastiche, elettricità e molto altro. L'anidride carbonica può essere catturata. Il substrato non utilizzato può essere riutilizzato come materia prima per altre coltivazioni. Dopo l'estrazione dei prodotti primari, anche la biomassa può essere riutilizzata per la sintesi di prodotti secondari. In generale, la bioraffineria a circuito chiuso migliora l'applicabilità, la fattibilità economica, garantisce la sicurezza dei materiali e la sostenibilità ambientale per creare una piattaforma ecologica e sostenibile per la produzione di biocarburanti e prodotti chimici di base (Dahiya et al., 2021). Nella *figura 5.1* si possono osservare le varie applicazioni per cui possono essere utilizzati i vari sottoprodotti biologici per rispettare i principi di economia circolare. Il processo fermentativo ha una buona capacità bioenergetica, ma vi sono una serie di restrizioni che ne rendono difficile l'esecuzione. Di conseguenza, la combinazione del processo con la digestione anaerobica, in un processo in due fasi, sembra essere l'alternativa finanziariamente più efficace per un dispiegamento su larga scala (Senthil Rathi et al., 2022).

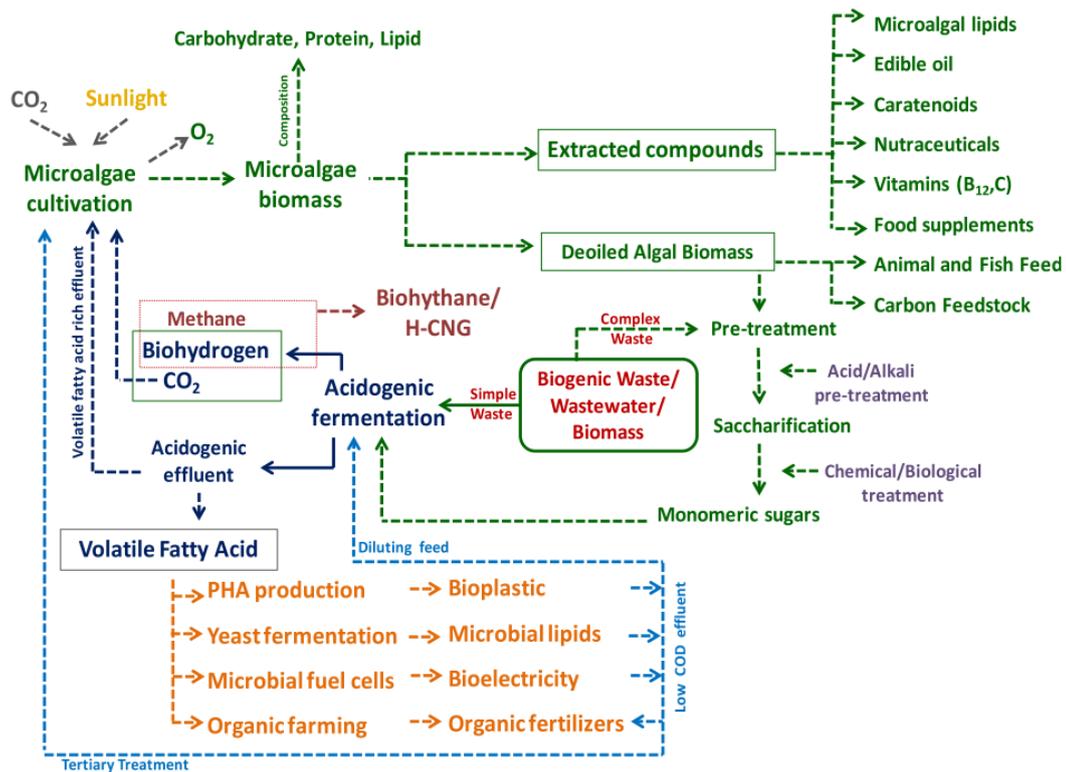


Figura 5.1 – Rappresentazione dell'utilizzo dei prodotti di fermentazione per ottenimento di una economia circolare tratta da (Dahiya et al., 2021)

Nella digestione anaerobica la fase limitante è l'idrolisi di substrati complessi. Una possibilità per superare questa difficoltà è la divisione del processo in due fasi. In questo modo, l'idrolisi, l'acidogenesi e acetogenesi vengono eseguite durante il primo stadio (primo reattore), mentre la metanogenesi avviene nel secondo stadio (secondo reattore). Questo comporta un aumento del tasso di carico organico e la riduzione del tempo di ritenzione idraulica, così da ottenere un miglioramento delle prestazioni di questi reattori (Micolucci et al., 2018). Lo studio di Siddique et al. (2019) presenta un processo a due fasi, dedicato alla co-fermentazione di rifiuti alimentari e acque reflue petrolchimiche, che potesse combinare i vantaggi delle procedure tradizionali con l'elevata produttività dei digestori multifase. Pertanto, è stato stabilito un processo continuo, tale che l'effluente della prima fase acidogena fosse introdotta nel digestore. La co-digestione anaerobica in doppio stadio permette di ottenere una produzione di metano più elevata rispetto a quando i due substrati vengono digeriti indipendentemente. Inoltre, è stata rilevata una maggiore efficacia del processo a due fasi rispetto al processo a singolo stadio nel trattamento dei rifiuti. Nello studio di Micolucci et al. (2018) viene mostrato come la digestione anaerobica di un substrato organico, con contenuto di COD pari a 1.0 g/L, potrebbe essere utilizzata sia in singolo che in doppio stadio. I sistemi hanno mostrato elevate rese di biogas, ma sono emersi problemi riguardo la possibile prevenzione delle instabilità. L'efficienza complessiva del doppio stadio è stata del 16 % superiore rispetto al sistema a stadio singolo. L'implementazione di stadi separati è un approccio che garantisce significativi miglioramenti.

6. Materiali e metodi

6.1. Obiettivo dell'esperimento

L'attività di tesi è stata suddivisa in tre campagne sperimentali:

- La prima campagna sperimentale è finalizzata a studiare e ottimizzare l'inoculo.
- La seconda campagna sperimentale ha focalizzato l'attenzione sulla produzione di idrogeno mediante *dark fermentation* di scarti agro-alimentari considerando la migliore configurazione di inoculo.
- La terza campagna sperimentale si è concentrata sulla digestione anaerobica a doppio stadio degli stessi scarti agro-alimentari.

6.2. Campagna sperimentale 1: ottimizzazione dell'inoculo

L'obiettivo principale della prima campagna sperimentale è la produzione di idrogeno mediante *dark fermentation* ad opera di microrganismi anaerobi. È stata testata la capacità dell'inoculo di produrre idrogeno nelle seguenti condizioni:

- In presenza di terreno di coltura o meno, al fine di verificarne l'utilità nel limitare la fase di latenza dei microrganismi valutando se l'inoculo necessita di nutrienti aggiuntivi.
- In presenza di zuccheri semplici, come il glucosio, o con zuccheri più complessi come il saccarosio, al fine di verificare la capacità di degradazione di substrati complessi dell'inoculo.
- Utilizzando un pretrattamento termico, al fine di verificare se il pretrattamento fosse funzionale all'eliminazione dei microrganismi metanigeni.

L'inoculo utilizzato, derivante dalla digestione di letame bovino, è stato caratterizzato mediante analisi dei solidi totali (ST %), analisi dei solidi volatili e analisi elementare. I valori ottenuti sono riportati in *tabella 6.1* e in *tabella 6.2*.

Tabella 6.1 – Solidi totali e solidi volatili su solidi totali dell'inoculo

	Solidi totali (ST %)	Solidi volatili su solidi totali (SV/ST %)
Inoculo	5.46	72.73

Tabella 6.2 – Composizione elementare dell'inoculo

	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
Inoculo	3.18	37.43	5.17	0.44	53.78	11.85

Il terreno di coltura utilizzato è composto da soluzioni di calcio, di fosfati, di metalli ed estratto di lievito. È stato aggiunto 1 mL di ogni soluzione in ogni reattore batch. Inoltre, sono stati aggiunti lo zucchero e l'ammonio. Lo zucchero è stato aggiunto con una concentrazione di glucosio al 5 % rispetto a 100 mL di soluzione. La concentrazione dell'ammonio aggiunto è pari a 2.5 g/L.

Il set – up dell'esperimento prevede l'utilizzo di otto configurazioni differenti, lavorando in duplice copia. Il processo è stato condotto, impostando un valore di 6 % per i solidi totali alimentati. In *figura 6.1* si possono osservare le sedici configurazioni della prima campagna sperimentale.

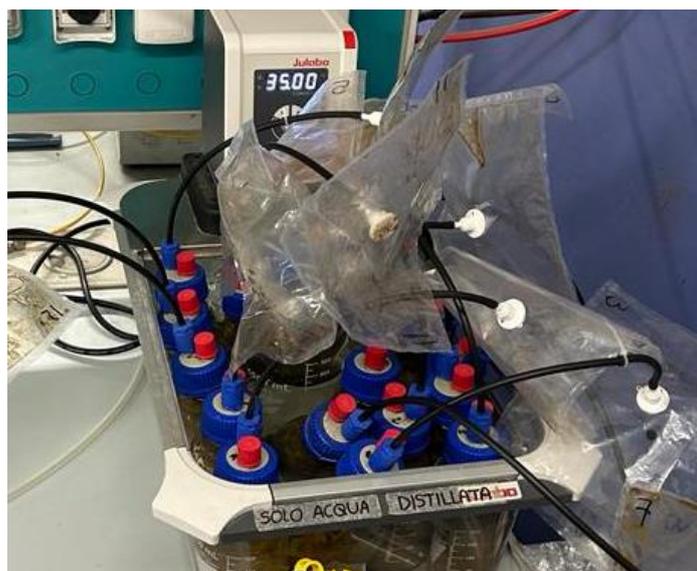


Figura 6.1 – Configurazioni prima campagna sperimentale

Si è lavorato con reattori da 250 mL e un 80 % di volume operativo, in maniera tale da lasciare libero uno spazio di testa per permettere la produzione di gas e la sua fuoriuscita dai tubi che lo conducono verso le sacche di raccolta. Per tutte le configurazioni, il volume operativo è pari al volume totale di inoculo. Per alcune configurazioni è stato effettuato il pretrattamento termico dell'inoculo a 60 °C per 30 minuti con lo scopo di eliminare i microrganismi metanigeni. Si è lavorato con sistemi batch e in condizioni anaerobiche, insufflando azoto per quarantacinque minuti all'interno dei reattori, per rimuovere ogni traccia possibile di ossigeno. Inoltre, si è lavorato in mesofilia (35°C), con un pH di lavoro iniziale pari a 8.5 e un tempo di residenza idraulico pari a nove giorni. In *tabella 6.3* si riportano le configurazioni utilizzate durante la prima campagna sperimentale.

Tabella 6.3 – Contenuto delle configurazioni della prima campagna sperimentale

Configurazione	Pretrattamento termico	Zucchero	Terreno di coltura
GLU	NO	Glucosio	NO
SACC	NO	Saccarosio	NO
GLUTERR	NO	Glucosio	SI
SACCTERR	NO	Saccarosio	SI
GLUTERM	SI	Glucosio	NO
GLUTERRTERM	SI	Glucosio	SI
SACCTERM	SI	Saccarosio	NO
SACCTERRTERM	SI	Saccarosio	SI

Le analisi effettuate durante la prima campagna sono state le seguenti: misurazione del volume del biogas prodotto tramite svuotamento delle sacche per la raccolta di gas, analisi al gas cromatografo del biogas prodotto e misurazione del pH prima e dopo la

fermentazione. Inoltre sono stati calcolati ST, SV ed è stata effettuata analisi elementare dei digestati. Le analisi citate sono descritte nel dettaglio nel *sottocapitolo 6.5*.

6.3. Campagna sperimentale 2: valorizzazione delle biomasse

L'obiettivo della seconda campagna sperimentale è valutare la capacità dell'inoculo di realizzare una *dark fermentation* su scarti di frutta e verdura e un residuo di acqua derivante dal lavaggio di apparecchiature di un'industria per la produzione di marmellata, utilizzando l'inoculo pretrattato a 60 °C per 30 minuti (come descritto nel *sottocapitolo 6.2*). I solidi totali, i solidi volatili e la composizione elementare dell'inoculo utilizzato si possono osservare in *tabella 6.1* e in *tabella 6.2*. In questo caso, è stato eseguito l'inspessimento dell'inoculo tramite centrifugazione, per realizzare il processo con una percentuale dei solidi totali pari a 6%, come nell'esperimento precedente. I valori dei solidi totali e solidi volatili dell'inoculo inspessito sono riportati nella *tabella 6.4*.

Tabella 6.4 – Solidi totali e solidi volatili su solidi totali dell'inoculo inspessito e non inspessito

	Solidi totali (ST %)	Solidi volatili su solidi totali (SV/ST %)
Inoculo inspessito	7.00	72.73

Le biomasse utilizzate sono rappresentate da un mix di scarti di frutta e verdura e un residuo di acqua di un impianto di produzione di marmellata (*acqua di mirtillo*). Gli scarti di frutta e verdura sono stati pretrattati fisicamente attraverso l'uso di un frullatore elettrico. In questo modo, sono stati sminuzzati accuratamente al fine di essere più facilmente degradabili dai microrganismi. L'*acqua di mirtillo* è caratterizzata da una quantità di zuccheri pari a 7.7 g/L, in particolar modo fruttosio. La caratterizzazione di entrambi i substrati è stata effettuata mediante analisi dei solidi totali, analisi dei solidi volatili e analisi elementare. In *tabella 6.5* si possono osservare i risultati delle analisi dei solidi totali e dei solidi volatili per le biomasse. In *tabella 6.6* si può osservare la loro composizione alimentare.

Tabella 6.5 – Solidi totali e solidi volatili su solidi totali delle biomasse utilizzate

	Solidi totali (ST %)	Solidi volatili su solidi totali (SV/ST %)
Scarti alimentari	7.00	93.00
<i>Acqua di mirtillo</i>	1.00	98.43

Tabella 6.6 – Composizione elementare delle biomasse utilizzate

	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
Scarti alimentari	1.41	44.97	4.51	0.38	48.74	45.68
<i>Acqua di mirtillo</i>	1.40	42.32	5.19	0.46	50.63	15.19

Il set – up dell'esperimento prevede l'utilizzo di otto configurazioni differenti, lavorando in duplice copia. Il processo è stato condotto, impostando un valore di 6 % per i solidi totali

alimentati. In *figura 6.2* si possono osservare i sedici reattori della seconda campagna sperimentale.



Figura 6.2 - Configurazioni seconda campagna sperimentale

Si è lavorato con reattori da 250 mL e un 80 % di volume operativo, in maniera tale da lasciare libero uno spazio di testa per permettere la produzione di gas e la sua fuoriuscita dai tubi che lo conducono verso le sacche di raccolta. Il processo è stato condotto in mesofilia (35 °C) e in anaerobiosi. Quindi, i sedici reattori sono stati insufflati con azoto per quarantacinque minuti al fine di rimuovere l'ossigeno al loro interno. Il tempo di residenza idraulico è pari a sette giorni. Il pH iniziale è pari a circa 6. Si è deciso di lavorare con due composizioni differenti di substrato, composto dall'*acqua di mirtillo* e da scarti alimentari:

- Scarti alimentari 95 % – *acqua di mirtillo* 5 % (mA)
- Scarti alimentari 85 % – *acqua di mirtillo* 15 % (mB)

Il rapporto substrato:inoculo utilizzato è pari a 1:1 ed è stato calcolato sulla base dei solidi volatili. Per ottenere la quantità di inoculo, substrato e saccarosio da alimentare al reattore sono state effettuate delle considerazioni sui solidi totali e sui solidi volatili alimentari. Il calcolo dei grammi di solidi totali da alimentare è stato eseguito con la *formula 6.1*:

$$ST_{alimentati} (g) = \frac{6\% * volume\ di\ lavoro}{100} = 12\ g \quad (6.1)$$

Basandoci sui solidi totali e solidi volatili presenti in *tabella 6.5* e fissato il valore dei solidi totali alimentari al reattore, è stata calcolata la massa totale dei solidi volatili da alimentare attraverso la *formula 6.2*:

$$\frac{ST_{alimentati} (g)}{\left(\frac{1}{\frac{SV}{ST} \% inoculo} + \frac{1}{\frac{SV}{ST} \% scarti\ alimentari} * \% scarti\ alimentari} + \frac{1}{\frac{SV}{ST} \% acqua\ di\ mirtillo} * \% acqua\ di\ mirtillo} \right)} = SV_{alimentati} (g) \quad (6.2)$$

Successivamente, sono stati calcolati i solidi volatili di scarti alimentari e *acqua di mirtillo* attraverso le *formule 6.3* e *6.4*, rispettivamente.

$$SV_{scarti\ alimentari} = SV_{alimentati} * \% scarti\ alimentari \quad (6.3)$$

$$SV_{acqua\ di\ mirtillo} = SV_{alimentati} * \% acqua\ di\ mirtillo \quad (6.4)$$

Lavorando con un rapporto biomassa:inoculo pari a 1:1, la quantità di solidi volatili dell'inoculo sarà pari alla massa di solidi volatili della biomassa complessiva, come mostrato nella *formula 6.5*.

$$SV_{inoculo} = SV_{acqua\ di\ mirtillo} + SV_{scarti\ alimentari} \quad (6.5)$$

Dalle *formule 6.6, 6.7 e 6.8* si possono calcolare le quantità in grammi di solidi totali di scarti alimentari, *acqua di mirtillo* e inoculo, rispettivamente.

$$ST_{scarti\ alimentari}(g) = \frac{SV_{scarti\ alimentari}}{\frac{SV}{ST}\%_{scarti\ alimentari}} \quad (6.6)$$

$$ST_{acqua\ di\ mirtillo}(g) = \frac{SV_{acqua\ di\ mirtillo}}{\frac{SV}{ST}\%_{acqua\ di\ mirtillo}} \quad (6.7)$$

$$ST_{inoculo}(g) = \frac{SV_{inoculo}}{\frac{SV}{ST}\%_{inoculo}} \quad (6.8)$$

La somma dei solidi totali di inoculo e biomasse deve essere pari a 12 grammi per rispettare il 6 % di solidi totali alimentati al reattore. Infine, è stato effettuato il calcolo della massa tal quale da alimentare al reattore come mostrato nelle *formule 6.9, 6.10 e 6.11*.

$$tal\ quale\ scarti\ alimentari\ (g) = \frac{ST_{scarti\ alimentari}}{ST\%_{scarti\ alimentari}} \quad (6.9)$$

$$tal\ quale\ acqua\ di\ mirtillo\ (g) = \frac{ST_{acqua\ di\ mirtillo}}{ST\%_{acqua\ di\ mirtillo}} \quad (6.10)$$

$$tal\ quale\ inoculo\ (g) = \frac{ST_{inoculo}}{ST\%_{inoculo}} \quad (6.11)$$

La somma dei valori del tal quale di inoculo, *acqua di mirtillo* e scarti alimentari è la quantità complessiva da alimentare al reattore. Per il calcolo della quantità di saccarosio da inserire, si è considerato la concentrazione di 7.7 g/L di zuccheri presenti all'interno dell'*acqua di mirtillo* e il tal quale da inserire nel reattore, ottenendo la massa corrispondente di monosaccaride da inserire (*formula 6.12*).

$$monosaccaride\ (g) = \frac{(tal\ quale\ acqua\ di\ mirtillo\ (g)) * 7,7\ g/L}{1000} \quad (6.12)$$

Per ottenere la quantità di saccarosio si è considerata metà della quantità di monosaccaride, in quanto si tratta di un disaccaride (*formula 6.13*).

$$disaccaride\ (g) = \frac{monosaccaride\ (g)}{2} \quad (6.13)$$

Le quantità di saccarosio alimentate sono le stesse che sono contenute nell'*acqua di mirtillo*, al 5 % e al 15 %. Si possono riassumere le configurazioni usate in quattro sottogruppi:

- Inoculo e saccarosio (al 5 % e al 15 %).
- Inoculo inspessito, scarti alimentari e saccarosio con rapporto substrato:inoculo 1:1.
- Inoculo inspessito e *acqua di mirtillo* (al 5 % e al 15 %).
- Inoculo inspessito, *acqua di mirtillo* e scarti alimentari, nelle composizioni *mA* e *mB*.

In *tabella 6.7* si riportano le configurazioni utilizzate durante la seconda campagna sperimentale.

Tabella 6.7 – Configurazioni della seconda campagna sperimentale

Configurazione	Inoculo	Inoculo inspessito	Scarti alimentari	Acqua di mirtillo	Saccarosio
SACCmA	SI	NO	NO	NO	SI
SACCmB	SI	NO	NO	NO	SI
MARMmA	NO	SI	NO	SI	NO
MARMmB	NO	SI	NO	SI	NO
ORTSACCmA	NO	SI	SI	NO	SI
ORTSACCmB	NO	SI	SI	NO	SI
ORTMARMmA	NO	SI	SI	SI	NO
ORTMARMmB	NO	SI	SI	SI	NO

Le analisi effettuate durante la seconda campagna sono state le seguenti: misurazione del volume del biogas prodotto tramite svuotamento delle sacche per la raccolta di gas, analisi al gas cromatografo del biogas prodotto e misurazione del pH prima e dopo la fermentazione. Inoltre sono stati calcolati ST, SV ed è stata effettuata analisi elementare dei digestati. . Le analisi citate sono descritte nel dettaglio nel *sottocapitolo 6.5*.

6.4. Campagna sperimentale 3: digestione anaerobica a doppio stadio

Nella terza campagna sperimentale è stata effettuata la digestione anaerobica a doppio stadio, testando diversi rapporti biomassa:inoculo e il pretrattamento termico del substrato, per valutare se migliorasse la sua degradabilità. Il primo stadio è una *dark fermentation* in cui è stato utilizzato il rapporto acqua di mirtillo:scarti alimentari che ha permesso la migliore resa nella seconda campagna sperimentale. Al termine del processo, viene utilizzato il digestato del primo stadio come substrato per il secondo stadio di digestione anaerobica, in cui si vuole produrre metano. L'obiettivo è valorizzare lo scarto del primo processo per la produzione di un composto ad alto valore.

Durante il primo stadio è stato utilizzato l'inoculo inspessito, con una percentuale di solidi totali e solidi volatili pari ai valori presenti in *tabella 6.4* e dalla composizione elementare presente in *tabella 6.2*. Per il secondo stadio è stato utilizzato l'inoculo non inspessito, di cui i valori delle percentuali di solidi totali e volatili sono riportati in *tabella 6.1* e la composizione elementare è presente in *tabella 6.2*. Le biomasse utilizzate come substrato per il primo stadio sono le stesse utilizzate nella seconda campagna sperimentale. I valori relativi ai solidi totali e solidi volatili si possono osservare in *tabella 6.5*, mentre la composizione elementare dei due substrati si può osservare in *tabella 6.6*. Sono stati testati due differenti rapporti biomassa:inoculo (2:1 e 1:1) e il pretrattamento della biomassa a 60 °C per 30 minuti.

Durante il secondo stadio la biomassa utilizzata è stato il residuo solido-liquido della *dark fermentation*, il quale è stato caratterizzato attraverso l'analisi dei solidi totali, dei solidi volatili e analisi elementare. I valori corrispondenti ai solidi totali e ai solidi volatili sono presenti in *tabella 6.8*, mentre i valori corrispondenti alla composizione elementare sono presenti in *tabella 6.9*.

Tabella 6.8 – Solidi totali e solidi volatili su solidi totali dei digestati del primo stadio fermentativo della terza campagna sperimentale

	Biomassa 1-2	Biomassa 3-4	Biomassa 5-6	Biomassa 7-8
Solidi totali (ST %)	5.53	7.16	6.04	6.46
Solidi volatili su solidi totali (SV/ST %)	94.07	92.9	94.89	93.31

Tabella 6.9 – Analisi elementare dei digestati del primo stadio fermentativo della terza campagna sperimentale

	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
Digestato 1-2	6.82	67.45	6.60	1.31	17.82	9.89
Digestato 3-4	3.86	45.74	5.50	0.88	44.02	11.84
Digestato 5-6	5.59	58.43	6.63	1.13	28.23	10.45
Digestato 7-8	4.23	51.33	5.99	0.75	37.70	12.15

6.4.1. Primo stadio: *dark fermentation*

Il primo stadio prevede la produzione di idrogeno mediante *dark fermentation*. Si è deciso di testare differenti rapporti di biomassa-inoculo (1:1 e 2:1).

Il set – up dell’esperimento prevede l’utilizzo di quattro configurazioni differenti, lavorando in duplice copia. Il processo è stato condotto impostando un valore di 6 % per i solidi totali alimentati. Si è lavorato con reattori da 250 mL e un 80 % di volume operativo, in maniera tale da lasciare libero uno spazio di testa per permettere la produzione di gas e la sua fuoriuscita dai tubi che lo conducono verso le sacche di raccolta. Il processo è stato condotto in mesofilia (35 °C) e in anaerobiosi. Quindi, gli otto reattori sono stati insufflati con azoto per quarantacinque minuti al fine di rimuovere l’ossigeno al loro interno. Il tempo di residenza idraulico è pari a tre giorni. Il pH di processo è pari a 7. Nel caso delle configurazioni con rapporto biomassa-inoculo 1:1 sono state utilizzate le medesime formule utilizzate per il calcolo delle quantità di tal quale di inoculo, scarti alimentari e *acqua di mirtillo* della seconda campagna sperimentale, presenti nel *sottocapitolo 6.3*. Per le configurazioni con rapporto biomassa-inoculo 2:1 le formule sono state variate. Il calcolo dei grammi di solidi totali da alimentare è stato eseguito con la *formula 6.14*:

$$ST_{alimentati} = \frac{\text{volume di lavoro} * 6\%}{100} = 12 \text{ g} \quad (6.14)$$

Basandoci sui solidi totali e solidi volatili presenti in *tabella 6.5* e fissato il valore dei solidi totali alimentati al reattore, è stata calcolata la massa totale dei solidi volatili da alimentare attraverso la *formula 6.15*:

$$\left(\frac{ST_{alimentati}(g)}{\left(\frac{SV_1}{ST\%inoculo} + \frac{SV_2}{ST\%scarti\ alimentari} * \%scarti\ alimentari + \frac{SV_2}{ST\%acqua\ di\ mirtillo} * \%acqua\ di\ mirtillo \right)} \right) = SV_{alimentati} (g) \quad (6.15)$$

Successivamente, sono stati calcolati i solidi volatili di scarti alimentari e *acqua di mirtillo* attraverso le *formule 6.16 e 6.17*, rispettivamente.

$$SV_{scarti\ alimentari} = 2 * SV_{alimentati} * \%scarti\ alimentari \quad (6.16)$$

$$SV_{acqua\ di\ mirtillo} = 2 * SV_{alimentati} * \%acqua\ di\ mirtillo \quad (6.17)$$

Lavorando con un rapporto biomassa:inoculo pari a 2:1, la quantità di solidi volatili dell'inoculo sarà pari alla metà della massa di solidi volatili della biomassa complessiva, come mostrato nella *formula 6.18*.

$$SV_{inoculo} = \frac{SV_{acqua\ di\ mirtillo} + SV_{scarti\ alimentari}}{2} \quad (6.18)$$

Dalle *formule 6.19, 6.20 e 6.21* si possono calcolare le quantità in grammi di solidi totali di scarti alimentari, *acqua di mirtillo* e inoculo, rispettivamente.

$$ST_{scarti\ alimentari}(g) = \frac{SV_{scarti\ alimentari}}{\frac{SV}{ST}\%scarti\ alimentari} \quad (6.19)$$

$$ST_{acqua\ di\ mirtillo}(g) = \frac{SV_{acqua\ di\ mirtillo}}{\frac{SV}{ST}\%acqua\ di\ mirtillo} \quad (6.20)$$

$$ST_{inoculo}(g) = \frac{SV_{inoculo}}{\frac{SV}{ST}\%inoculo} \quad (6.21)$$

La somma dei solidi totali di inoculo e biomasse deve essere pari a 12 grammi per rispettare il 6 % di solidi totali alimentati al reattore. Infine, è stato effettuato il calcolo della massa tal quale da alimentare al reattore come mostrato nelle *formule 6.22, 6.23 e 6.24*.

$$tal\ quale\ scarti\ alimentari (g) = \frac{ST_{scarti\ alimentari}}{ST\%scarti\ alimentari} \quad (6.22)$$

$$tal\ quale\ acqua\ di\ mirtillo (g) = \frac{ST_{acqua\ di\ mirtillo}}{ST\%acqua\ di\ mirtillo} \quad (6.23)$$

$$tal\ quale\ inoculo (g) = \frac{ST_{inoculo}}{ST\%inoculo} \quad (6.24)$$

La somma dei valori del tal quale di inoculo, *acqua di mirtillo* e scarti alimentari è la quantità complessiva da alimentare al reattore.

Nella *tabella 6.10* si possono osservare le configurazioni utilizzate per il primo stadio della terza campagna sperimentale.

Tabella 6.10 – Configurazioni del primo stadio della terza campagna sperimentale

	Pretrattamento biomassa	SV_{bio}:SV_{inoc}
BIO/INOC	No	1:1
2BIO/INOC	No	2:1
BIOTERM/INOC	Si	1:1
2BIOTERM/INOC	Si	2:1

Le analisi effettuate durante la terza campagna sono state le seguenti: misurazione del volume del biogas prodotto tramite svuotamento delle sacche per la raccolta di gas, analisi al gas cromatografo del biogas prodotto e misurazione del pH prima e dopo la fermentazione. Inoltre sono stati calcolati ST, SV ed è stata effettuata analisi elementare dei digestati. Le analisi citate sono descritte nel dettaglio nel *sottocapitolo 6.5*

6.4.2. Secondo stadio: digestione anaerobica

Il secondo stadio prevede la produzione di metano mediante digestione anaerobica. L'inoculo utilizzato è il medesimo utilizzato nelle campagne precedenti e non è stato pretrattato termicamente, in quanto non vi è necessità di eliminare i metanigeni. La biomassa utilizzata è il digestato del primo stadio del processo. Il rapporto biomassa:inoculo utilizzato è pari a 1:1. Il set – up dell'esperimento prevede l'utilizzo di quattro configurazioni differenti, lavorando in duplice copia. Il processo è stato condotto impostando un valore di 6 % per i solidi totali alimentati. Si è lavorato con reattori da 250 mL e un 80 % di volume operativo, in maniera tale da lasciare libero uno spazio di testa per permettere la produzione di gas e la sua fuoriuscita dai tubi che lo conducono verso le sacche di raccolta. Il processo è stato condotto in mesofilia (35 °C) e in anaerobiosi. Quindi, gli otto reattori sono stati insufflati con azoto per quarantacinque minuti al fine di rimuovere l'ossigeno al loro interno. Il tempo di residenza idraulico è pari a venti giorni. Il pH di processo medio per le quattro configurazioni è compreso tra 7 e 7.6. Per valutare la quantità di tal quale di biomassa e inoculo da alimentare al reattore sono state utilizzate le formule presenti nel *sottocapitolo 6.3*, considerando un'unica biomassa. Nella *tabella 6.11* sono rappresentate le configurazioni utilizzate nel secondo stadio della terza campagna sperimentale.

Tabella 6.11 – Configurazioni del secondo stadio della terza campagna sperimentale

	Pretrattamento biomassa	Pretrattamento inoculo	V_{bio} / V_{inoc}
BIO/INOC	No	No	1:1
2BIO/INOC	No	No	1:1
BIOTERM/INOC	No	No	1:1
2BIOTERM/INOC	No	No	1:1

Le analisi effettuate durante la terza campagna sono state le seguenti: misurazione del volume del biogas prodotto tramite svuotamento delle sacche per la raccolta di gas, analisi al gas cromatografo del biogas prodotto e misurazione del pH prima e dopo la

fermentazione. Inoltre sono stati calcolati ST, SV ed è stata effettuata analisi elementare dei digestati.

6.5. *Analisi eseguite*

6.5.1. Monitoraggio della produzione giornaliera di biogas

Il monitoraggio della produzione giornaliera di biogas è stato effettuato mediante l'utilizzo di una siringa e un tubo di piccole dimensioni come collegamento tra la siringa e la sacca. Sono state effettuate misurazioni giornaliere su ogni sacca.

6.5.2. Analisi elementare

L'analisi elementare permette di identificare le percentuali di carbonio, idrogeno, azoto e zolfo presenti nei campioni. Inoltre, si può ricavare la percentuale di ossigeno mediante complemento a cento rispetto gli altri elementi ottenuti mediante la *formula 6.25*.

$$O\% = 100 - C\% - H\% - N\% - S\% \quad (6.25)$$

La procedura di analisi consiste nelle seguenti operazioni:

- Prendere un piccolo foglio di alluminio e creare un piccolo recipiente grazie all'utilizzo di uno stampo.
- Pesare il recipiente su una bilancia ed effettuare la tara.
- Versare all'incirca 20 mg di campione da analizzare.
- Aggiungere una quantità all'incirca uguale di ossido di tungsteno con lo scopo di facilitare la combustione del campione per effettuarne l'analisi.
- Chiudere attentamente il recipiente e pressare per creare una pastiglia.
- Create tutte le pastiglie necessarie, possono essere inserite nell'analizzatore elementare.

6.5.3. Analisi al gas cromatografo

Per analizzare la composizione del biogas prodotto è stato utilizzato il gas cromatografo, il quale ha permesso di verificare la presenza di idrogeno molecolare, ossigeno molecolare, azoto molecolare, anidride carbonica e acqua. Per le analisi di composizione del biogas è stata scelta una sola sacca per tipologia di configurazione. Lo strumento ha permesso la rilevazione dei picchi relativi ai composti sopracitati e dall'area del picco si è ricavata la concentrazione in percentuale del composto. In *figura 6.4* si può osservare il gas cromatografo utilizzato per effettuare le analisi.



Figura 6.3 – Rappresentazione del gas cromatografo

6.5.4. Analisi dei solidi totali e dei solidi volatili

L'analisi dei solidi totali avviene mediante essiccazione a 105 °C per circa 24 ore di una certa quantità di campione versato in un recipiente. Per la seguente analisi sono state effettuate le seguenti operazioni:

- Pesare il recipiente vuoto (tara).
- Inserire il campione al suo interno e pesare nuovamente (tara + campione).
- Inserire il recipiente in stufa a 105 °C per circa 24 ore.
- Al termine pesare nuovamente il recipiente contenente il campione essiccato.

Inserendo i dati ottenuti in un foglio di calcolo, è stato possibile ottenere la massa del campione, come differenza tra la massa della tara e la massa del recipiente con il campione. La massa del campione post essiccazione è stata ottenuta come differenza tra la massa del contenitore post essiccazione e la massa del contenitore vuoto. Infine, i solidi totali sono stati calcolati nel seguente modo:

$$TS \% = \frac{\text{massa campione post essiccazione a } 105\text{ }^{\circ}\text{C (g)}}{\text{massa campione iniziale (g)}} * 100 \quad (6.26)$$

L'analisi dei solidi volatili viene effettuata sul campione essiccato, e avviene in stufa a 550 °C per 6 ore. Sono state effettuate le seguenti operazioni:

- Pesare i contenitori in ceramica vuoti da inserire in forno (tara).
- Prelevare delle polveri dal recipiente contenente il campione essiccato grazie all'utilizzo di una spatolina e inserirlo nel contenitore in ceramica (tara + campione).
- Pesare il contenitore in ceramica contenente il campione essiccato.
- Inserire tutto nel forno a 550 °C per 6 ore.
- Pesare le ceneri ottenute.

Inserendo i dati ottenuti in un foglio di calcolo, è stato possibile ottenere il valore del campione prima di inserirlo nel forno, come differenza tra la massa del campione nel contenitore prima del processo e la massa del contenitore vuoto; mentre, il valore delle ceneri è ottenuto come differenza tra la massa del campione post processo e la massa della tara. I solidi volatili rispetto ai solidi totali vengono calcolati nel seguente modo:

$$\frac{VS}{TS} \% = \frac{1 - \text{massa campione post essiccazione a } 550\text{ }^{\circ}\text{C (g)}}{\text{massa campione iniziale (g)}} * 100 \quad (6.27)$$

In questo secondo caso, la massa ottenuta è quello delle ceneri, ma il valore di interesse è quello dei solidi volatili che sono evaporati. Per ricavare quel valore sfruttiamo la definizione di complemento a uno.

6.5.5. Misurazione del pH

La misurazione del pH è stata effettuata mediante l'utilizzo di due strumentazioni in particolare: una sonda (descrivere la tipologia di sonda) e la cartina tornasole. La prima misurazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di una sonda per avere una stima più accurata e la cartina tornasole è stata utilizzata come controprova. In *figura 6.5* si può osservare la sonda utilizzata per effettuare le misurazioni del pH.

6.6. Calcolo del potere calorifico superiore

Il potere calorifico superiore è la quantità di calore che si rende disponibile per effetto della combustione completa a pressione costante della massa unitaria del combustibile. Il calcolo è stato effettuato sugli scarti vegetali e sul digestato del primo stadio della terza campagna sperimentale. Per stimare il potere calorifico superiore è stata utilizzata la *formula 6.31*.

$$HHV = 0.3491 * C + 1.1783 * H + 0.1005 * S - 0.1034 * O + 0.0151 * N - 0.0211 * A \quad (6.31)$$

C, H, O, N, S e A sono le quantità di carbonio, idrogeno, ossigeno, azoto, zolfo e ceneri rispettivamente, contenuti nel combustibile, espressi in percentuale in massa sulla massa secca. Il valore ottenuto è espresso in MJ/kg (Timofeeva et al., 2023).

7. Risultati ottenuti

7.1. Campagna sperimentale 1: ottimizzazione dell'inoculo

La prima esperienza è stata fondamentale per comprendere se i microrganismi, presenti nella coltura mista utilizzata, fossero in grado di produrre idrogeno in determinate condizioni. Nella *tabella 7.1* si possono osservare le configurazioni utilizzate nella prima campagna sperimentale.

Tabella 7.1 – Riepilogo configurazioni della prima campagna sperimentale

Configurazione	Pretrattamento	Zucchero	Terreno di coltura
GLU	/	Glucosio	no
SACC	/	Saccarosio	no
GLUTERR	/	Glucosio	si
SACCTERR	/	Saccarosio	si
GLUTERM	Termico	Glucosio	no
GLUTERRTERM	Termico	Glucosio	si
SACCTERM	Termico	Saccarosio	no
SACCTERRTERM	Termico	Saccarosio	si

In *tabella 7.2* si possono osservare i valori di pH iniziali e finali relativi alla *dark fermentation* nella prima campagna sperimentale.

Tabella 7.2 – Rappresentazione dei valori di pH prima e dopo il processo della prima campagna sperimentale

Configurazione	pH iniziale	pH finale
GLU	8.5	3.9
SACC	8.5	6.2
GLUTERR	8.5	3.9
SACCTERR	8.5	6.2
GLUTERM	8.5	4.0
GLUTERRTERM	8.5	6.1
SACCTERM	8.5	6.1
SACCTERRTERM	8.5	6.2

In *figura 7.1* si può osservare la rappresentazione grafica dei valori di pH iniziali e finali ottenuti per la prima campagna sperimentale.

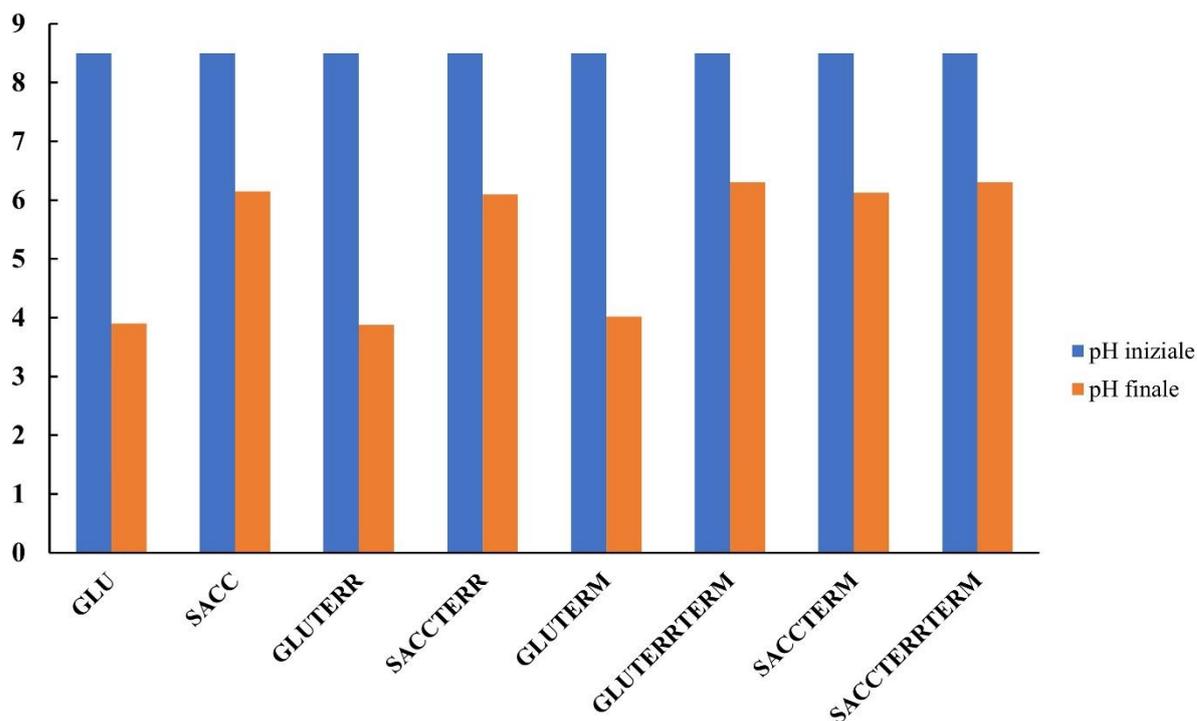


Figura 7.1 – Diagramma a colonne rappresentante le variazioni di pH per le configurazioni della prima campagna sperimentale

Dalla figura 7.1 si può notare come il pH finale tenda a decrescere per tutte le configurazioni, in quanto il processo di *dark fermentation* produce insieme all'idrogeno anche molti acidi grassi. In alcune configurazioni, l'acidificazione è stata così spinta che il processo si è bloccato, non producendo più idrogeno. Dalla figura 7.2 si può notare come le configurazioni che raggiungono un pH fortemente acido al termine del processo, ottengono una produzione di idrogeno trascurabile.

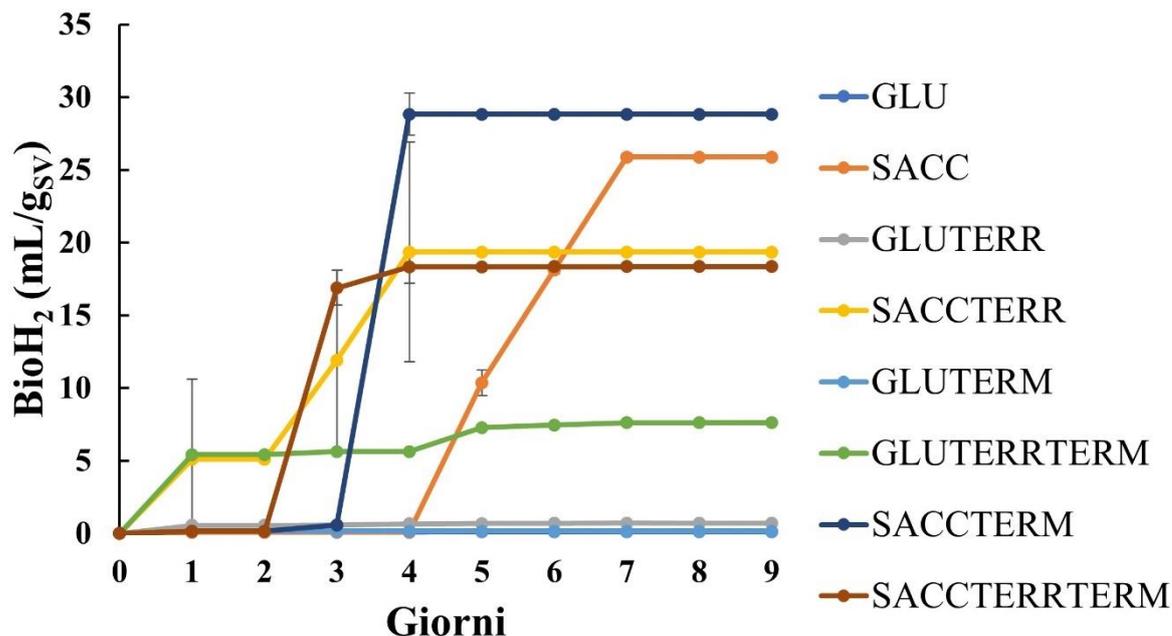


Figura 7.2 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioH₂ della prima campagna sperimentale

Le curve di produzione cumulata ottenute per ogni configurazione, rappresentate in *figura 7.2*, presentano fasi di latenza, fasi esponenziali e plateau differenti. In primo luogo, si può notare come la maggior parte delle configurazioni contenenti glucosio producano una quantità di idrogeno trascurabile. L'unica configurazione, contenente glucosio, che produce idrogeno in quantità non trascurabile (GLUTERRTEM) prevede l'utilizzo del pretrattamento termico dell'inoculo e del terreno di coltura, raggiungendo una produzione massima pari a 7.62 mL/g_{sv}. Invece, per le configurazioni contenenti saccarosio la produzione di idrogeno è evidente. La configurazione contenente solo saccarosio (SACC) è caratterizzata da una fase di latenza di quattro giorni; probabilmente, una fase di adattamento così lunga può essere dovuta alla mancanza del terreno di coltura. Infatti, nelle configurazioni in cui è stato aggiunto il terreno di coltura, la fase di latenza è meno lunga. La produzione massima viene raggiunta al settimo giorno, pari a 25.9 mL/g_{sv}. Le configurazioni in cui è stato aggiunto il terreno di coltura (SACCTERR e SACCTERRTERM) presentano una produzione di idrogeno molto simile, pari a 19.4 e 18.3 mL/g_{sv}, rispettivamente. La produzione massima è stata raggiunta dalla configurazione contenente inoculo, pretrattato termicamente, e saccarosio (SACCTERM); il plateau è stato raggiunto al quarto giorno ed è pari a 28.8 mL/g_{sv}.

In *figura 7.3* si possono osservare le curve di produzione cumulata di biometano per la prima campagna sperimentale. Si può notare il metano ottenuto, durante il processo di *dark fermentation*, non sia una quantità totalmente trascurabile rispetto alla produzione di idrogeno. Probabilmente, il pretrattamento termico utilizzato per l'inoculo non è stato sufficiente a eliminare completamente i microrganismi metanigeni presenti. Una possibile soluzione potrebbe essere utilizzare una temperatura maggiore, oppure cambiare modalità di pretrattamento.

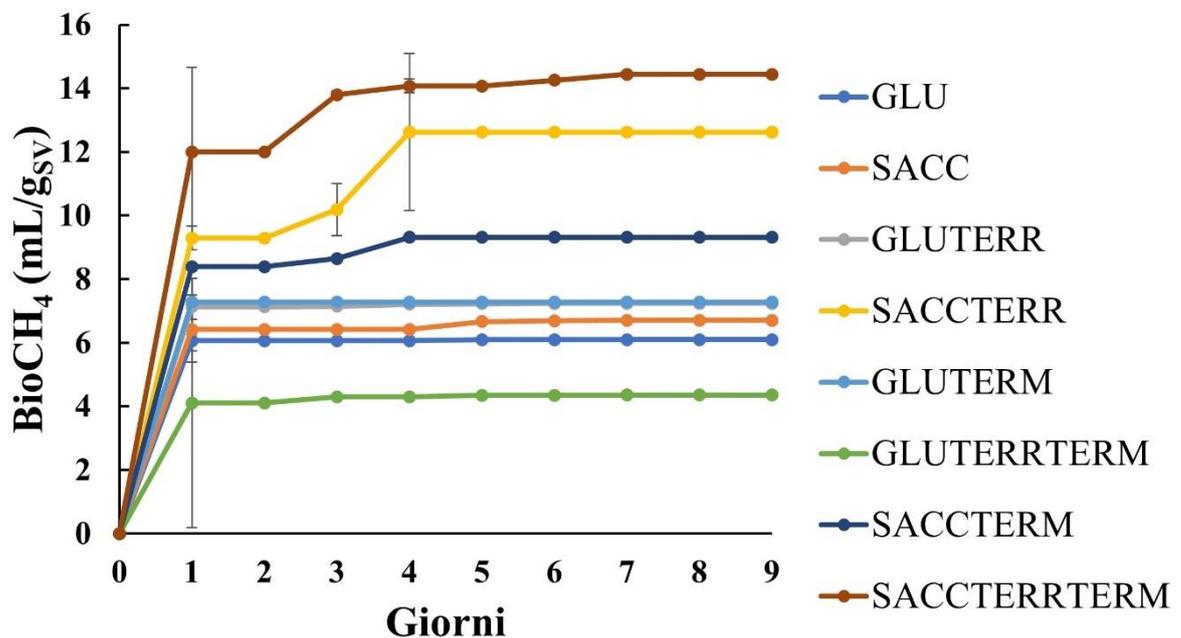


Figura 7.3 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioCH₄ della prima campagna sperimentale

In *figura 7.4* sono rappresentate le curve di produzione cumulata di anidride carbonica per la prima campagna sperimentale.

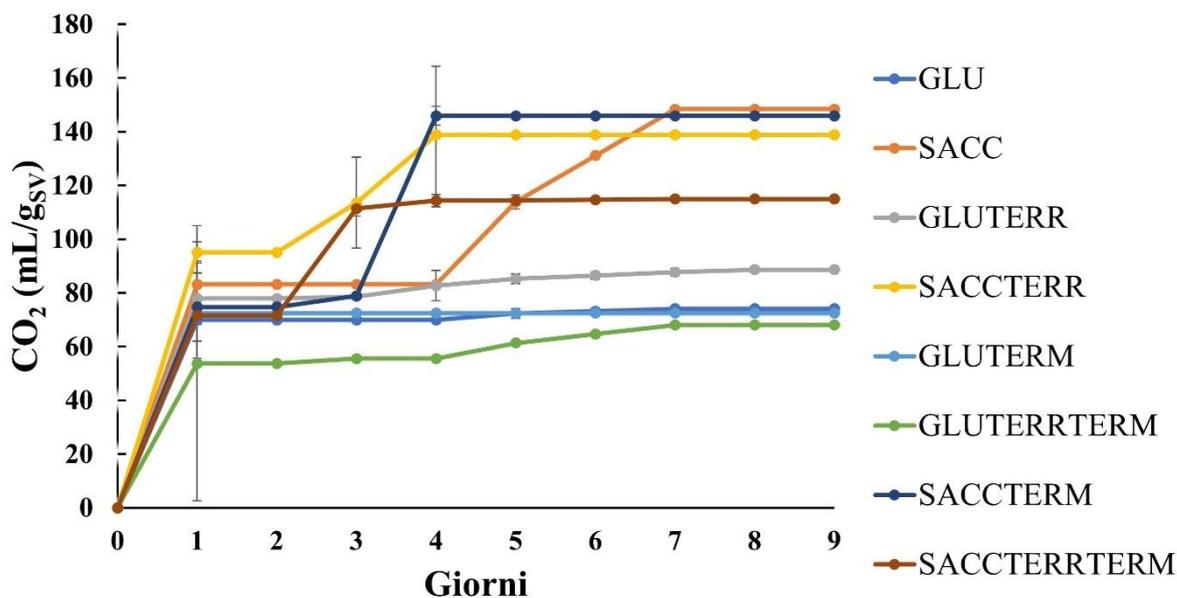


Figura 7.4 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di anidride carbonica della prima campagna sperimentale

I prodotti principali della *dark fermentation* sono idrogeno e anidride carbonica. Dalla figura 7.4 è evidente come l'anidride carbonica sia prodotta in quantità notevolmente maggiori rispetto alla quantità prodotta di idrogeno per ogni configurazione. Normalmente, l'anidride carbonica è il composto principale presente nel biogas. Confrontando la figura 7.4 e la figura 7.5, si può notare che le configurazioni, producenti una quantità trascurabile di idrogeno, hanno prodotto comunque biogas, il quale sarà caratterizzato prevalentemente da anidride carbonica.

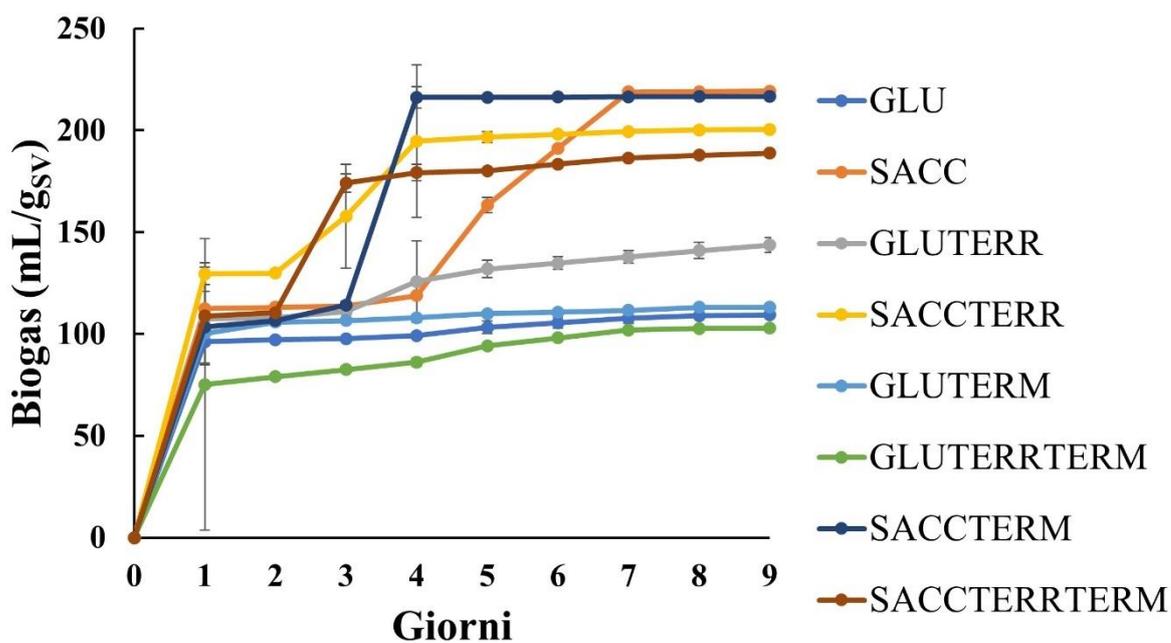


Figura 7.5 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di biogas della prima campagna sperimentale

In virtù delle considerazioni effettuate sulla variazione di pH nel processo e sulle curve di produzione cumulata, si può concludere che:

- L'inoculo è stato in grado di degradare uno zucchero più complesso del glucosio, come il saccarosio;
- Il pretrattamento termico ha una buona efficacia nell'eliminazione dei microrganismi metanigeni.
- Il terreno di coltura non è necessario a limitare la fase di latenza, in quanto viene raggiunto comunque il plateau per tutte le configurazioni, anche se con una fase di adattamento maggiore.

I grafici a torta relativi alla composizione del biogas prodotto per le configurazioni di maggiore interesse (SACC e SACCTERM) sono rappresentati in *figura 7.6* e in *figura 7.7*, rispettivamente.

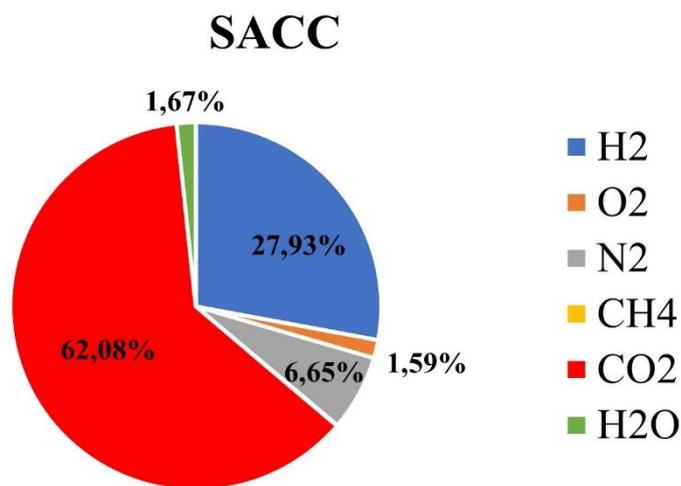


Figura 7.6 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “SACC” della prima campagna sperimentale

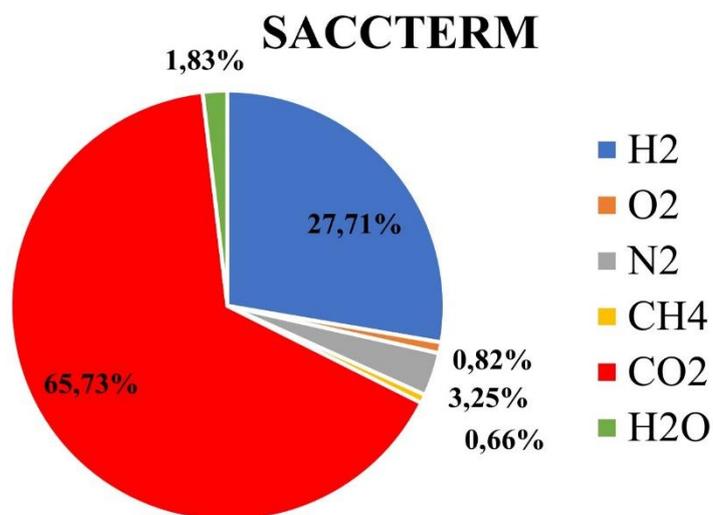


Figura 7.7 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “SACCTERM” della prima campagna sperimentale

Lo studio di Al-Haddad et al. (2023) riporta i risultati ottenuti da *dark fermentation*, condotta in mesofilia (37 °C), pH leggermente acido (5.5) e un tempo di ritenzione idraulica pari a cinque giorni. Il substrato principale utilizzato è stato D-glucosio in polvere, puro al 99.5 %, mentre l'inoculo deriva da un impianto di digestione anaerobica. Si è valutata l'efficacia del pretrattamento termico dell'inoculo, eseguito a 115 °C in autoclave per 20 minuti a 1.5 bar. La produzione di idrogeno per la configurazione pretrattata termicamente è pari a 191.8 mL/g_{SV}, mentre la configurazione non pretrattata produce una quantità di idrogeno leggermente inferiore, pari a 171 mL/g_{SV}. Il risultato ottenuto è concettualmente simile a quanto ottenuto in questo studio, in cui la configurazione non pretrattata ha prodotto una quantità leggermente minore rispetto a quella pretrattata termicamente. Nonostante questo, le produzioni ottenute sono nettamente inferiori. Probabilmente, questa differenza può essere dovuta all'uso di un pretrattamento termico più spinto, che ha permesso di eliminare maggiormente i microrganismi metanigeni, e all'utilizzo di glucosio con un elevato grado di purezza.

In *tabella 7.3* si possono osservare i valori dei solidi totali e dei solidi volatili dei digestati di ogni configurazione reattoristica utilizzate nel corso della prima campagna. Si può notare come il contenuto dei solidi totali e dei solidi volatili, per le configurazioni che hanno prodotto una quantità di biogas minore, sia più elevato rispetto alle configurazioni che hanno ottenuto un quantitativo di prodotto maggiore. Probabilmente, l'inoculo non è stato in grado di decomporre le sostanze organiche presenti e sono ancora presenti nel residuo del processo.

Tabella 7.3 – Rappresentazione dei valori dei solidi totali e dei solidi volatili su solidi totali dei digestati per ogni configurazione della prima campagna sperimentale

Configurazione	Solidi totali (ST %)	Solidi volatili su solidi totali (SV/ST %)
GLU	6.86	82.71
SACC	3.62	84.89
GLUTERR	5.79	88.92
SACCTERR	5.01	89.40
GLUTERM	7.03	92.67
GLUTERRTERM	6.14	70.33
SACCTERM	4.76	88.45
SACCTERRTERM	4.17	84.06

In *tabella 7.4* si può osservare la composizione elementare dei digestati di ogni configurazione utilizzata per la prima campagna sperimentale. Si può notare come i valori dei rapporti C/N delle prime tre configurazioni reattoristiche siano molto elevati. Questo indica la presenza di un elevato contenuto organico. Per quanto riguarda le altre configurazioni, si possono osservare valori di rapporto C/N inferiore a 15.

Tabella 7.4 – Composizione elementare dei digestati per ogni configurazione reattoristica della prima campagna sperimentale

Configurazione	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
GLU	3.26	37.72	5.75	0.35	52.93	11.57
SACC	3.07	38.07	4.63	0.40	53.84	12.40
GLUTERR	4.12	36.40	4.27	0.28	54.93	8.84
SACCTERR	3.96	38.50	4.46	0.42	52.66	9.72
GLUTERM	3.83	42.08	4.92	0.25	48.92	10.98
GLUTERRTERM	3.43	34.32	4.06	0.19	58.00	10.02
SACCTERM	3.68	40.56	4.41	0.35	51.00	11.08
SACCTERRTERM	3.66	36.68	4.04	0.75	54.86	10.04

7.2. Campagna sperimentale 2: valorizzazione delle biomasse

La seconda esperienza è stata fondamentale per comprendere se i microrganismi fossero in grado di decomporre delle biomasse per la produzione di idrogeno. La sigla mA prevede il 5% di acqua di mirtillo e il 95% di scarti alimentari mentre la sigla mB prevede il 15% di acqua di mirtillo e l'85% di scarti alimentari. Il saccarosio è stato aggiunto in quantità tale da eguagliare la quantità di zucchero fornita dall'acqua di mirtillo nelle altre configurazioni reattoristiche.

In tabella 7.5 si possono osservare i valori di pH iniziali e finali relativi alla *dark fermentation* della seconda campagna sperimentale.

Tabella 7.5 – Rappresentazione dei valori di pH prima e dopo il processo della seconda campagna sperimentale

Configurazione	pH iniziale	pH finale
SACCmA	5.50	7.76
SACCmB	6.00	7.71
MARMmA	6.00	7.89
MARMmB	6.00	7.49
ORTSACCmA	6.00	5.49
ORTSACCmB	6.00	6.09
ORTMARMmA	6.00	5.30
ORTMARMmB	6.00	5.28

In figura 7.8 si può osservare la rappresentazione grafica dei valori di pH iniziali e finali ottenuti per la seconda campagna sperimentale.

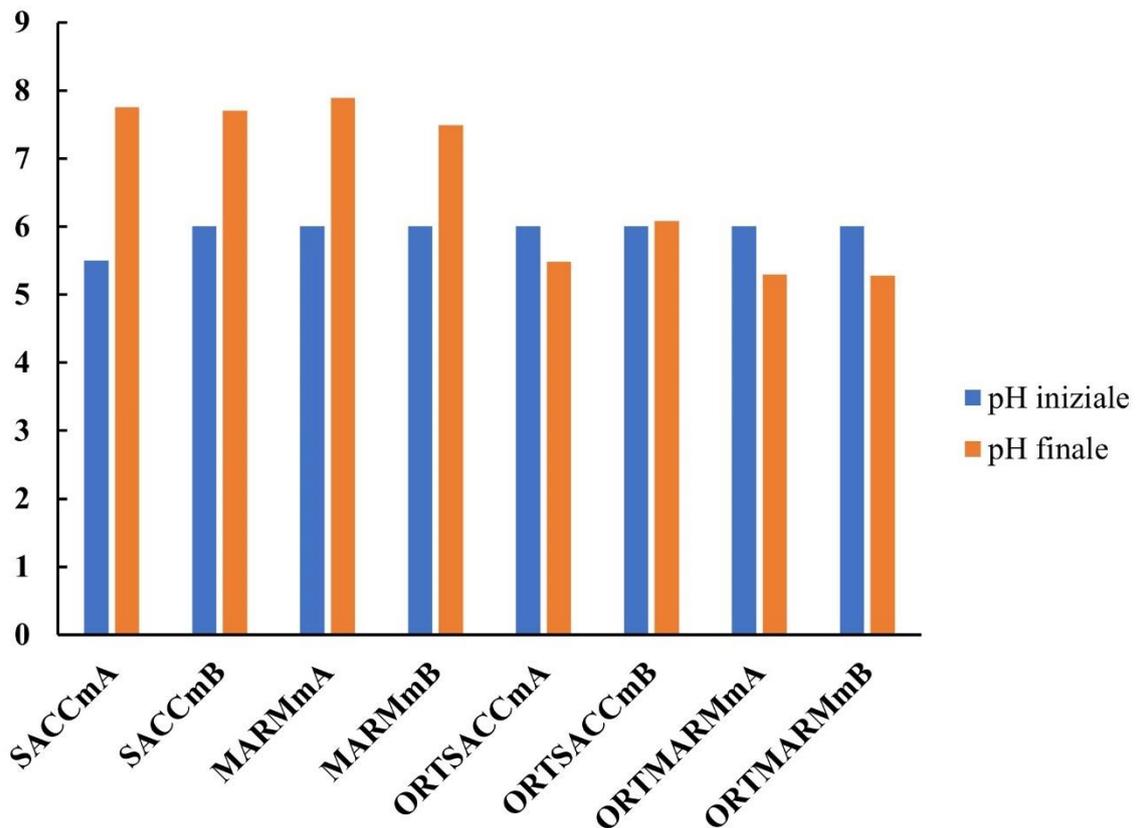


Figura 7.8 – Diagramma a colonne rappresentante le variazioni di pH per le configurazioni della seconda campagna sperimentale

Dalla *tabella 7.5* e dalla *figura 7.8* è evidente come le configurazioni contenenti prevalentemente zuccheri (*acqua di mirtillo* o saccarosio) subiscano un aumento del pH che sfavorisce la *dark fermentation*. Infatti, dalla *figura 7.9* si può osservare come, per le prime quattro configurazioni, la produzione di idrogeno ottenuta sia una quantità trascurabile. Differentemente, la presenza di scarti alimentari favorisce una leggera acidificazione del sistema e tali configurazioni producono una quantità di idrogeno rilevante.

In *figura 7.9* sono rappresentate le curve di produzione cumulata di bioidrogeno della seconda campagna sperimentale. È evidente come la presenza di biomasse limiti fortemente la fase di latenza dell'inoculo. La configurazione (ORTSACCmB) contenente scarti alimentari e saccarosio, con una concentrazione pari al 15 % di *acqua di mirtillo* (come descritto nel *sottocapitolo 6.3*), presenta una fase di latenza di tre giorni, per poi iniziare la fase di crescita esponenziale e raggiungere il plateau al sesto giorno di processo, ottenendo una produzione di idrogeno pari a 25.6 mL/g_{sv}. La configurazione simile, contenente saccarosio, con una concentrazione pari al 5 % di *acqua di mirtillo* (come descritto nel *sottocapitolo 6.3*), presenta una fase di latenza minore, pari a un giorno; inoltre, raggiunge il punto di produzione massima dopo solo quattro giorni, ottenendo un valore di bioidrogeno superiore rispetto alla configurazione ORTSACCmB, pari a 40 mL/g_{sv}. Questo risultato indica che una quantità maggiore di scarti alimentari favorisce la produzione di bioidrogeno. Le configurazioni contenenti scarti alimentari e *acqua di mirtillo* sono quelle che producono la quantità di bioidrogeno maggiore. In particolare, la configurazione con una biomassa complessiva di composizione *mA* ne ha prodotto una quantità maggiore. Questo risultato avvalorava la tesi che gli scarti alimentari utilizzati siano in grado di produrre idrogeno in quantità rilevanti. La configurazione ORTMARMmA presenta una fase di latenza di un

giorno, mentre ORTMARMmB presenta un accenno di fase di adattamento. Entrambe le configurazioni raggiungono il plateau al terzo giorno, ottenendo una produzione massima di bioidrogeno pari a 49.1 e 45.9 mL/g_{SV}, rispettivamente. Si può concludere che l'inoculo è stato in grado di degradare scarti alimentari per favorire la produzione di idrogeno.

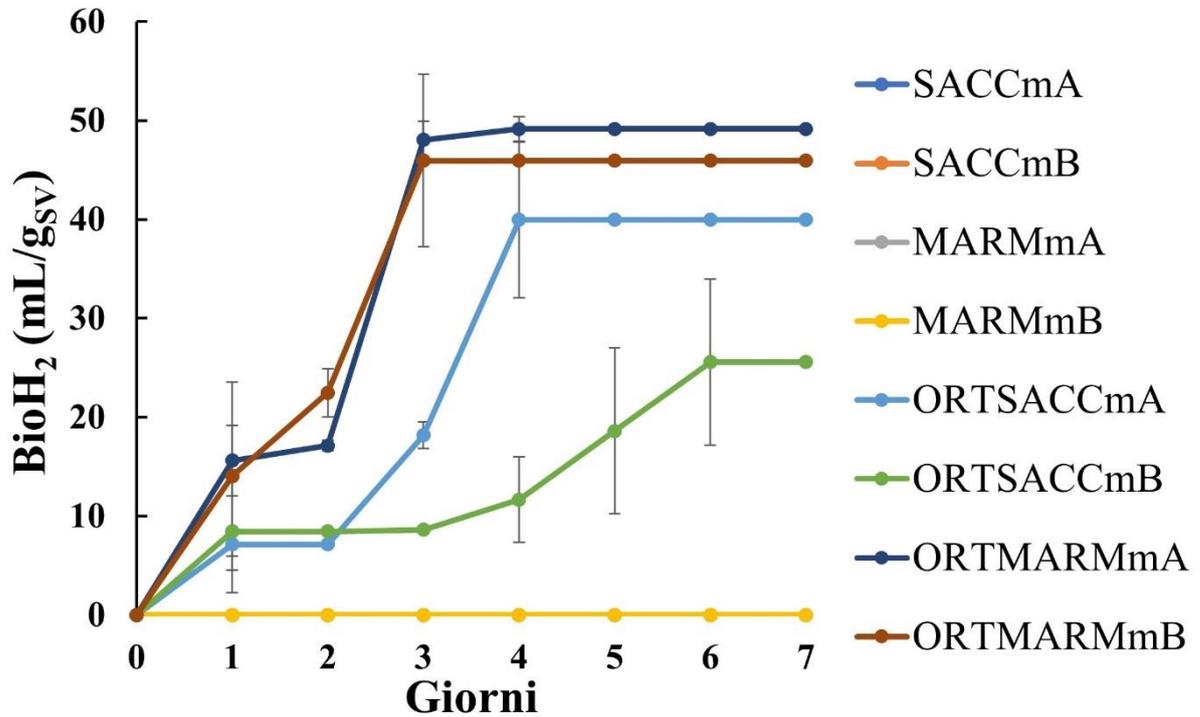


Figura 7.9 - Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioH₂ della seconda campagna sperimentale

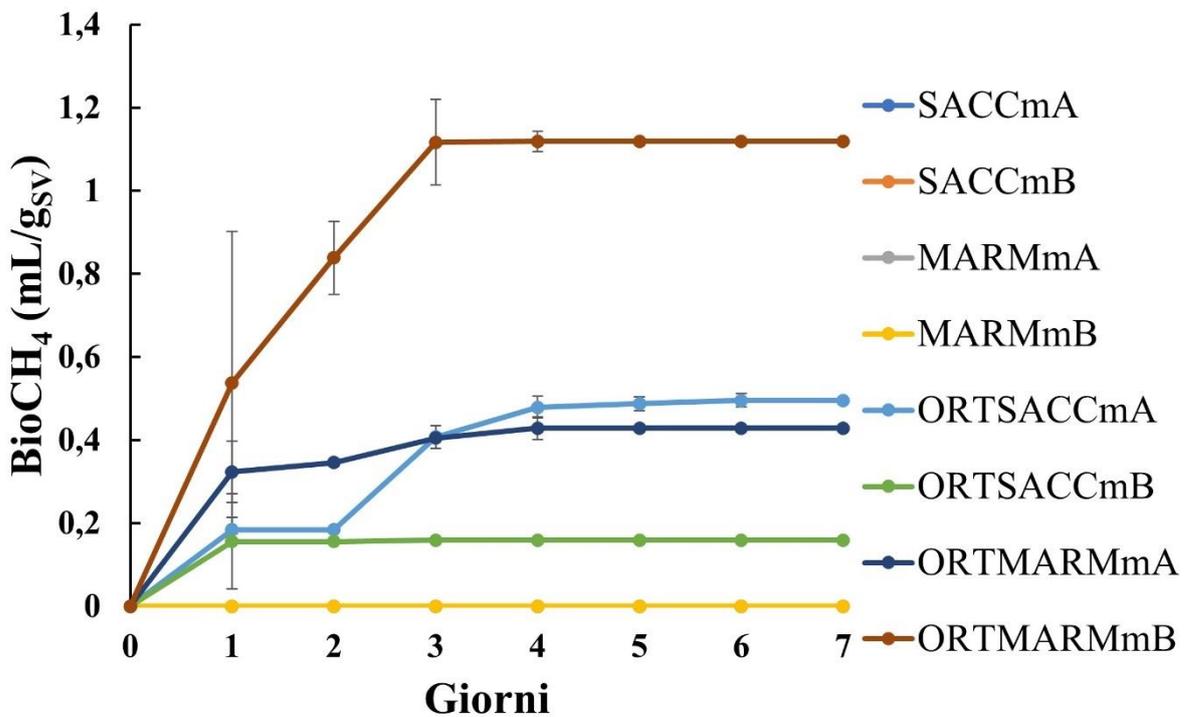


Figura 7.10 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioCH₄ della seconda campagna sperimentale

In *figura 7.10* si possono osservare le curve di produzione cumulata di biometano ottenute nella seconda campagna sperimentale. Le configurazioni, attive nella produzione di idrogeno, hanno prodotto anche metano in quantità nettamente trascurabili rispetto alle quantità di bioidrogeno prodotto.

In *figura 7.11* sono rappresentate le curve di produzione cumulata di anidride carbonica per la seconda campagna sperimentale.

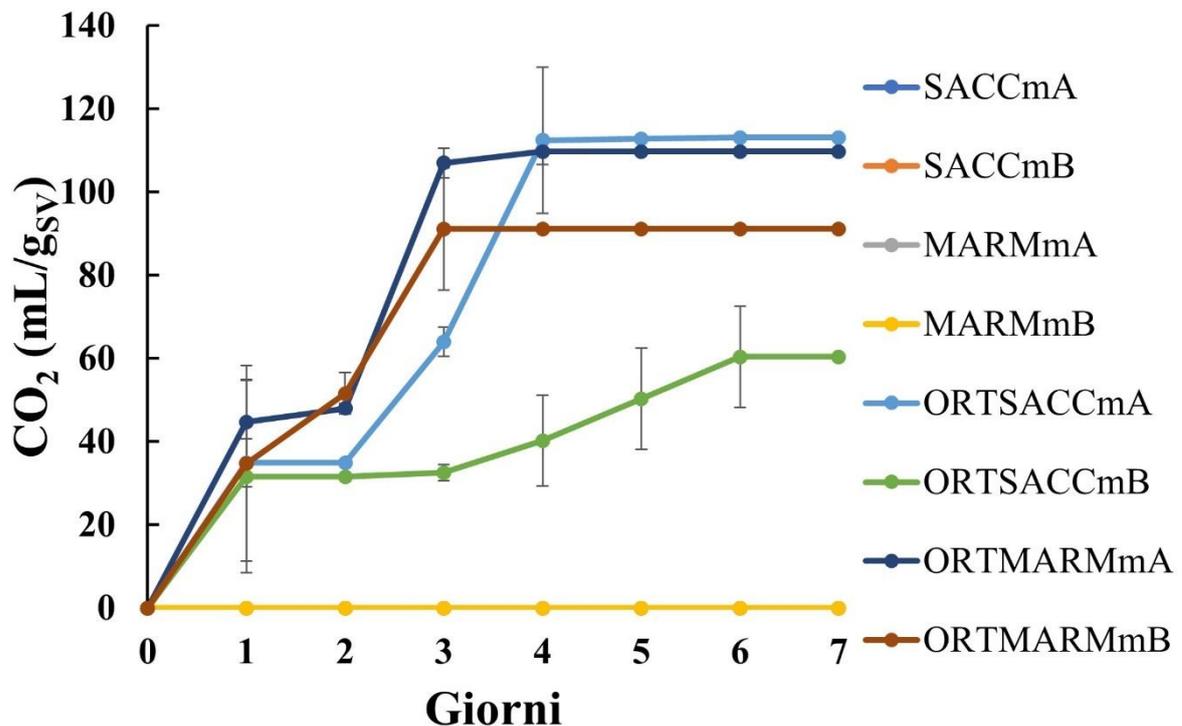


Figura 7.11 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di CO₂ della seconda campagna sperimentale

Tutte le configurazioni attive nella produzione di bioidrogeno producono anidride carbonica. Dalla *figura 7.11* si nota come gli andamenti di produzione di CO₂ siano simili agli andamenti di produzione di idrogeno, rappresentati in *figura 7.9*. La configurazione ORTSACCmA produce una quantità maggiore di anidride carbonica rispetto alle altre configurazioni, pari a 113 mL/g_{SV}, nonostante non sia quella che produce maggiormente bioidrogeno. Le configurazioni ORTSACCmB, ORTMARMmA e ORTMARMmB producono una quantità di CO₂ pari a 60.4, 110 e 91.2 mL/g_{SV}, rispettivamente.

In *figura 7.12* sono rappresentate le curve di produzione cumulata di biogas per le configurazioni della seconda campagna sperimentale. Gli andamenti di produzione di biogas per tutte e quattro le configurazioni attive sono simili agli andamenti delle curve di produzione dell'idrogeno, rappresentate in *figura 7.9*. Le configurazioni ORTSACCmA e ORTMARMmA sono le maggiori produttrici di biogas, con una produzione massima pari a 230 ± 2 e 229 mL/g_{SV}, rispettivamente. Una produzione pari a 185.0 ± 0.3 mL/g_{SV} è stata ottenuta dalla configurazione ORTMARMmB, mentre ORTSACCmB ha ottenuto una produzione massima di biogas pari a 130 ± 1 mL/g_{SV}. Si può concludere che l'uso di scarti alimentari come biomassa rappresenta un'ottima opzione per la produzione di biogas, in particolare bioidrogeno.

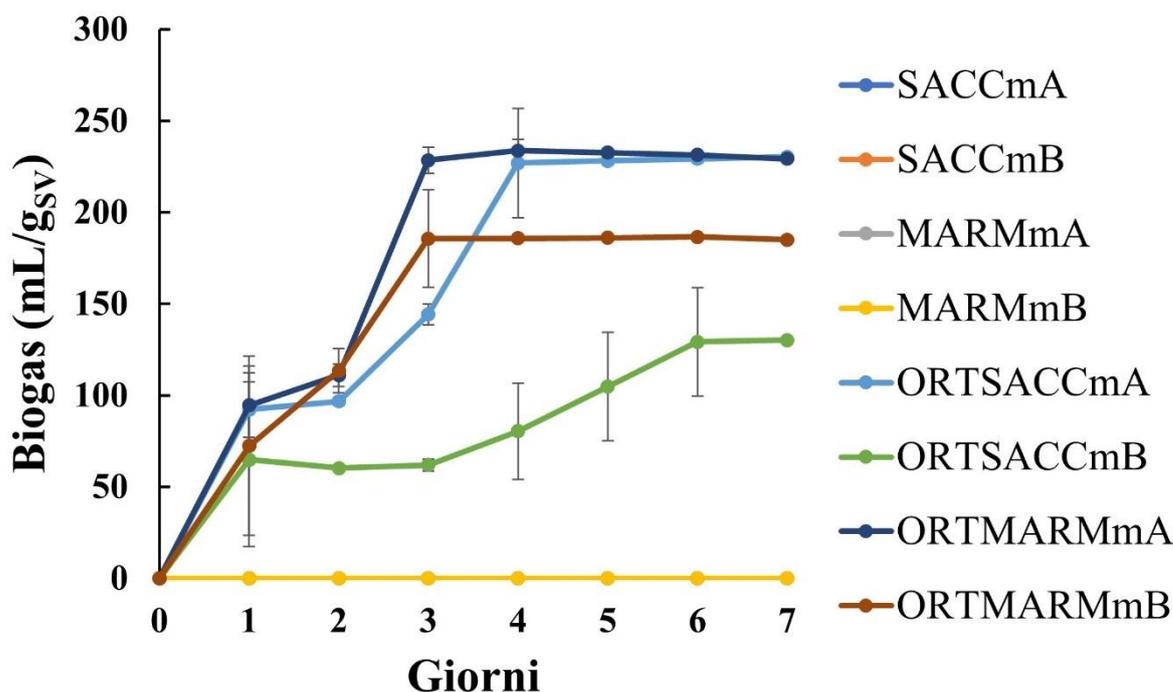


Figura 7.12 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di biogas della seconda campagna sperimentale

In conclusione, si può notare che le configurazioni attive producono principalmente idrogeno e anidride carbonica. Quindi, tali configurazioni sono state impostate in maniera corretta per lo svolgimento del processo di *dark fermentation*. In particolare, la configurazione migliore è quella contenente scarti alimentari e *acqua di mirtillo* con composizione *mA* (ORTMARMmA) per le seguenti ragioni:

- Dai risultati ottenuti è evidente la presenza di scarti alimentari favorisca la produzione di bioidrogeno, mentre la sola presenza di *acqua di mirtillo* non permette il raggiungimento di un pH tale per cui possa essere prodotto idrogeno e acidi organici.
- Per sfruttare la maggiore capacità produttiva degli scarti alimentari, si preferisce lavorare con una composizione di biomassa con una percentuale pari al 95 % e solo il 5 % di *acqua di mirtillo*. La produzione di idrogeno ottenuta dalla configurazione in questione è la produzione massima tra tutte le configurazioni settate.

I grafici a torta relativi alla composizione del biogas prodotto per le configurazioni di maggiore interesse (ORTSACCmA, ORTMARMmA e ORTMARMmB) sono rappresentati in figura 7.13, 7.14 e 7.15, rispettivamente. Si nota immediatamente che i componenti del biogas non sono esclusivamente anidride carbonica e idrogeno. Questo è indice che il processo di *dark fermentation* ha portato alla formazione di altri sottoprodotti e non solo dei prodotti di nostro interesse (H₂ e CO₂). Una possibile spiegazione può essere che il pretrattamento termico non è stato sufficiente ad eliminare tutti i microrganismi non produttori di idrogeno presenti all'interno dell'inoculo.

ORTSACCmA

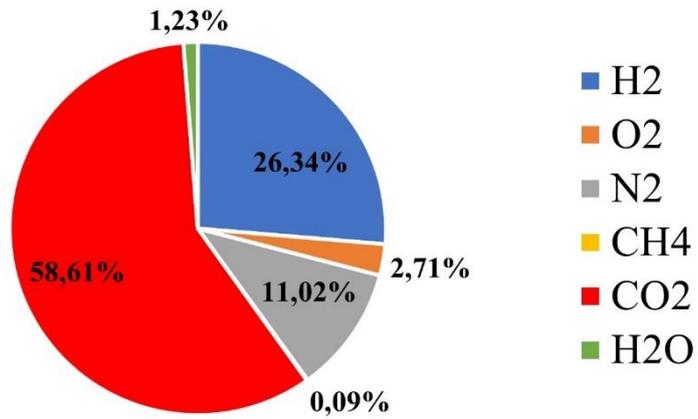


Figura 7.13 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “ORTSACCmA” della seconda campagna sperimentale

ORTMARMmA

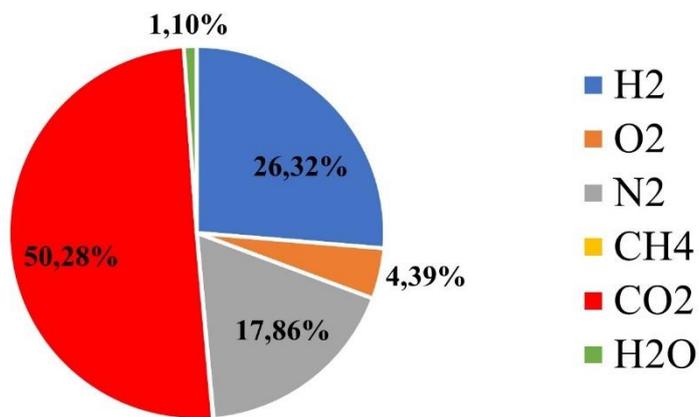


Figura 7.14 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “ORTMARMmA” della seconda campagna sperimentale

ORTMARMmB

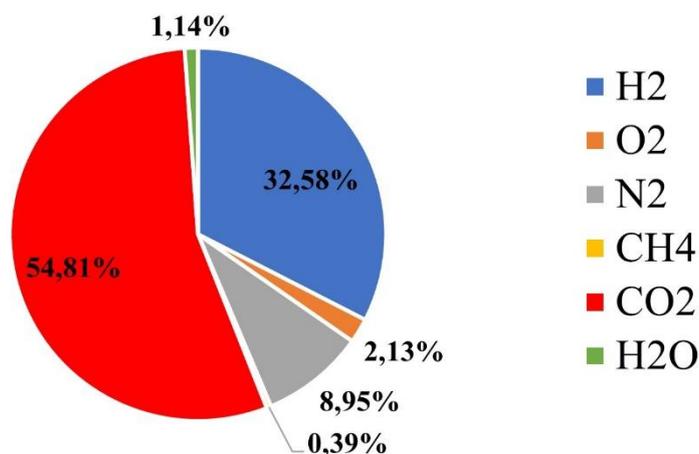


Figura 7.15 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “ORTMARMmB” della seconda campagna sperimentale

Un risultato simile a quanto descritto in questo studio è stato ottenuto da (Cao et al., 2022), ottenendo una produzione di bioidrogeno pari a 40.2 mL/g_{SV}. L'inoculo utilizzato deriva da un impianto di digestione anaerobica ed è stato pretrattato termicamente a 100 °C per 15 minuti. Si è lavorato in mesofilia (37 °C) e con un'alimentazione batch. Il pH di processo è pari a 7. Inoltre, è presente un sistema di agitazione. Il tempo di ritenzione idraulica è pari a tre giorni. L'obiettivo dello studio è valorizzare la buccia di patata cruda tramite *dark fermentation*. I parametri di processo utilizzati sono simili a quanto descritto in questo studio. Nonostante il pretrattamento termico dell'inoculo utilizzato nella prima campagna non sia spinto come quello utilizzato in questo studio, si può concludere che i nostri risultati sono in linea con quanto ottenuto da (Cao et al., 2022).

Nello studio di Magdalena et al. (2023) scarti alimentari vengono valorizzati tramite *dark fermentation*, utilizzando come inoculo, fanghi attivi prelevati da un impianto di trattamento delle acque reflue. L'inoculo è stato pretrattato termicamente per 15 minuti a 90 °C. Il rapporto substrato – inoculo è pari a 8.7, si è lavorato con un'alimentazione batch. Il processo è stato condotto anaerobicamente con un pH pari a 6 e una temperatura di 37 °C. Il tempo di ritenzione idraulica è pari a quattro giorni. Il volume operativo del reattore è pari a 200 mL. La produzione di idrogeno ottenuta è pari a 136.0 ± 5.3 mL/g_{SV}. Il valore ottenuto è notevolmente superiore rispetto a quelle ottenute durante la campagna sperimentale descritta in questo elaborato di tesi. Le ragioni possono essere molteplici. Nell'esperienza svolta è stato utilizzato un rapporto substrato – inoculo pari a 1, mentre nello studio citato è pari a 8.7. Quindi, una quantità maggiore di scarti alimentari ha potuto favorire la produzione di bioidrogeno. Un'altra possibile ragione potrebbe essere l'uso di un pretrattamento termico a 90 °C per 15 minuti più spinto rispetto ai 60 °C per 30 minuti utilizzati.

In un altro studio (Florio et al., 2018), sono stati valorizzati scarti alimentari tramite *dark fermentation*. Il substrato è stato pretrattato fisicamente e l'inoculo utilizzato è un digestato semiliquido, derivante da un impianto di digestione anaerobica. Il processo è stato condotto con un'alimentazione batch e un sistema di agitazione a 37 °C e pH pari a 5. Il tempo di ritenzione idraulica è pari a tre giorni. Il volume operativo è pari a 100 mL. La produzione di idrogeno ottenuta è pari a 24.9 ± 0.6 mL/g_{SV}. I risultati ottenuti nella seconda campagna sperimentale sono superiori ai risultati ottenuti in questo studio. Questo risultato può essere

dovuto al mancato utilizzo del pretrattamento dell'inoculo e alle dimensioni inferiori del reattore.

Nello studio condotto da (Cappai et al., 2018) è stata valutata l'influenza del rapporto substrato – inoculo sulla produzione di bioidrogeno, valorizzando scarti alimentari. La biomassa è stata pretrattata fisicamente, attraverso l'utilizzo di un frullatore. L'inoculo utilizzato comprende fanghi attivi derivanti da un'unità aerobica di trattamento delle acque reflue. La produzione massima è stata ottenuta con un rapporto substrato – inoculo pari a 7.13, pari a 89.8 mL/g_{SV}. È stata utilizzato un sistema con un'alimentazione batch e agitatore. La temperatura del processo è pari a 39 °C. Il pH iniziale è pari a 6.5 e il tempo di ritenzione idraulica è pari a due giorni. La produzione ottenuta è maggiore rispetto a quella ottenuta in questo elaborato. Una possibile spiegazione è il maggiore valore di rapporto substrato – inoculo utilizzato. L'inoculo utilizzato è presente in quantità minore rispetto alla biomassa, ma è stato in grado di degradarla e produrre una maggiore quantità di idrogeno. Questo indica che il rapporto substrato – inoculo è un parametro importante nel settaggio delle configurazioni da utilizzare nel processo di *dark fermentation*.

Per valutare la differenza tra un sistema batch e un sistema in continuo, si può considerare lo studio condotto da Nam et al. (2016) per quanto riguarda la valorizzazione di un mix di rifiuti alimentari e fanghi, pretrattati basicamente con idrossido di potassio, mediante *dark fermentation*. L'inoculo utilizzato è stato pretrattato a 90 °C per 15 minuti. L'alimentazione è in continuo e il tempo di ritenzione idraulica è pari a tre giorni. La produzione massima di idrogeno è pari a 62 mL/g_{SV}. I risultati ottenuti nella campagna sperimentale di tesi non si discostano molto da quanto ottenuto nella ricerca citata, che ha previsto una tipologia di alimentazione differente che potrebbe favorire la produzione del prodotto, alimentando sempre nuovo substrato.

In un altro studio (Zhou et al., 2013), è stata valutata la capacità dell'inoculo, derivante dalla digestione anaerobica, di valorizzare i substrati con le seguenti composizioni: scarti alimentari – fango primario (75 – 25 %), scarti alimentari – scarti di fanghi attivi (90 – 10 %), scarti alimentari – fango primario – scarti di fanghi attivi (80 – 15 – 5 %). L'inoculo è stato pretrattato termicamente a 70 °C per 30 minuti. L'alimentazione del sistema è batch e si è usato un sistema di agitazione. Il pH è pari a 5.5 e la temperatura è pari a 37 °C. Il volume operativo del reattore è pari a 180 mL. Le produzioni ottenute sono pari a 130, 141 e 164 mL/g_{VS}, rispettivamente per scarti alimentari – fango primario (75 – 25 %), scarti alimentari – scarto di fanghi attivi (90 – 10 %), scarti alimentari – fango primario – scarti di fanghi attivi (80 – 15 – 5 %). I risultati ottenuti non sono in linea con quanto ottenuto da questo studio, ma si può notare che la presenza maggiore di scarti alimentari incrementa la resa in idrogeno, come ottenuto nella seconda campagna sperimentale.

In *tabella 7.6* sono rappresentati i valori dei solidi totali e dei solidi volatili dei residui solido-liquido di ogni configurazione reattoristica utilizzate nel corso della seconda campagna. Si può notare come i valori dei solidi totali siano per la maggior parte vicini al 6% (valore utilizzato per i calcoli effettuati nel set-up di ogni esperimento). Inoltre, i valori relativi ai solidi volatili calcolati rispetto ai solidi totali sono relativamente bassi. Nonostante questo, i valori ottenuti dai residui indicano che il contenuto organico è ancora presente. Conseguentemente, potrebbe essere una buona soluzione utilizzare i digestati della *dark fermentation*, settata come descritto nel *sottocapitolo 6.3*, come biomassa per un processo di digestione anaerobica. Nella terza campagna sperimentale è stato utilizzato un processo di digestione anaerobica a doppio stadio, sfruttando il contenuto organico ancora presente all'interno dei digestati della fermentazione.

Tabella 7.6 – Rappresentazione dei valori dei solidi totali e dei solidi volatili su solidi totali dei digestati per ogni configurazione reattoristica della campagna sperimentale 2

Configurazione	Solidi totali (ST %)	Solidi volatili su solidi totali (SV/ST %)
SACCmA	5.18	85.56
SACCmB	4.98	84.19
MARMmA	6.01	85.98
MARMmB	3.82	86.24
ORTSACCmA	6.23	90.63
ORTSACCmB	5.98	92.80
ORTMARMmA	4.84	92.24
ORTMARMmB	3.55	87.47

In *tabella 7.7* è rappresentata la composizione elementare dei digestati di ogni configurazione utilizzata per la seconda campagna sperimentale. Si può notare come i valori dei rapporti C/N di tutte le configurazioni reattoristiche siano inferiori a 15. Questo indica un basso contenuto organico all'interno dei residui. Se dovessero essere utilizzati come biomassa per un eventuale processo di digestione anaerobica, verrebbero miscelati con inoculo con un certo quantitativo di carbonio, rappresentato in *tabella 6.2*. In questo modo il rapporto C/N del sistema complessivo verrà incrementato.

Tabella 7.7 – Composizione elementare dei digestati per ogni configurazione reattoristica della seconda campagna sperimentale

Configurazione	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
SACCmA	3.63	39.70	4.95	4.29	47.43	10.97
SACCmB	3.71	40.18	5.33	2.17	48.61	10.93
MARMmA	3.99	42.21	5.48	1.49	46.85	10.60
MARMmB	3.53	41.50	5.39	1.19	48.38	12.03
ORTSACCmA	3.54	41.75	5.70	0.94	48.08	11.82
ORTSACCmB	3.36	43.80	6.13	0.85	45.85	13.18
ORTMARMmA	4.77	47.62	5.77	0.74	41.10	9.99
ORTMARMmB	5.34	49.58	5.95	0.84	38.29	9.29

In funzione delle ultime considerazioni effettuate, nella terza campagna sperimentale è stato condotto un processo di digestione anaerobica a doppio stadio, al fine di valorizzare il digestato della *dark fermentation* per la produzione di metano.

7.3. Campagna sperimentale 3: digestione anaerobica a doppio stadio

Nella terza campagna sperimentale è stata effettuata la digestione anaerobica a doppio stadio, testando diversi rapporti biomassa:inoculo e il pretrattamento termico della biomassa, per valutare se migliorasse la sua degradabilità. L'inoculo è stato pretrattato a 60 °C per 30 minuti (come dimostrato nella prima campagna sperimentale). Il pretrattamento della biomassa è stato eseguito a 60 °C per 30 minuti. Il primo stadio fermentativo è stato impostato per produrre idrogeno, valutando il pretrattamento termico della biomassa e differenti rapporti substrato – inoculo. Il secondo stadio vede un processo di digestione anaerobica, dove è stato utilizzato il digestato del primo stadio come unico substrato in rapporto 1:1 con l'inoculo.

In *tabella 7.8* sono rappresentate le configurazioni utilizzate nel primo stadio della terza campagna sperimentale.

Tabella 7.8 – Riepilogo configurazioni del primo st. della campagna sperimentale 3

Configurazione	Pretrattamento termico substrato	SV_{substrato}:SV_{inoculo}
BIO/INOC	No	1-1
2BIO/INOC	No	2-1
BIOTERM/INOC	Si	1-1
2BIOTERM/INOC	Si	2-1

7.3.1. Primo stadio: *dark fermentation*

In *tabella 7.9* si possono osservare i valori di pH iniziali e finali relativi alla *dark fermentation* del primo stadio della terza campagna sperimentale.

Tabella 7.9 – Rappresentazione dei valori di pH prima e dopo il processo nel primo stadio della terza campagna sperimentale

Configurazione	pH iniziale	pH finale
BIO/INOC	7.23	5.81
2BIO/INOC	7.05	4.39
BIOTERM/INOC	7	6.1
2BIOTERM/INOC	7	4.29

In *figura 7.16* è presente la rappresentazione grafica dei valori di pH iniziali e finali ottenuti per la terza campagna sperimentale. Dalla *figura 7.16* e dalla *tabella 7.13* è evidente come il pH tenda a diminuire verso valori acidi. Le configurazioni che subiscono una forte acidificazione hanno prodotto un quantitativo di acidi organici tale da portare il sistema in condizioni acide tale da ostacolare la *dark fermentation*. Le uniche configurazioni che hanno mantenuto il pH finale intorno a 6 sono le configurazioni con un rapporto biomassa:inoculo pari a 1:1 (BIOTERM/INOC e BIO/INOC) e sono le uniche configurazioni che producono una quantità di idrogeno rilevante, come mostrato in *figura 7.17*.

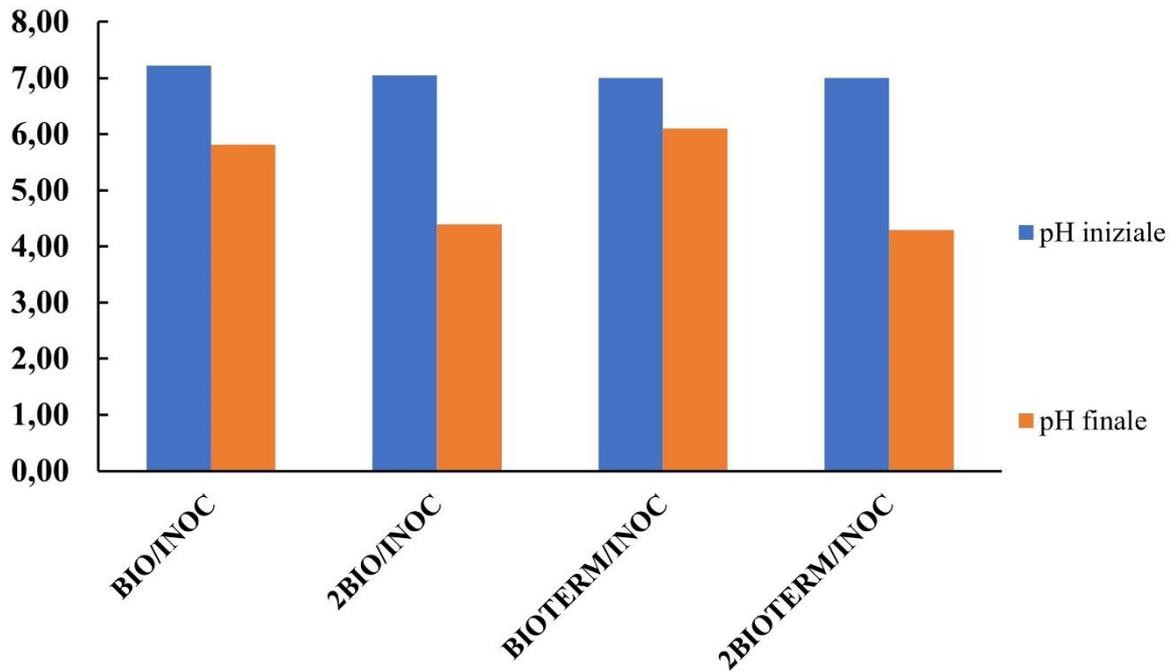


Figura 7.16 - Diagramma a colonne rappresentante le variazioni di pH per le configurazioni del primo stadio della terza campagna sperimentale

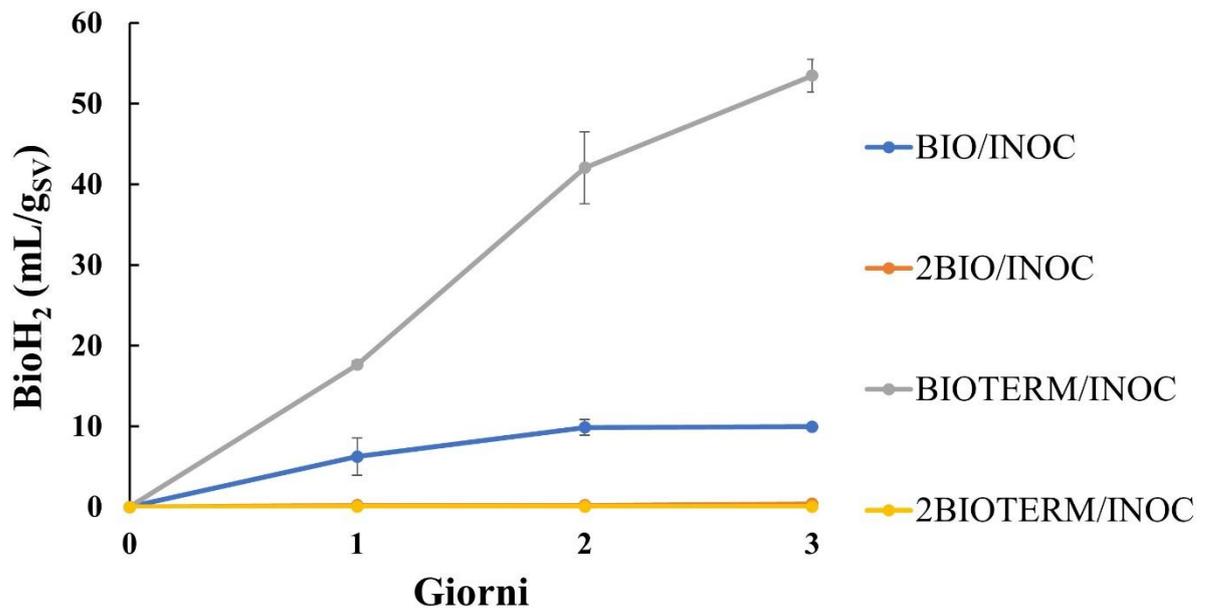


Figura 7.17 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioH₂ per il primo stadio della terza campagna sperimentale

In figura 7.17 sono rappresentate le curve di produzione cumulata di bioidrogeno per il primo stadio della terza campagna sperimentale. Si può notare come la produzione di idrogeno sia rilevante solo per le configurazioni con un rapporto biomassa:inoculo pari a 1:1. Probabilmente l'inoculo non è stato in grado di degradare l'eccessiva biomassa, nelle configurazioni con rapporto biomassa-inoculo pari a 2, e questo ha portato ad ottenere una produzione di idrogeno trascurabile. La produzione di bioidrogeno per le configurazioni attive, BIO/INOC e BIOTERM/INOC, sono pari a 9.96 ± 0.12 e 53.5 ± 2.0 mL/gsv, rispettivamente. La configurazione BIOTERM/INOC non raggiunge il plateau; quindi, avrebbe potuto continuare a produrre ulteriore idrogeno. Questo risultato può essere dovuto

al pretrattamento termico applicato alla biomassa. Probabilmente è stata resa più accessibile ai microrganismi produttori di idrogeno.

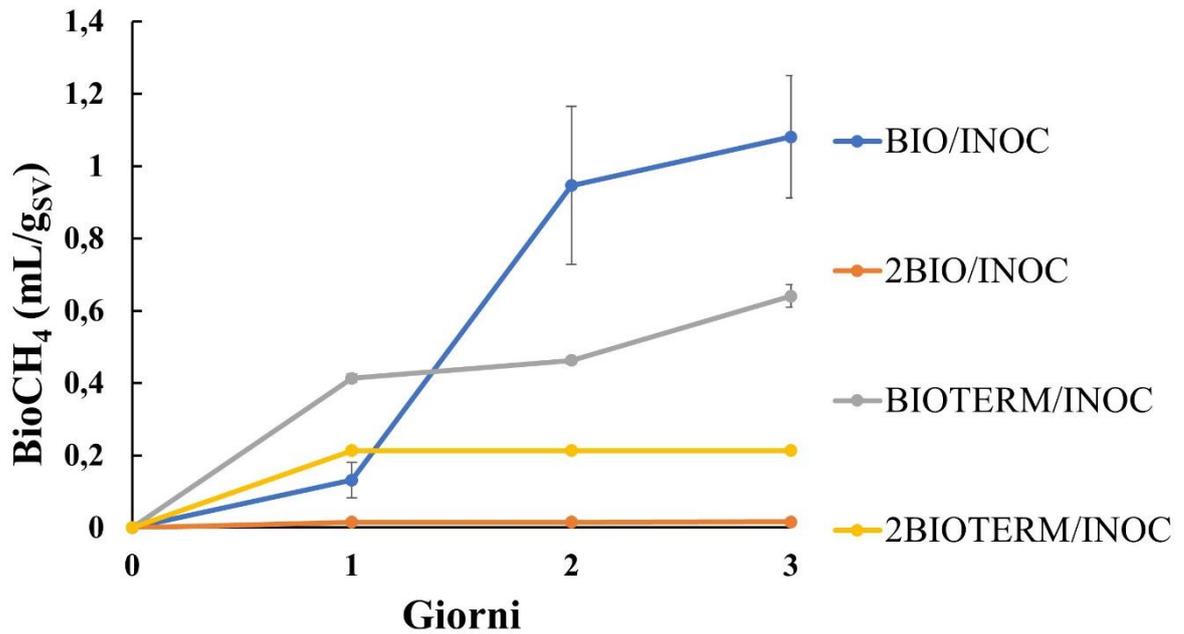


Figura 7.18 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioCH_4 per il primo stadio della terza campagna sperimentale

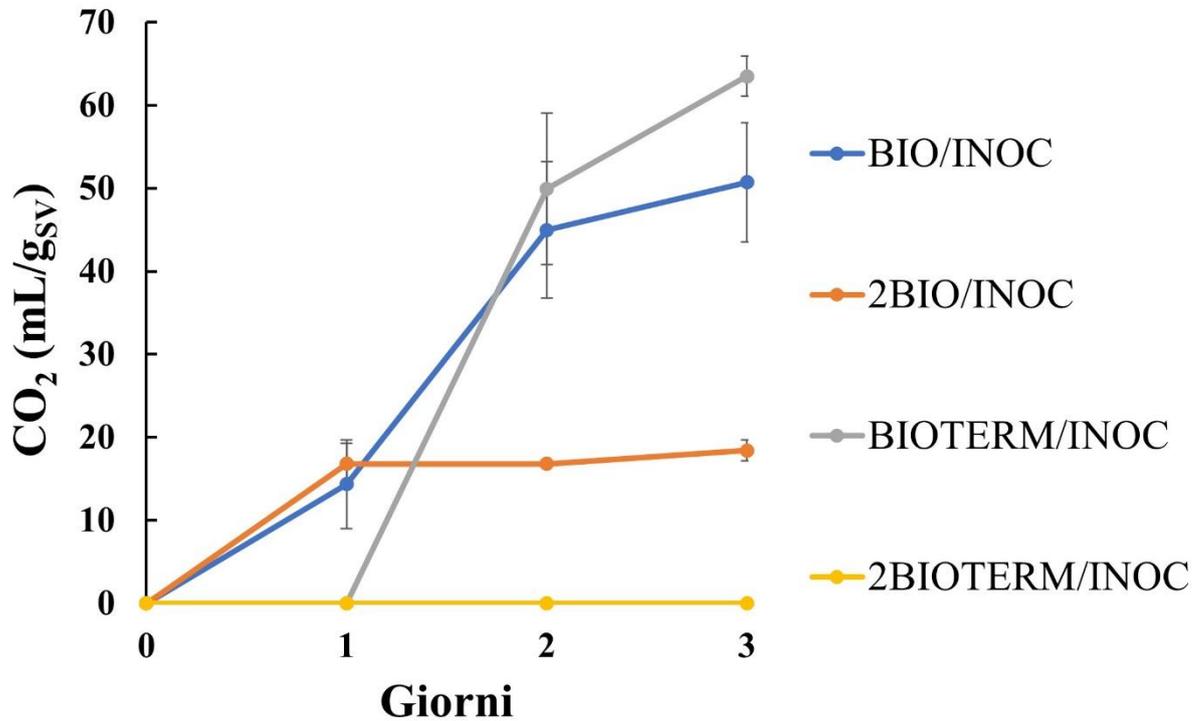


Figura 7.19 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di CO_2 per il primo stadio della terza campagna sperimentale

In *figura 7.18* si possono osservare le curve di produzione cumulata di biometano ottenute nel primo stadio della terza campagna sperimentale. La configurazione con rapporto biomassa-inoculo pari a due e biomassa non pretrattata (2BIO/INOC) produce metano in quantità trascurabili. Tutte le altre configurazioni producono un quantitativo di metano trascurabile rispetto al quantitativo di idrogeno prodotto.

In *figura 7.19* sono rappresentate le curve di produzione cumulata di anidride carbonica ottenute nel primo stadio della terza campagna sperimentale. Si nota come la produzione di anidride carbonica sia maggiore per le configurazioni che producono un quantitativo rilevante di bioidrogeno. Infatti, nella *dark fermentation* i prodotti principali sono l'idrogeno e l'anidride carbonica. Si può concludere che per le configurazioni con rapporto substrato-inoculo pari a uno, l'impostazione del processo fermentativo è stata eseguita correttamente.

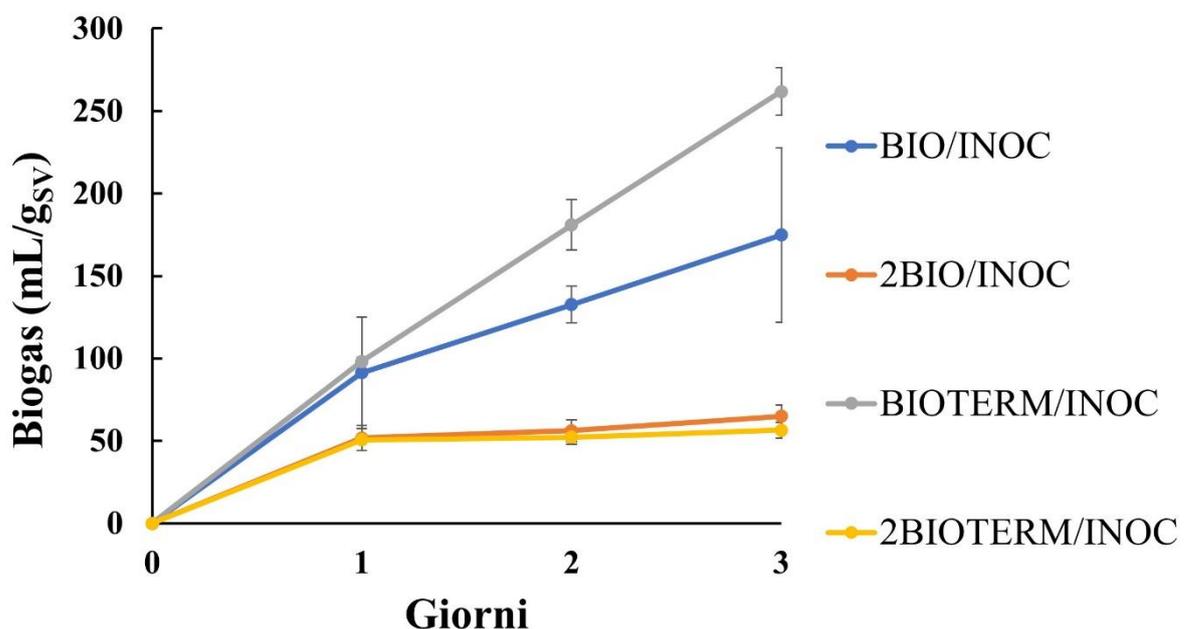


Figura 7.20 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di biogas per il primo stadio della terza campagna sperimentale

In *figura 7.20* sono rappresentate le curve di produzione cumulata di biogas per il primo stadio della terza campagna sperimentale. Si può notare come tutte le configurazioni risultino attive nella produzione di biogas. Le configurazioni, che producono idrogeno in quantità trascurabile, avranno quindi prodotto maggiormente anidride carbonica, come mostrato in *figura 7.19* per la configurazione 2BIO/INOC, o altri sottoprodotti gassosi. Si può concludere che il processo di *dark fermentation* è stato settato correttamente, in quanto le due configurazioni che producono maggiormente biogas sono le maggiori produttrici di bioidrogeno. La configurazione BIOTERM/INOC ha prodotto una quantità di biogas pari a 262 ± 14 mL/gsv, mentre la configurazione BIO/INOC ha prodotto biogas pari a 175 ± 53 mL/gsv.

Il grafico a torta relativo alla composizione del biogas prodotto per la configurazione di maggiore interesse (BIOTERM/INOC) è rappresentato in *figura 7.21*. Si nota immediatamente che i componenti del biogas non sono esclusivamente anidride carbonica e idrogeno. Questo indica che il processo di *dark fermentation* ha portato alla formazione di altri sottoprodotti e non solo dei prodotti di nostro interesse (H_2 e CO_2). Una possibile

spiegazione può essere che il pretrattamento termico non sia stato sufficiente ad eliminare tutti i microrganismi non produttori di idrogeno presenti all'interno dell'inoculo.

BIOTERM/INOC

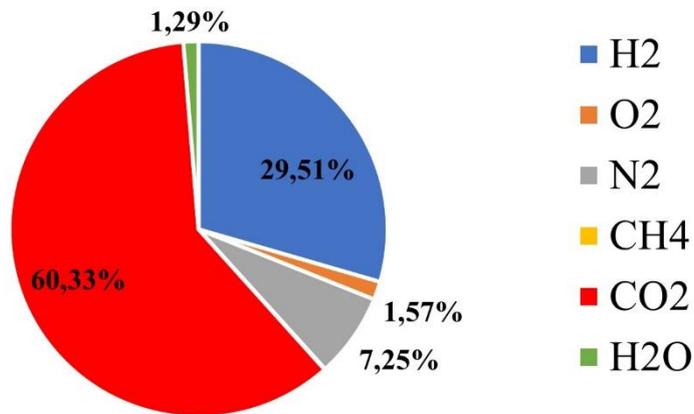


Figura 7.21 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “BIOTERM/INOC” del primo st. della campagna sperimentale 3

In tabella 7.10 sono rappresentati i valori dei solidi totali e dei solidi volatili dei residui solido-liquido di ogni configurazione reattoristica utilizzate nel corso del primo stadio della terza campagna. Si può notare come i valori dei solidi totali siano vicini al 6% (valore utilizzato per i calcoli effettuati nel set-up di ogni esperimento) o superiore. Inoltre, i valori dei solidi volatili sono sopra al 90%. Conseguentemente, il contenuto organico dei residui del primo processo li rende utilizzabili come substrato per un secondo stadio di digestione anaerobica.

Tabella 7.10 – Rappresentazione dei valori dei solidi totali e dei solidi volatili su solidi totali dei digestati per ogni configurazione reattoristica del primo stadio della terza campagna sperimentale

Configurazione	Solidi totali (ST %)	Solidi volatili su solidi totali (SV/ST %)
BIO/INOC	5.53	94.07
2BIO/INOC	7.16	92.93
BIOTERM/INOC	6.04	94.89
2BIOTERM/INOC	6.46	93.31

In tabella 7.11 è rappresentata la composizione elementare dei residui di ogni configurazione utilizzata per il primo stadio della terza campagna sperimentale. Si può notare come i valori del rapporto carbonio – azoto siano inferiori a 15. Non è un valore eccessivamente elevato, ma il digestato verrà miscelato con un certo quantitativo di inoculo, caratterizzato da un certo contenuto organico. In questo modo, il rapporto C/N del sistema complessivo sarà maggiore.

Tabella 7.11 – Analisi elementare dei digestati per ogni configurazione reattoristica del primo stadio della terza campagna sperimentale

Configurazione	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
BIO/INOC	6.82	67.45	6.60	1.31	17.82	9.89
2BIO/INOC	3.86	45.74	5.50	0.88	44.02	11.84
BIOTERM/INOC	5.59	58.43	6.63	1.13	28.23	10.45
2BIOTERM/INOC	4.23	51.33	5.99	0.75	37.70	12.15

7.3.2. Secondo stadio: digestione anaerobica

I digestati del primo stadio fermentativo sono stati utilizzati come substrato per il secondo stadio di digestione anaerobica. In questo caso il rapporto biomassa – inoculo è pari a uno e la biomassa non ha subito alcuna tipologia di pretrattamento. In *tabella 7.12* si possono osservare i valori di pH iniziali e finali relativi al secondo stadio di digestione anaerobica della terza campagna sperimentale.

Tabella 7.12 – Rappresentazione dei valori di pH prima e dopo il processo del secondo stadio della terza campagna sperimentale

Configurazione	pH iniziale	pH finale
BIO/INOC	7.25	8
2BIO/INOC	7.08	8
BIOTERM/INOC	7.56	8
2BIOTERM/INOC	7.05	8

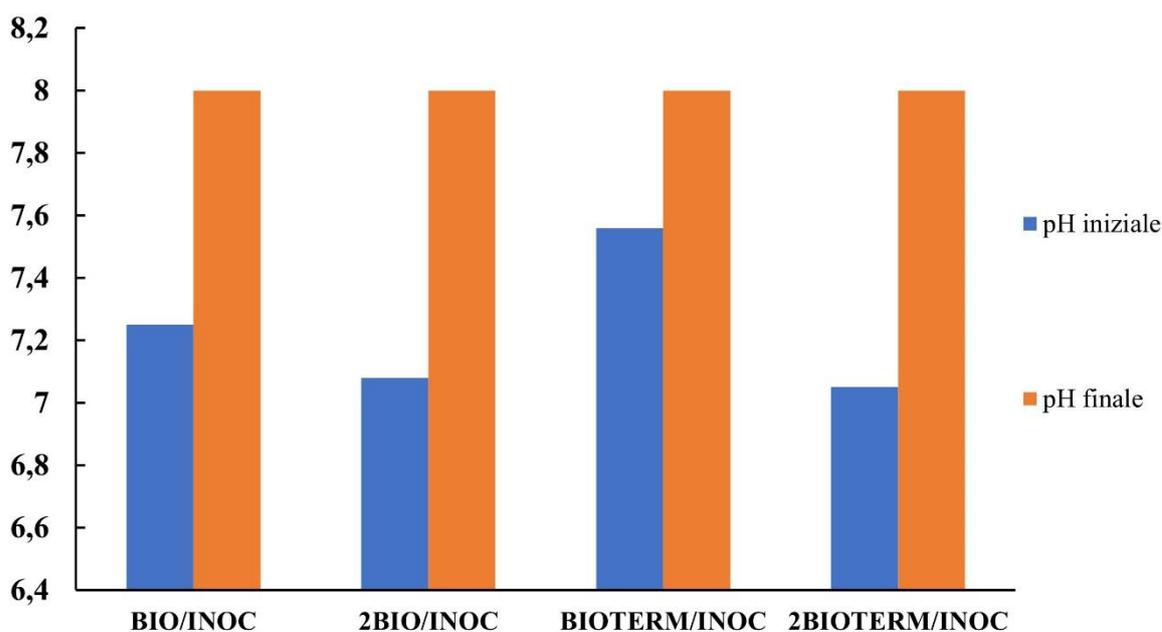


Figura 7.22 – Diagramma a colonne rappresentante le variazioni di pH per le configurazioni del secondo stadio della terza campagna sperimentale

In *figura 7.22* è presente la rappresentazione grafica dei valori di pH iniziali e finali ottenuti per la seconda campagna sperimentale. Dalla *figura 7.22* e dalla *tabella 7.12* è evidente come i valori dei pH tendano ad aumentare fino a un valore basico, pari a 8. Questa è una tendenza opposta a quanto visto finora, proprio perché il processo impostato è la digestione anaerobica. Rispetto alla *dark fermentation*, in cui vi è la produzione di composti acidi, la digestione anaerobica è caratterizzata da una fase finale di metanogenesi per cui il pH del sistema tende a incrementare.

In *figura 7.23* vi è la rappresentazione grafica delle curve di produzione cumulata di biometano, che è il prodotto principale del secondo stadio della terza campagna.

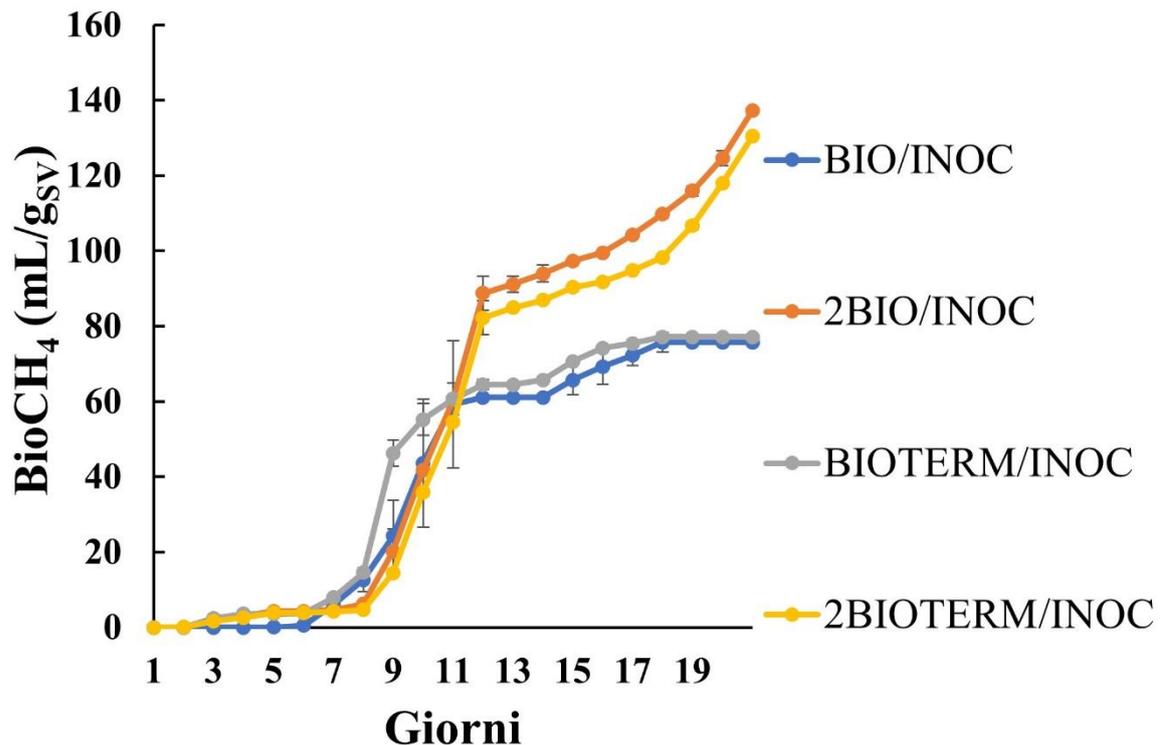


Figura 7.23 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioCH₄ per il secondo stadio della terza campagna sperimentale

Dalla *figura 7.23* si nota che tutte le configurazioni utilizzate producono metano con andamenti differenti. Le configurazioni BIO/INOC e BIOTERM/INOC presentano un andamento simile con una fase di latenza di circa sei giorni seguita da una fase esponenziale e il plateau viene raggiunto entro al diciottesimo giorno di processo. Differentemente, le configurazioni 2BIO/INOC e 2BIOTERM/INOC presentano una fase di latenza pari a otto giorni, a cui segue una fase esponenziale che sembra continuare anche oltre il ventesimo giorno. Probabilmente, avrebbero potuto continuare a produrre metano anche oltre il tempo di fine processo imposto. Le configurazioni BIO/INOC e BIOTERM/INOC producono una quantità di metano pari a 75.7 e 77.1 mL/gsv, rispettivamente. Una spiegazione per cui non si ottiene una produzione di metano maggiore riguarda la produzione di idrogeno e anidride carbonica nel primo stadio. Infatti, le due configurazioni sono le uniche ad aver prodotto un quantitativo di idrogeno e anidride carbonica rilevante; per questa ragione, parte del carbonio presente nella biomassa iniziale è stato convertito in anidride carbonica nel primo stadio. Conseguentemente, nel digestato utilizzato come biomassa il quantitativo di carbonio da convertire in metano sarà minore rispetto alle configurazioni che non hanno prodotto un quantitativo rilevante di anidride carbonica nel primo stadio. Le configurazioni

2BIO/INOC e 2BIOTERM/INOC ottengono una produzione di metano pari a 137.0 ± 0.1 e 130 mL/gsv, rispettivamente.

In *figura 7.24* vi è la rappresentazione grafica delle curve di produzione cumulata di anidride carbonica per il secondo stadio della terza campagna sperimentale.

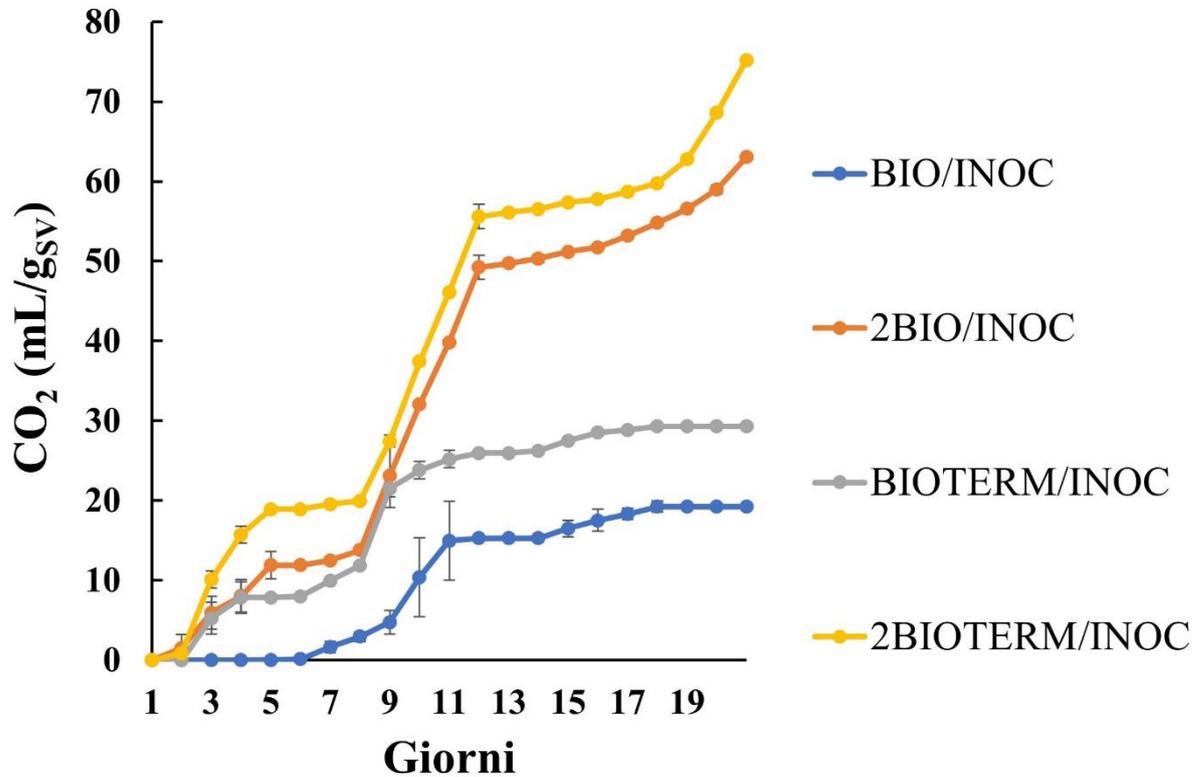


Figura 7.24 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di CO₂ per il secondo stadio della terza campagna sperimentale

L'anidride carbonica è il prodotto principale insieme al metano e si evince dalla *figura 7.24* che la produzione di CO₂ per tutte le configurazioni avviene con un andamento simile a quanto visto per il metano in *figura 7.23*.

In *figura 7.25* vi è la rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioidrogeno per il secondo stadio della terza campagna sperimentale. Le curve rappresentate sono importanti, in quanto permettono di comprendere che la digestione anaerobica è stata impostata correttamente. Infatti, non ci si aspetta che venga prodotto idrogeno. Alcune configurazioni non lo producono minimamente, mentre altre iniziano a produrlo per poi bloccare la produzione al terzo giorno.

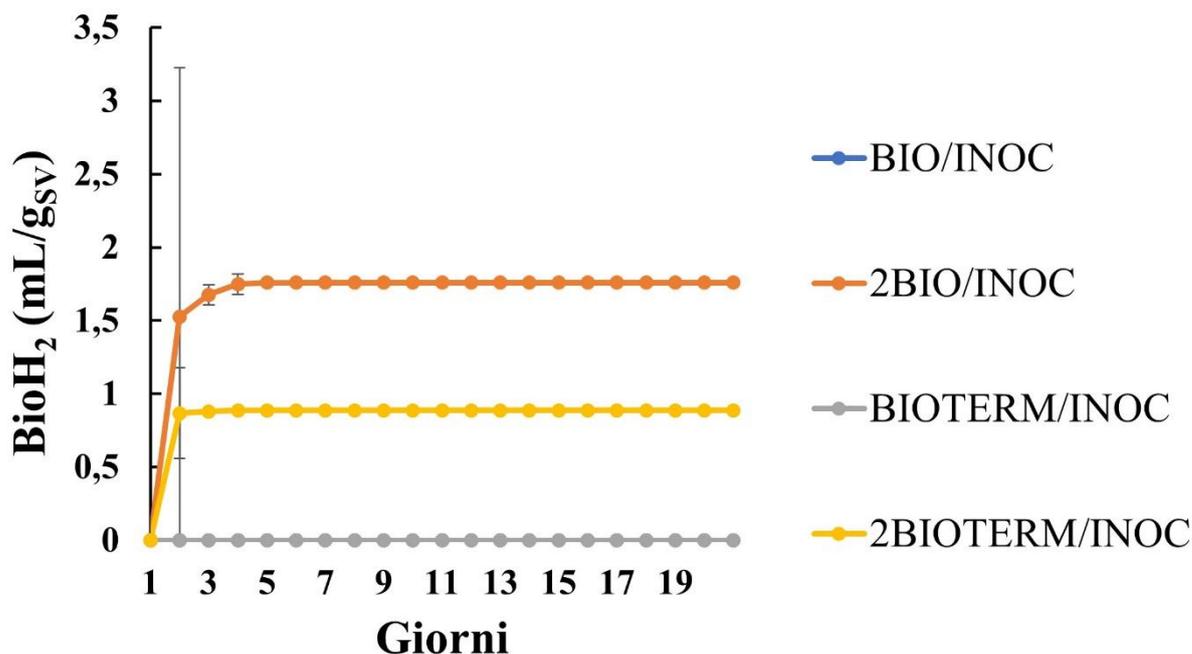


Figura 7.25 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di bioH₂ per il secondo stadio della terza campagna sperimentale

In figura 7.26 sono rappresentate le curve di produzione cumulata di biogas per il secondo stadio della terza campagna sperimentale.

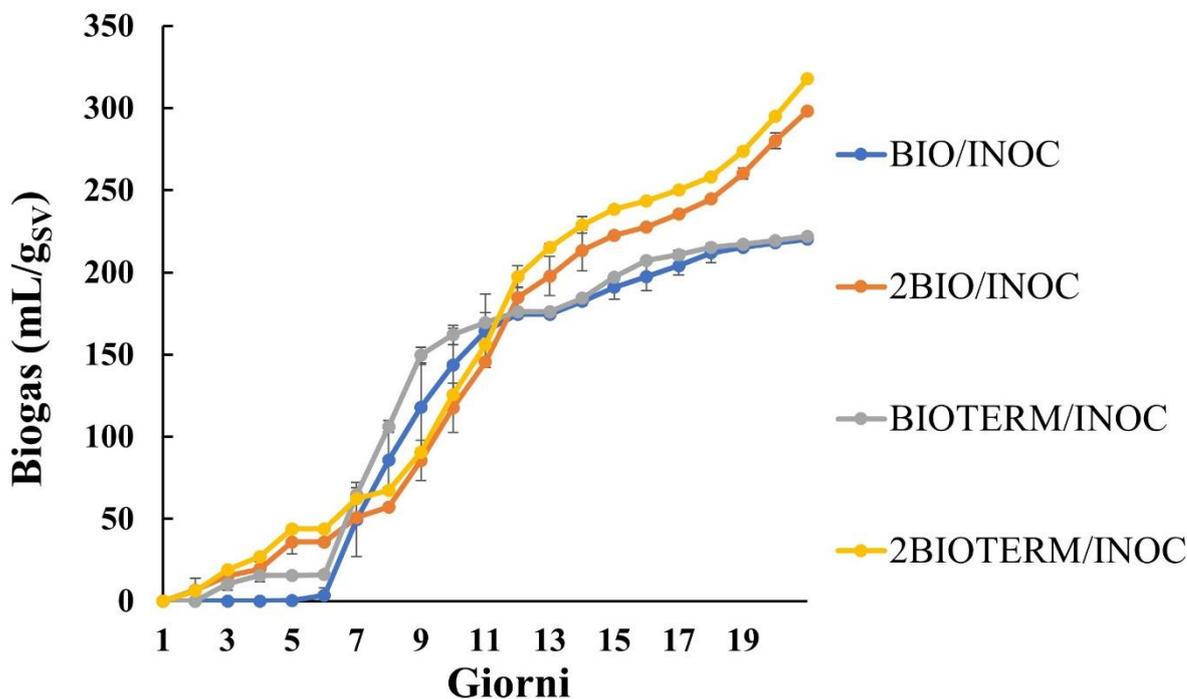


Figura 7.26 – Rappresentazione grafica relativa alla produzione cumulata di biogas per il secondo stadio della terza campagna sperimentale

Dalla figura 7.26 si nota come la produzione di biogas abbia un andamento simile alla produzione di metano. In particolare, le configurazioni BIO/INOC e BIOTERM/INOC raggiungono un plateau e producono un quantitativo di biogas pari a 220 ± 0.64 e 222 ± 1.3 mL/g_{sv}, rispettivamente. Mentre le configurazioni 2BIO/INOC e 2BIOTERM/INOC non

raggiungono un plateau e avrebbero potuto continuare a produrre biogas oltre il tempo di processo imposto. La produzione massima ottenuta è pari a 298.0 ± 0.1 e 318 mL/gsv , rispettivamente.

La configurazione di maggiore interesse è BIOTERM/INOC, in quanto è l'unica ad avere prodotto una quantità di idrogeno rilevante durante il primo stadio. Utilizzando il digestato del primo stadio, come substrato per la digestione anaerobica, è stata ottenuta una produzione rilevante di metano.

Il grafico a torta relativo alla composizione del biogas prodotto per la configurazione di maggiore interesse (BIOTERM/INOC) è rappresentato in *figura 7.27*. Si nota immediatamente che i componenti del biogas sono esclusivamente anidride carbonica e metano. Infatti, vi è la presenza di minime tracce di ossigeno, azoto e acqua. La presenza di prodotti secondari è trascurabile rispetto ai prodotti principali che costituiscono più del 95% del biogas prodotto. Questo indica che il processo di digestione anaerobica è stato impostato correttamente.

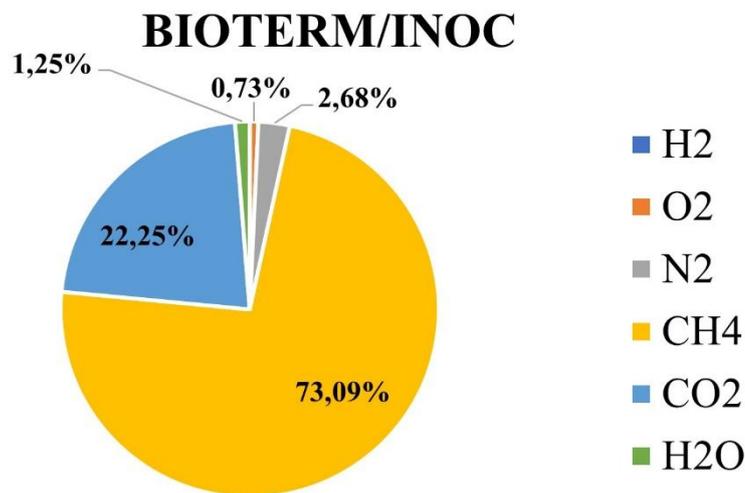


Figura 7.27 – Rappresentazione grafica relativa alla composizione di biogas per la configurazione “BIOTERM/INOC” del secondo st. della campagna sperimentale 3

In *tabella 7.13* sono rappresentati i valori dei solidi totali e dei solidi volatili dei digestati di ogni configurazione reattoristica utilizzate nel corso del secondo stadio della terza campagna. Si può notare come i valori dei solidi volatili e dei solidi totali siano ridotti notevolmente rispetto ai valori iniziali, presenti in *tabella 7.10*. Quindi, il contenuto organico presente nel digestato del primo stadio è stato degradato nel secondo stadio.

Tabella 7.13 – Rappresentazione dei valori dei solidi totali e dei solidi volatili su solidi totali dei digestati per ogni configurazione del secondo st. della campagna sperimentale 3

Configurazione	Solidi totali (ST %)	Solidi volatili su solidi totali (SV/ST %)
BIO/INOC	4.70	88.04
2BIO/INOC	6.06	43.08
BIOTERM/INOC	4.79	80.54
2BIOTERM/INOC	5.48	80.67

In *tabella 7.14* è rappresentata la composizione elementare dei residui di ogni configurazione utilizzata per il secondo stadio della terza campagna sperimentale. Si può notare come i valori dei rapporti C/N di tutte le configurazioni siano comunque vicino a 10.

Tabella 7.14 – Composizione elementare dei digestati per ogni configurazione reattoristica del secondo stadio della terza campagna sperimentale

Configurazione	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
BIO/INOC	5.30	57.79	6.08	0.81	30.03	10.90
2BIO/INOC	7.18	64.86	6.05	1.08	20.84	9.02
BIOTERM/INOC	7.75	71.12	5.83	1.28	14.02	9.18
2BIOTERM/INOC	3.26	74.82	4.69	1.22	16.02	9.87

È stato effettuato il calcolo del potere calorifico superiore (HHV), nelle modalità descritte nel *sottocapitolo 6.6*. In *tabella 7.15* sono presenti i valori di potere calorifico superiore per i digestati del primo stadio della terza campagna sperimentale e scarti alimentari.

Tabella 7.15 – Rappresentazione relativa ai valori del potere calorifico superiore per i digestati delle configurazioni reattoristiche del secondo stadio della terza campagna sperimentale e scarti alimentari

Configurazione	HHV (MJ/kg)
BIO/INOC	29.59
2BIO/INOC	17.90
BIOTERM/INOC	25.38
2BIOTERM/INOC	21.08
Scarti alimentari	15.90

I valori ottenuti dal calcolo del potere calorifico superiore rappresentati in *tabella 7.15* sono in linea con i valori dei digestati utilizzati nello studio condotto da Timofeeva et al., (2023). In particolare, il digestato derivato dalla digestione anaerobica di letame di vacca presenta un valore pari a 14.26 MJ/kg mentre il digestato derivato dalla digestione anaerobica di rifiuti agro-industriali presenta un valore pari a 18.60 MJ/kg. Infine, i digestati derivati dalla *dark fermentation* di una miscela di sottoprodotti di cereali, crusca, farina di girasole e colza presenta un valore pari a 21.76 MJ/kg. Si può concludere che i digestati del primo stadio della terza campagna e gli scarti alimentari possono essere utilizzati come substrati per il secondo stadio di digestione anaerobica.

7.3.3. Confronto valori di produzione di idrogeno e metano

La configurazione più interessante per il processo a doppio stadio è la configurazione BIOTERM/INOC. La produzione di idrogeno nel primo stadio è pari a 53.5 ± 2.0 mL/g_{sv}, mentre la produzione di metano nel secondo stadio è pari a 77.1 mL/g_{sv}.

Lo studio di Saidi et al. (2023) presenta un processo a doppio stadio per valorizzare degli scarti di frutta, pretrattati fisicamente attraverso l'uso di un frullatore. L'inoculo utilizzato prevede dei fanghi anaerobici, prelevati da un impianto di digestione anaerobica. L'inoculo

ha subito un pretrattamento termico a 105 °C per 20 minuti per il primo stadio. Il reattore è semi-continuo con agitatore e si è lavorato con un volume operativo pari a un litro nel primo stadio e 1.3 litri nel secondo. Nel primo stadio si è lavorato alle seguenti condizioni: 37 °C, pH pari a 6, tempo di ritenzione idraulica pari a circa cinque giorni. La produzione di idrogeno è pari a 81.6 mL/g_{VS}. Il secondo stadio è stato condotto, utilizzando come substrato l'effluente della *dark fermentation* (primo stadio). La configurazione reattoristica è la stessa e le condizioni operative sono le seguenti: 37 °C, pH pari a 7.3 e un tempo di ritenzione idraulica pari a otto giorni. La produzione di metano è pari a 530 mL/g_{VS}. Si può evincere come i risultati ottenuti in questo studio siano nettamente superiori ai risultati ottenuti in questo elaborato di tesi. Una possibile spiegazione può essere dovuta al pretrattamento termico dell'inoculo più spinto nel primo stadio, all'utilizzo di un reattore semi-continuo con agitatore.

La ricerca di Liu et al.(2022) presenta la coproduzione di bioidrogeno e biometano con una resa in idrogeno pari a 107.3 e una resa di metano pari a 308 mL/g_{SV}. Il primo stadio mira a valorizzare scarti alimentari e letame di pollo attraverso l'utilizzo di fanghi, prelevati da un impianto di trattamento delle acque reflue. Il rapporto substrato – inoculo è pari a 1.25. Nel primo stadio l'inoculo è stato pretrattato termicamente a 100 °C per 30 minuti, l'alimentazione è batch ed è stato utilizzato un agitatore. Il volume operativo per i due stadi è pari a 150 mL. Le condizioni operative del primo stadio fermentativo sono le seguenti: 37 °C e pH pari a 5.5. Il secondo stadio utilizza come substrato l'effluente del primo processo e come inoculo i fanghi precedentemente utilizzati. Il rapporto substrato – inoculo è pari a 1.8, non vi sono pretrattamenti vari e si è lavorato in batch. La temperatura di processo è pari a 37 °C e il pH pari a 7. I risultati ottenuti in questa ricerca sono superiori rispetto ai risultati ottenuti durante la terza campagna sperimentale. Una possibile spiegazione può essere il pretrattamento termico più spinto nel primo stadio per la produzione di idrogeno e l'utilizzo di un rapporto substrato – inoculo maggiore, pari a 1.8, nel secondo stadio per la produzione di metano. Infatti, nell'esperienza descritta nel *sottocapitolo 6.4.1, quando il rapporto substrato – inoculo è pari a uno, si rileva una produzione minore di metano.*

Nello studio condotto da Yuan et al., (2019) sono stati valorizzati scarti alimentari utilizzando fanghi anaerobici, prelevati da un impianto di digestione anaerobica. Il rapporto substrato – inoculo è pari a 64:1 per entrambi gli stadi. La produzione di idrogeno nel primo stadio è pari a 217.97 mL/g_{SV} e la produzione di metano nel secondo stadio è pari a 431.58 mL/g_{SV}. Si è lavorato con un'alimentazione batch. Il primo stadio presenta pH compreso tra 6.8 e 8, temperatura pari a 35 °C e un tempo di ritenzione idraulica di circa sette giorni, mentre il secondo stadio presenta pH iniziale pari a 7, la medesima temperatura del primo stadio e un tempo di ritenzione idraulica pari a 18 giorni. Il volume operativo del primo reattore è pari a 150 mL, mentre il volume operativo del secondo reattore è pari a 300 mL. È evidente come il parametro fondamentale è il rapporto substrato – inoculo. Nello studio condotto in questo elaborato di tesi si è utilizzato un rapporto substrato – inoculo pari a due nel primo stadio e pari a uno nel secondo stadio. Nella ricerca citata si utilizza un rapporto pari a 64 per entrambi gli stadi e, probabilmente, ha permesso una produzione di idrogeno e metano più elevata.

In un altro studio (Liu et al., 2013) è stata condotta la valorizzazione di rifiuti alimentari utilizzando una digestione anaerobica a doppio stadio. L'inoculo del primo stadio è rappresentato da fanghi attivi, e nel secondo stadio da un digestato, derivante da un processo di digestione anaerobica. I due processi sono stati condotti con un'alimentazione batch. L'inoculo utilizzato nel primo stadio è stato pretrattato termicamente a 100 °C per 30 minuti. Nel primo stadio vi è la presenza di un agitatore. Le condizioni operative del primo stadio sono: pH pari a 5.5, 37 °C e tempo di ritenzione idraulica di due giorni e mezzo. Il

secondo stadio ha utilizzato la medesima temperatura e un pH iniziale pari a 7. Il volume operativo di entrambi i reattori utilizzati è pari a 150 mL. La produzione di idrogeno nel primo stadio è pari a 121.1 mL/g_{SV} e il metano prodotto nel secondo stadio è pari a 321.9 mL/g_{SV}. I risultati ottenuti sono superiori a quelli condotti in questo elaborato di tesi. Una possibile ragione potrebbe essere l'utilizzo di due differenti inoculi per il primo e il secondo stadio. Inoltre, nel primo stadio è stato utilizzato un pretrattamento dell'inoculo più spinto.

8. Conclusioni

Nelle campagne sperimentali descritte in questo elaborato di tesi, si è mirato a valorizzare scarti alimentari ai fini della produzione di biogas mediante fermentazione e digestione anaerobica, utilizzando una coltura mista di microrganismi. Gli obiettivi principali sono: la produzione di idrogeno; utilizzare il digestato del processo di fermentazione come substrato per il processo di digestione anaerobica per la produzione di biometano. In questo modo, si può produrre un vettore energetico come H_2 a partire da scarti di biomassa e utilizzare lo scarto di tale processo come materia prima per la produzione di un altro prodotto di derivazione biologica come CH_4 .

La prima campagna sperimentale ha permesso di verificare: l'efficacia dei microrganismi produttori di idrogeno tramite *dark fermentation*, l'efficacia del pretrattamento termico nell'eliminare parte dei microrganismi produttori di metano presenti nell'inoculo, l'efficacia del terreno di coltura e la capacità dei microrganismi di scindere zuccheri di varia complessità. Al termine della campagna, si è concluso che il pretrattamento termico è stato utile all'eliminazione dei metanigeni e che il terreno di coltura non era strettamente necessario; inoltre, i microrganismi sono stati in grado di utilizzare come risorsa uno zucchero più complesso del glucosio, come il saccarosio, per la produzione di bioidrogeno. La produzione massima di idrogeno è stata di 28.87 mL/g_{vs}, utilizzando una configurazione contenente saccarosio e inoculo pretrattato termicamente a 60 °C per 30 minuti.

La seconda campagna sperimentale ha permesso di valutare se l'inoculo utilizzato fosse in grado di utilizzare scarti alimentari, come frutta e verdura, e scarti di altri processi come il residuo di acqua da un impianto di produzione di marmellata, come fonte nutrizionale per la produzione di biogas, in particolare idrogeno. Al termine della campagna, si è concluso che le configurazioni, contenenti scarti alimentari, hanno una buona capacità produttiva. La produzione massima di idrogeno ottenuta è pari a 49.1 mL/g_{vs}, utilizzando una configurazione contenente inoculo, pretrattato termicamente e una biomassa con la seguente composizione: 95 % scarti alimentari – 5 % *acqua di mirtillo*.

Una volta compreso che i microrganismi sono in grado di produrre idrogeno, si è pensato di effettuare una terza campagna sperimentale in cui è stata impostata una digestione anaerobica a doppio stadio, dove è stato utilizzato il residuo del processo di *dark fermentation*, destinato alla produzione di bioidrogeno, come substrato per la produzione di metano. In questo secondo stadio è stato utilizzato inoculo non pretrattato termicamente, in quanto non vi è la necessità di rimuovere microrganismi produttori di metano. L'obiettivo è verificare che il nostro sistema possa rientrare nei principi dell'economia circolare, producendo quantità rilevanti di idrogeno tramite scarti alimentari e utilizzare lo scarto di questo processo per la produzione di un ulteriore prodotto di derivazione biologica, come il biometano. Nel primo stadio è stato utilizzato inoculo pretrattato termicamente a 60 °C per 30 minuti, un rapporto substrato – inoculo pari a uno e biomassa pretrattata termicamente a 60 °C per 30 minuti. Questa configurazione ha prodotto una quantità di idrogeno pari a 53.5 ± 2.0 mL/g_{sv}. Nel secondo stadio è stato utilizzato il digestato della configurazione precedente in rapporto pari a uno con l'inoculo, non pretrattato termicamente. La produzione di metano è stata pari a 77.1 mL/g_{sv}. Si può concludere che la digestione anaerobica a doppio stadio ha avuto successo, in quanto è stato sfruttato il digestato di una configurazione, che ha prodotto idrogeno, come substrato per la produzione di metano. Sarebbe interessante provare ad ottimizzare il processo, cercando un compromesso tra la produzione di H_2 e CH_4 ; infatti, dalla *figura 7.23* e dalla *figura 7.17* è evidente che le

configurazioni che hanno prodotto meno idrogeno nel primo stadio, sono quelle che hanno prodotto maggiormente metano nel secondo.

9. Sviluppi futuri

Lo studio è stato condotto in scala di laboratorio e non è sufficiente a verificarne l'efficacia in ambito industriale. Per questa ragione, è necessario eseguire uno scale up e implementare il processo in un impianto pilota di medie dimensioni, con le opportune valutazioni energetiche ed economiche per comprendere il potenziale costo di investimento dell'impianto.

È fondamentale utilizzare scarti alimentari o rifiuti generici ai fini della produzione di composti di derivazione biologica, come biometano e bioidrogeno, per limitare al minimo l'impatto ambientale dei vari trattamenti di smaltimento dei rifiuti, per favorire la decarbonizzazione e ridurre l'effetto negativo sull'ambiente provocato dai combustibili fossili. In particolare, la produzione di bioidrogeno mediante metodi biologici è ancora un'area in via di sviluppo. Tuttavia, sarà necessario concentrarsi su questa tipologia di approccio per favorire la domanda energetica del futuro, che non potrà continuare a basarsi sui combustibili fossili.

Bibliografia

- Abbassi-Guendouz, A., Brockmann, D., Trably, E., Dumas, C., Delgenès, J. P., Steyer, J. P., & Escudié, R. (2012). Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation. *Bioresource Technology*, *111*, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.174>
- Al-Haddad, S., Okoro-Shekwa, C. K., Fletcher, L., Ross, A., & Camargo-Valero, M. A. (2023). Assessing Different Inoculum Treatments for Improved Production of Hydrogen through Dark Fermentation. *Energies*, *16*(3). <https://doi.org/10.3390/en16031233>
- Cao, J., Xu, C., Zhou, R., Duan, G., Lin, A., Yang, X., You, S., Zhou, Y., & Yang, G. (2022). Potato peel waste for fermentative biohydrogen production using different pretreated culture. *Bioresource Technology*, *362*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127866>
- Cappai, G., De Gioannis, G., Muntoni, A., Spiga, D., Boni, M. R., Poletini, A., Pomi, R., & Rossi, A. (2018). Biohydrogen production from food waste: Influence of the inoculum-to-substrate ratio. *Sustainability (Switzerland)*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/su10124506>
- Dahiya, S., Chatterjee, S., Sarkar, O., & Mohan, S. V. (2021). Renewable hydrogen production by dark-fermentation: Current status, challenges and perspectives. In *Bioresource Technology* (Vol. 321). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124354>
- Florio, C., Micoli, L., Ausiello, A., Pasquale, V., Turco, M., Pirozzi, D., Toscano, G., & Dumontet, S. (2018). Mesophilic dark fermentation of food waste for biohydrogen production in a mixed batch reactor. *Chemical Engineering Transactions*, *67*, 67–72. <https://doi.org/10.3303/CET1867012>
- Focker, M., van Asselt, E. D., Berendsen, B. J. A., van de Schans, M. G. M., van Leeuwen, S. P. J., Visser, S. M., & van der Fels-Klerx, H. J. (2022). Review of food safety hazards in circular food systems in Europe. In *Food Research International* (Vol. 158). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111505>
- Hosseinzadeh, A., Zhou, J. L., Li, X., Afsari, M., & Altaee, A. (2022). Techno-economic and environmental impact assessment of hydrogen production processes using bio-waste as renewable energy resource. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 156). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111991>
- Liu, X., Li, R., Ji, M., & Han, L. (2013). Hydrogen and methane production by co-digestion of waste activated sludge and food waste in the two-stage fermentation process: Substrate conversion and energy yield. *Bioresource Technology*, *146*, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.096>
- Magdalena, J. A., Pérez-Bernal, M. F., Bernet, N., & Trably, E. (2023). Sequential dark fermentation and microbial electrolysis cells for hydrogen production: Volatile fatty acids influence and energy considerations. *Bioresource Technology*, *374*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128803>
- Marshall, D., O'Dochartaigh, A., Prothero, A., Reynolds, O., & Secchi, E. (2023). Are you ready for the sustainable, biocircular economy? *Business Horizons*. <https://doi.org/10.1016/j.bushor.2023.05.002>
- Micolucci, F., Gottardo, M., Pavan, P., Cavinato, C., & Bolzonella, D. (2018). Pilot scale comparison of single and double-stage thermophilic anaerobic digestion of

- food waste. *Journal of Cleaner Production*, 171, 1376–1385.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.080>
- Mohanakrishna, G., Sneha, N. P., Rafi, S. M., & Sarkar, O. (2023). Dark fermentative hydrogen production: Potential of food waste as future energy needs. *Science of the Total Environment*, 888.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163801>
- Nam, J. Y., Kim, D. H., Kim, S. H., Lee, W., Shin, H. S., & Kim, H. W. (2016). Harnessing dark fermentative hydrogen from pretreated mixture of food waste and sewage sludge under sequencing batch mode. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(8), 7155–7161. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4880-1>
- Rafieenia, R., Lavagnolo, M. C., & Pivato, A. (2018). Pre-treatment technologies for dark fermentative hydrogen production: Current advances and future directions. *Waste Management*, 71, 734–748.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.024>
- Rajesh Banu, J., Merrylin, J., Mohamed Usman, T. M., Yukesh Kannah, R., Gunasekaran, M., Kim, S. H., & Kumar, G. (2020). Impact of pretreatment on food waste for biohydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(36), 18211–18225.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.09.176>
- Saidi, R., Hamdi, M., & Bouallagui, H. (2023). Enhanced hydrogen and methane production from date fruit wastes using semi continuous two-stage anaerobic digestion process with increasing organic loading rates. *Process Safety and Environmental Protection*, 174, 267–275.
<https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.04.018>
- Saleemdeen, R., zu Ermgassen, E. K. H. J., Kim, M. H., Balmford, A., & Al-Tabbaa, A. (2017). Environmental and health impacts of using food waste as animal feed: a comparative analysis of food waste management options. *Journal of Cleaner Production*, 140, 871–880.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.05.049>
- Senthil Rathi, B., Senthil Kumar, P., Rangasamy, G., & Rajendran, S. (2022). A critical review on Biohydrogen generation from biomass. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.10.182>
- Sharmila, V. G., Shanmugavel, S. P., & Banu, J. R. (2024). A review on emerging technologies and machine learning approaches for sustainable production of biofuel from biomass waste. *Biomass and Bioenergy*, 180, 106997.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106997>
- Siddique, M. N. I., Zaied, B. K., Kabir, M. N., & Ahmad, M. F. (2019). Progressive two-stage efficient codigestion of food waste and petrochemical wastewater for higher methane and hydrogen production. *Asian Journal of Chemistry*, 31(11), 2575–2578. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.22197>
- Timofeeva, S. S., Karaeva, J. V., Kovalev, A. A., Kovalev, D. A., & Litti, Y. V. (2023). Steam gasification of digestate after anaerobic digestion and dark fermentation of lignocellulosic biomass to produce syngas with high hydrogen content. *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(21), 7559–7568.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.260>
- Ubando, A. T., Chen, W. H., Hurt, D. A., Conversion, A., Rajendran, S., & Lin, S. L. (2022). Biohydrogen in a circular bioeconomy: A critical review. In *Bioresource Technology* (Vol. 366). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128168>

- Yagmur Goren, A., Dincer, I., & Khalvati, A. (2023). A comprehensive review on environmental and economic impacts of hydrogen production from traditional and cleaner resources. In *Journal of Environmental Chemical Engineering* (Vol. 11, Issue 6). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.111187>
- Yuan, T., Bian, S., Ko, J. H., Wu, H., & Xu, Q. (2019). Enhancement of hydrogen production using untreated inoculum in two-stage food waste digestion. *Bioresource Technology*, 282, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.020>
- Zheng, Y., Zhang, Q., Zhang, Z., Jing, Y., Hu, J., He, C., & Lu, C. (2022). A review on biological recycling in agricultural waste-based biohydrogen production: Recent developments. In *Bioresource Technology* (Vol. 347). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126595>
- Zhou, P., Elbeshbishy, E., & Nakhla, G. (2013). Optimization of biological hydrogen production for anaerobic co-digestion of food waste and wastewater biosolids. *Bioresource Technology*, 130, 710–718. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.069>

Ringraziamenti

Il percorso di tesi è stata un'esperienza molto importante per la mia crescita personale e per questa ragione vorrei ringraziare la Professoressa Tonia Tommasi per avermi dato la possibilità di cimentarmi in quest'attività, che è stata molto gratificante e istruttiva.

Inoltre, vorrei ringraziare la Professoressa Francesca Demichelis per avermi supportato durante le considerazioni e le analisi svolte nel corso della mia esperienza in laboratorio.

Infine, vorrei ringraziare anche la Dottoressa Gaia Mazzanti per avermi affiancato e permesso di imparare quanto più possibile dall'esperienza di laboratorio svolta.