

# **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

## **Un approccio di Economia Circolare per la produzione di bioidrogeno e biogas da sottoprodotti agroindustriali**



**Politecnico  
di Torino**

**Relatrice**

Prof.ssa Tonia Tommasi

**Correlatrice**

Prof.ssa Francesca Demichelis

**Candidato**

Giuseppe Diaferio  
Azzellino

A.A. 2023/2024

## **INDICE**

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>7</b>
<b>2. ECONOMIA CIRCOLARE E RIFIUTI AGROALIMENTARI</b> .....	<b>13</b>
2.1 Economia circolare .....	13
2.2. Gestione dei rifiuti .....	15
<b>3. METODI PER LA PRODUZIONE DI IDROGENO DA BIOMASSA</b> .....	<b>17</b>
3.1 Metodologie odierne .....	17
3.2 Biogas reformation .....	19
3.3 Gassificazione da biomassa.....	20
3.4 Pirolisi .....	21
3.5 Dark fermentation.....	22
<b>4. DIGESTIONE ANAEROBICA A DOPPIO STADIO</b> .....	<b>23</b>
4.1. Descrizione del processo.....	24
4.2. Condizioni operative .....	26
<b>5. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>27</b>
5.1. Inoculo.....	27
5.2. Substrato Sedamyl.....	28
5.2.1 Caratteristiche di produzione .....	29
5.2.2. Caratteristiche Sottoprodotti Sedamyl .....	30
5.3. Set-up digestione a doppio stadio .....	34
5.4 Campagne sperimentali .....	35
5.4.1 Fermentazione a doppio stadio .....	35
5.4.2 Implementazione Fermentazione a doppio stadio .....	37
5.4.3 DF e reinoculo.....	39
5.4.4. DF, scale-up e crescita microbica.....	40

5.5. Monitoraggio della produzione giornaliera di biogas .....	42
5.5.1. Analisi al gas cromatografo .....	44
5.5.2. Analisi elementare CHNSO .....	44
5.5.3. Analisi dei solidi totali e analisi dei solidi volatili.....	45
5.5.4. Peso Secco e Crescita microbica .....	47
<b>6. RISULTATI .....</b>	<b>48</b>
6.1. Caratterizzazione dell'inoculo .....	48
6.2. Risultati .....	56
6.2.1. Prima Campagna sperimentale .....	56
6.2.2. Seconda Campagna sperimentale .....	62
6.2.3. Terza Campagna sperimentale.....	67
6.2.4. Quarta Campagna sperimentale .....	70
<b>7. CONCLUSIONI .....</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>76</b>
<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>81</b>

## **Indice delle Figure**

- Figura 1.1 - Utilizzo di rifiuti organici per la produzione di idrogeno e metano (Pagina 4)
- Figura 2.1 - Economia circolare dei rifiuti agroalimentari (Pagina 8)
- Figura 3.1 - Schematizzazione del Biogas reformation (Pagina 13)
- Figura 3.2 - Processo di Gassificazione della biomassa (Pagina 14)
- Figura 3.3 - Processo di Pirolisi (Pagina 15)
- Figura 4.1 - Fasi del processo di Dark Fermentation e Metanogenesi (Pagina 16)
- Figura 4.2 - Schematizzazione fermentazione a doppio stadio (DF+DA) (Pagina 17)
- Figura 5.1 - Separazione a membrana sottoprodotti liquidi (Pagina 23)
- Figura 5.2 - Processo di Filtrazione a membrana (Pagina 25)
- Figura 5.3 - Campioni dei substrati Sedamyl (Pagina 26)
- Figura 5.4 - Step lavorazione dell'amido (Pagina 27)
- Figura 5.5 - Configurazione reattoristica (Pagina 30)
- Figura 6.1 - Produzione cumulata di bioidrogeno nella prima campagna sperimentale in DF (Pagina 42)
- Figura 6.2 - Produzione cumulata di metano nella prima campagna sperimentale in DF (Pagina 43)
- Figura 6.3 - Produzione cumulata di metano nella prima campagna sperimentale in AD (Pagina 44)
- Figura 6.4 - Produzione cumulata di anidride carbonica nella prima campagna sperimentale in DF (Pagina 45)
- Figura 6.5 - Produzione cumulata di biogas nella prima campagna sperimentale in DF (Pagina 45)
- Figura 6.6 - Produzione cumulata di anidride carbonica nella prima campagna sperimentale in AD (Pagina 46)
- Figura 6.7 - Produzione cumulata di biogas nella seconda campagna sperimentale in DF (Pagina 50)
- Figura 6.8 - Produzione cumulata di anidride carbonica nella seconda campagna sperimentale in DF (Pagina 51)
- Figura 6.9 - Produzione cumulata di metano nella seconda campagna sperimentale in DF (Pagina 52)
- Figura 6.10 - Produzione cumulata di metano nella seconda campagna sperimentale in AD (Pagina 53)
- Figura 6.11 - Produzione cumulata di CO<sub>2</sub> nella seconda campagna sperimentale in AD (Pagina 54)
- Figura 6.12 - Produzione cumulata di anidride carbonica nella terza campagna sperimentale in DF (Pagina 57)

Figura 6.13 - Produzione cumulata di anidride carbonica nella terza campagna sperimentale in DF (Pagina 58)

Figura 6.14 - Produzione cumulata di metano nella terza campagna sperimentale in DF (Pagina 60)

Figura 6.15 - Produzione cumulata di metano nella terza campagna sperimentale in AD (Pagina 61)

Figura 6.16 - Produzione cumulata di biogas nella terza campagna sperimentale in DF (Pagina 63)

## **Indice delle Tabelle**

- Tabella 1.1 - Proprietà di idrogeno e metano (Pagina 6)
- Tabella 4.1 - Parametri operativi DF e AD (Pagina 19)
- Tabella 5.1 - Configurazioni reattoristiche prima campagna sperimentale (Pagina 29)
- Tabella 5.2 - Configurazioni seconda campagna sperimentale (Pagina 31)
- Tabella 5.3 - Rapporto carbonio azoto substrati (Pagina 32)
- Tabella 6.1 - Percentuali TS e VS inoculo (Pagina 39)
- Tabella 6.2 - Composizione elementare dell'inoculo (Pagina 39)
- Tabella 6.3 - Produzione cumulata di biogas nella prima campagna sperimentale (Pagina 43)
- Tabella 6.4 - Produzione cumulata di anidride carbonica nella prima campagna sperimentale (Pagina 44)
- Tabella 6.5 - Solidi totali e solidi volatili su solidi totali dei digestati (Pagina 46)
- Tabella 6.6 - Produzione cumulata di biogas nella seconda campagna sperimentale (Pagina 50)
- Tabella 6.7 - Produzione cumulata di anidride carbonica nella seconda campagna sperimentale (Pagina 51)
- Tabella 6.8 - Produzione cumulata di metano nella seconda campagna sperimentale (Pagina 52)
- Tabella 6.9 - Analisi elementare dei digestati della prima campagna sperimentale (Pagina 53)
- Tabella 6.10 - Produzione cumulata di metano nella seconda campagna sperimentale (Pagina 53)
- Tabella 6.11 - Produzione cumulata di anidride carbonica nella seconda campagna sperimentale (Pagina 54)
- Tabella 6.12 - Composizione biogas DF (Pagina 57)

# 1 INTRODUZIONE

*"La biomimesi è la scienza di imparare  
dalla natura per risolvere i problemi  
dell'uomo in modo sostenibile."*

Janine Benyus

Nel campo delle energie rinnovabili e della gestione sostenibile dei rifiuti, la produzione di idrogeno a partire da scarti organici, rappresenta una frontiera innovativa.

In ottica di economia circolare, i rifiuti organici sono considerati delle materie prime seconde che possono essere convertite in prodotti ad alto valore aggiunto. Dunque, il rifiuto organico non rappresenta più un problema economico, ambientale e sociale, ma bensì un'opportunità.

L'economia circolare promuove una nuova gestione del rifiuto creando valore, nel dettaglio consente di ridurre la quantità di rifiuti solidi urbani e, contemporaneamente, contribuisce alla produzione di prodotti con ridotte emissioni di carbonio.

Tra i rifiuti organici, i rifiuti agro-alimentari rappresentano una sottocategoria di particolare rilevanza. Questi ultimi sono classificati come rifiuti speciali, in conformità con quanto disposto dall'articolo 184, comma 3, lettera a) del Decreto Legislativo 152/2006 e includono rifiuti provenienti dalle attività agricole e agro-industriali.

Tali rifiuti comprendono materiali derivanti dalle coltivazioni, dall'allevamento e dalla trasformazione di prodotti agricoli e alimentari. Il decreto stesso raggruppa varie tipologie di scarti, tra cui plastica, carta, cartone, oli vegetali esausti e fanghi di sedimentazione, sottolineando le modalità di gestione prescritte per i rifiuti speciali, comprese le operazioni di deposito temporaneo, smaltimento e recupero.

In Italia, i rifiuti agro-alimentari costituiscono una parte significativa della produzione annua di rifiuti. Secondo il Rapporto ISPRA 2023, la quantità complessiva di rifiuti alimentari generati ogni anno è stimata intorno ai 3,8 milioni di tonnellate. Questa cifra evidenzia la necessità di concentrare l'attenzione su tale categoria di rifiuti per migliorare la sostenibilità e la gestione ambientale.

La notevole quantità di rifiuti agro-alimentari richiede, infatti, l'implementazione urgente di strategie efficaci per il loro trattamento e valorizzazione, come il compostaggio e il recupero energetico, con l'obiettivo di ridurre l'impatto ambientale e ottimizzare l'uso delle risorse naturali.

In Italia, il consumo energetico complessivo rappresenta un indicatore valido per l'analisi delle dinamiche energetiche nazionali. Nel 2023, il consumo di energia primaria è stato stimato in circa 140 milioni di tonnellate di petrolio equivalente (Mtoe), come riportato dal Ministero

dell'Ambiente. La diversificazione delle fonti energetiche risulta essenziale, dunque, per garantire la sicurezza energetica e diminuire la dipendenza dai combustibili fossili. Attualmente, le principali fonti energetiche nel Paese comprendono, da un lato, le energie rinnovabili – solare, eolica, idroelettrica e biomasse – che rappresentano circa il 20% del mix energetico nazionale, un incremento significativo rispetto agli anni precedenti, in linea con gli obiettivi di sostenibilità e riduzione delle emissioni di carbonio. Dall'altro lato, i combustibili fossili, inclusi petrolio, gas naturale e carbone, continuano a costituire una parte rilevante del mix energetico, anche se si registra una progressiva riduzione dell'uso del carbone a favore del gas naturale come fonte di transizione. L'accento crescente posto sull'adozione di energie rinnovabili, insieme a politiche mirate all'efficienza energetica, rappresenta un elemento cardine degli sforzi volti alla riduzione delle emissioni di gas serra e alla risposta alle sfide poste dai cambiamenti climatici. Una delle possibili soluzioni per la valorizzazione dei rifiuti agro-alimentari è la produzione di biogas un vettore energetico pulito e versatile. Il processo di produzione di idrogeno da scarti agro-alimentari può avvenire attraverso l'uso di processi biologici come la digestione anaerobica o termochimici come la gassificazione.

Nella digestione anaerobica, i rifiuti organici vengono convertiti da microorganismi in assenza di ossigeno, in biogas ricco di metano, che può essere ulteriormente trasformato in idrogeno attraverso processi come il reforming del metano.

La gassificazione, invece, comporta la conversione termochimica dei rifiuti organici in gas di sintesi, una miscela di idrogeno, monossido di carbonio e anidride carbonica, da cui è possibile isolare l'idrogeno.

Rispetto ai metodi convenzionali di produzione di idrogeno, come il reforming del gas naturale, che è energivoro e altamente emissivo in termini di CO<sub>2</sub>, queste tecnologie, sebbene ancora in fase di sviluppo e ottimizzazione, rappresentano un progresso significativo per la tutela dell'ambiente.

La mitigazione del cambiamento climatico può essere perseguita attraverso la produzione di idrogeno da scarti alimentari, un processo che contribuisce in modo rilevante alla riduzione dell'impatto ambientale complessivo. Questo processo permette di ridurre il volume di rifiuti che finisce nelle discariche, diminuendo così le emissioni di gas serra come il metano, un potente inquinante. Inoltre, l'idrogeno prodotto è una fonte di energia pulita, che può essere utilizzata in diversi settori, dalla mobilità alla produzione industriale, senza emettere CO<sub>2</sub> quando viene consumato.

Tuttavia, la produzione di idrogeno da scarti alimentari non è priva di sfide. Innanzitutto, i costi di implementazione delle tecnologie sono ancora elevati rispetto ai metodi tradizionali di produzione di idrogeno, il che può rendere difficile la loro diffusione su larga scala.

Un'altra sfida significativa è costituita dalla variabilità della composizione dei rifiuti alimentari, in quanto può influenzare l'efficienza del processo e la qualità dell'idrogeno prodotto. Inoltre, non in tutte le regioni è possibile la costruzione di infrastrutture complesse in grado di affrontare la raccolta, il trattamento e la conversione dei rifiuti.

In sintesi, anche se la produzione di idrogeno a partire da scarti alimentari rappresenta una soluzione innovativa e promettente per affrontare le sfide energetiche e ambientali del futuro, rimangono alcune criticità legate ai costi, alla variabilità dei materiali di partenza e alla necessità di sviluppare infrastrutture adeguate.

Tuttavia, con l'avanzamento delle tecnologie e una crescente attenzione alla sostenibilità, questo approccio potrebbe diventare una componente chiave di un'economia energetica verde e circolare.

Il bioidrogeno emerge come una delle soluzioni più promettenti nel panorama energetico contemporaneo, caratterizzato dalla necessità urgente di ridurre le emissioni di carbonio e di trovare alternative sostenibili ai combustibili fossili.

Con un calore di combustione estremamente elevato (142,9 kJ/g), il bioidrogeno rappresenta una fonte di energia pulita, poiché il suo processo di combustione produce unicamente vapore acqueo, senza emissione di contaminanti o gas serra (*tabella 1.1*). Questo lo rende un candidato ideale per l'implementazione di sistemi energetici a basso impatto ambientale.

<b>Proprietà</b>	<b>Unità</b>	<b>H<sub>2</sub></b>	<b>CH<sub>4</sub></b>
<b>Peso Molecolare</b>	(g/mol)	2,016	16,043
<b>Temperatura critica</b>	(°C)	-240	-82,7
<b>Pressione critica</b>	(bar)	12,98	45,96
<b>Calore latente di evaporazione</b>	(kJ/kg)	454,3	510
<b>Densità gas (1 atm, 15 °C)</b>	(kg/m <sup>3</sup> )	0,085	0,68
<b>Densità liquido (1 atm, ebollizione)</b>	(kg/m <sup>3</sup> )	70,98	422,62
<b>Potere calorifico (LHV)</b>	(MJ/kg)	120	50
<b>Limite di infiammabilità in aria</b>	(% vol)	4,0-75,0	5,0

*Tabella 1.1- Proprietà di idrogeno e metano*

L'efficienza termica del bioidrogeno, maggiore di quella delle fonti energetiche tradizionali, costituisce un valido potenziale per sostituire i combustibili fossili in molte applicazioni industriali e di trasporto. Tuttavia, la produzione globale è ancora dominata da processi basati sui combustibili fossili, responsabili del 94% della produzione attuale, questi, sebbene economici, non sono sostenibili nel lungo periodo e aggravano la crisi climatica.

Negli ultimi venti anni, la produzione biologica di idrogeno ha attirato un crescente interesse scientifico, in particolare attraverso il processo di *dark fermentation* (DF).

Questo metodo sfrutta la capacità di alcuni microrganismi di produrre idrogeno in assenza di luce, utilizzando materia organica come substrato.

La DF è considerata una delle vie più promettenti per la produzione sostenibile di bioidrogeno, specialmente quando si utilizzano rifiuti organici o sottoprodotti agricoli come materia prima. La produzione biologica di idrogeno necessita di uno scale-up significativo per poter competere efficacemente con i processi basati sui combustibili fossili. Questo passaggio è cruciale per rendere economicamente percorribili le tecnologie emergenti come la DF. Molto spesso la DF è associata ad un ulteriore stadio di fermentazione quale la digestione anaerobica al fine di produrre metano. La *figura 1.1* indica il processo a doppio stadio:

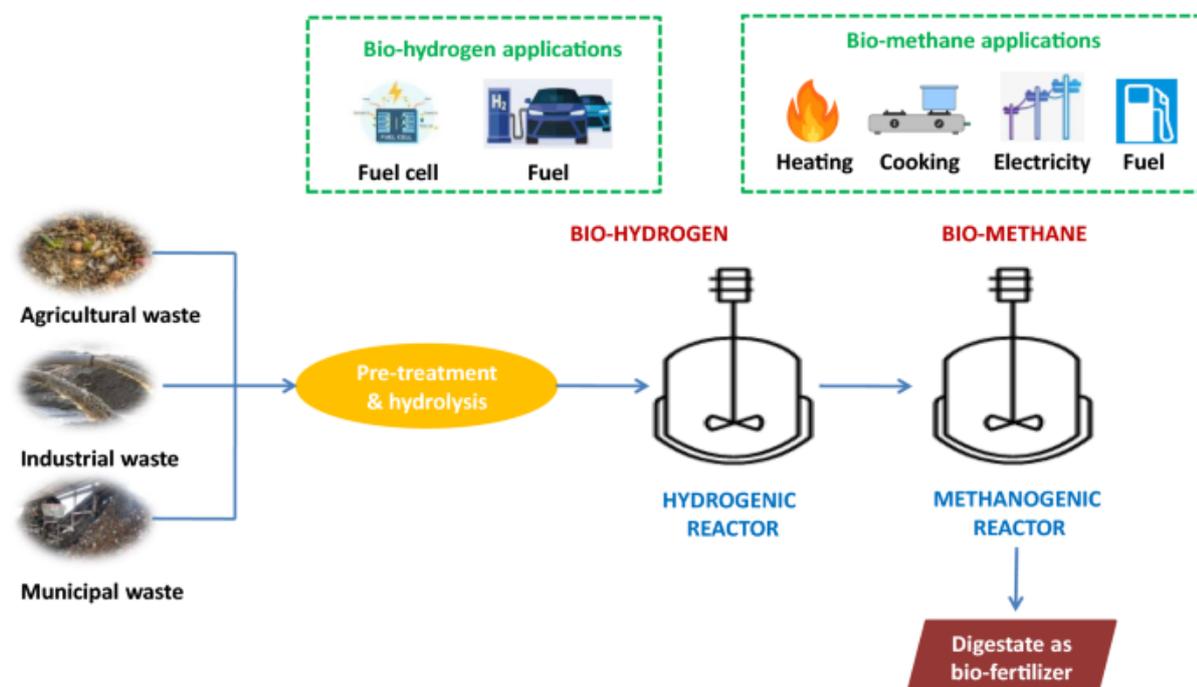


Figura 1.1- Utilizzo di rifiuti organici per la produzione di idrogeno e metano (P. Senthil 2020)

Per dimostrare la fattibilità tecnica ed economica del bioidrogeno, al fine di consentire la sua adozione su vasta scala, è necessario lo sviluppo di impianti pilota che determinerebbero un importante progresso in campo energetico ed ecologico.

Un altro aspetto cruciale della produzione di bioidrogeno è il suo contributo alla realizzazione di un'economia circolare (CE). Questo modello economico mira a ridurre il consumo di risorse e gli impatti ambientali, massimizzando l'utilizzo delle risorse esistenti e prolungandone il ciclo di vita. Nell'ambito della CE, il bioidrogeno offre una soluzione sostenibile, poiché permette di trasformare rifiuti organici in energia pulita.

Questo approccio non solo riduce la quantità di rifiuti che finiscono in discarica, ma valorizza anche risorse altrimenti inutilizzate, contribuendo a una riduzione complessiva delle emissioni di gas serra.

Nonostante le notevoli potenzialità che il bioidrogeno possiede, la sua diffusione è ostacolata da una serie di difficoltà e sfide significative che ne impediscono una piena e rapida implementazione. Oltre alla necessità di un'espansione economica sostenuta e strategica, è imperativo considerare anche le problematiche relative all'efficienza del processo produttivo e alla variabilità delle materie prime impiegate. In particolare, è fondamentale analizzare come l'ottimizzazione dei processi possa influire sulla performance complessiva e come la gestione delle fluttuazioni nelle caratteristiche delle materie prime possa garantire la resa e la qualità del prodotto finale. Pertanto, la ricerca è essenziale per migliorare i rendimenti e abbattere i costi, rendendo il bioidrogeno una vera alternativa ai combustibili fossili. Inoltre, il digestato, cioè residuo di digestione anaerobica e dark fermentation, è ricco di nutrienti e può essere riutilizzato come fertilizzante organico nel settore agricolo. Questo utilizzo contribuisce a chiudere il ciclo dei nutrienti, migliorando la fertilità del suolo e riducendo la necessità di fertilizzanti chimici. La produzione di bioidrogeno tramite processi biologici, come la DF, offre una via promettente per la decarbonizzazione e la valorizzazione dei rifiuti all'interno di un'economia circolare. La DF è un processo biologico in cui batteri anaerobici degradano la biomassa organica in assenza di luce, producendo idrogeno e acidi organici attraverso idrolisi e acidogenesi. Tale meccanismo viene molto spesso associato a una seconda digestione che converte questi acidi in biogas attraverso metanogenesi. In tal modo, questo approccio consente di ottimizzare la produzione di biogas e il trattamento dei rifiuti.

In questa tesi verrà approfondito il tema di DF e digestione anaerobica a doppio stadio per la produzione di idrogeno e metano, focalizzando l'attenzione sull'utilizzo di scarti prodotti dall'azienda agricola Sedamyl.

Sedamyl genera sottoprodotti ricchi di glucosio, i quali rappresentano una fonte di carbonio ottimale per la crescita microbica e, di conseguenza, per la produzione di biogas.

Il lavoro di ricerca condotto ha coinvolto una serie di prove sperimentali finalizzate a identificare le condizioni ottimali per massimizzare la resa di idrogeno e metano durante il processo di digestione. Sono stati valutati vari parametri operativi, tra cui la concentrazione del substrato e dell'inoculo, la temperatura, il tempo di ritenzione, il peso secco e il pH, al fine di determinare l'impatto sulla produzione giornaliera di biogas.

È stato condotto un parallelismo tra la crescita microbica all'interno del digestato e la quantità di biogas prodotta, con l'obiettivo di comprendere meglio la relazione tra lo sviluppo delle popolazioni microbiche e l'efficienza complessiva del processo.

Nei capitoli successivi, verrà illustrato il design sperimentale adottato, descrivendo in dettaglio le attrezzature utilizzate e le metodologie di analisi implementate per monitorare la crescita microbica e la produzione di biogas. Successivamente, i risultati ottenuti saranno discussi in termini di efficienza del processo e saranno confrontati con la letteratura esistente. Infine, verranno proposte considerazioni conclusive sulle potenzialità della digestione a doppio stadio come tecnologia sostenibile per la valorizzazione dei sottoprodotti agricoli e il contributo che essa può offrire alla riduzione dell'impatto ambientale dell'azienda Sedamyl.

## **2. ECONOMIA CIRCOLARE E RIFIUTI AGROALIMENTARI**

### ***2.1 Economia circolare***

L'economia circolare enfatizza i principi di sostenibilità e di efficienza, rappresentando un paradigma innovativo volto a rivoluzionare i processi di produzione, consumo e gestione delle risorse.

Questo modello propone una trasformazione radicale delle pratiche tradizionali, puntando alla creazione di un sistema economico in cui le risorse vengano riutilizzate e valorizzate in modo continuo, riducendo al minimo gli sprechi e ottimizzando l'impiego delle risorse disponibili.

A differenza del modello economico tradizionale, che si basa su un ciclo lineare di produzione-consumo-smaltimento, l'economia circolare si propone di chiudere il ciclo di vita dei prodotti, mantenendo le risorse in uso il più a lungo possibile e riducendo al minimo i rifiuti. L'integrazione dei rifiuti agroalimentari nel ciclo produttivo valorizza ciò che altrimenti sarebbe considerato un sottoprodotto o un rifiuto.

L'economia circolare rappresenta un modello economico avanzato e a più basso impatto ambientale che mira a ottimizzare l'uso delle risorse, ridurre i rifiuti e rigenerare i materiali. Nella transizione verso un'economia circolare, i rifiuti agroalimentari emergono come una risorsa chiave, il cui potenziale di valorizzazione può contribuire significativamente alla sostenibilità ambientale e alla sicurezza alimentare globale.

I rifiuti agroalimentari, che comprendono residui agricoli, sottoprodotti della lavorazione industriale e scarti alimentari post-consumo, rappresentano un'enorme quantità di biomassa ricca di composti organici.

Tale biomassa può essere sfruttata attraverso diversi processi biochimici e termochimici come il reforming catalitico, la gassificazione, la pirolisi, la foto fermentazione e la digestione anaerobica *figura 2.1*.

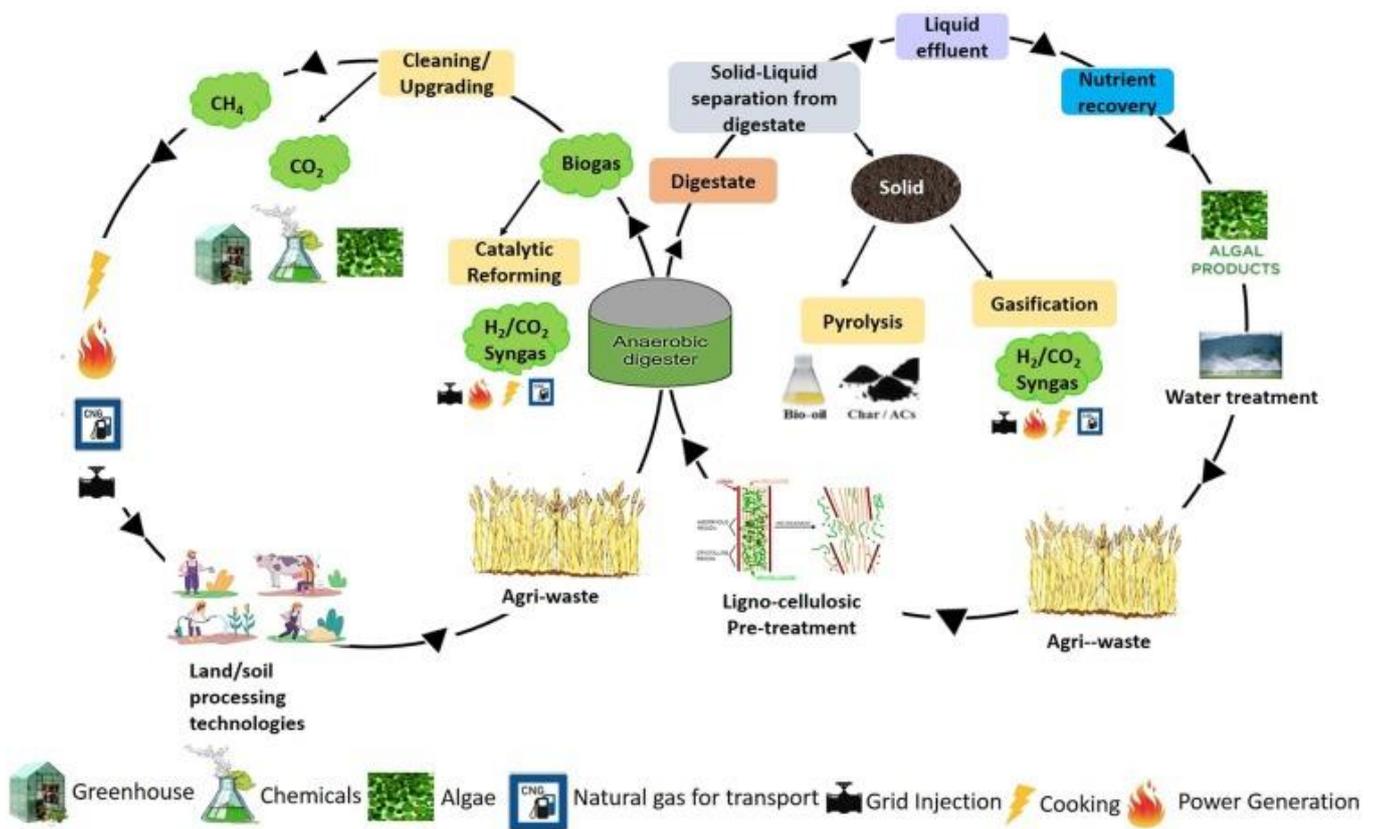


Figura 2.1- Economia circolare dei rifiuti agroalimentari (Rimika 2021)

La digestione anaerobica, ad esempio, sfrutta consorzi microbici per convertire la materia organica in biogas (una miscela di metano e anidride carbonica) e digestato, un fertilizzante organico. Altri processi, come la gassificazione, trasformano i rifiuti organici in syngas (principalmente idrogeno e monossido di carbonio), utilizzabile per la produzione di energia o come base per la sintesi di carburanti liquidi e prodotti chimici.

L'integrazione di rifiuti agroalimentari nell'economia circolare offre numerosi benefici, uno dei principali è la riduzione delle emissioni di gas serra. Quando i rifiuti organici finiscono in discarica, si decompongono anaerobicamente producendo metano, un gas serra con un potenziale di riscaldamento globale circa 28 volte maggiore rispetto alla CO<sub>2</sub>. Trattando questi rifiuti in impianti di digestione anaerobica o di compostaggio, è possibile captare e utilizzare il biogas prodotto, riducendo così le emissioni di metano. Inoltre, il recupero dei nutrienti attraverso il compostaggio o la digestione anaerobica contribuisce alla fertilità del suolo, chiudendo il ciclo dei nutrienti e riducendo la necessità di fertilizzanti chimici sintetici. Nonostante i vantaggi, l'integrazione dei rifiuti agroalimentari nell'economia circolare presenta diverse sfide scientifiche e tecnologiche. Una delle principali sfide è la variabilità nella composizione chimica dei rifiuti agroalimentari, che può influenzare l'efficienza dei processi di conversione, ad esempio, un'alta concentrazione di lignina nei residui vegetali può ostacolare

la digestione anaerobica, mentre alti livelli di umidità possono ridurre l'efficienza della gassificazione. La ricerca scientifica è quindi essenziale per sviluppare pretrattamenti che possano migliorare la biodegradabilità della biomassa o ottimizzare i processi in base alla composizione specifica dei rifiuti. Inoltre, la progettazione e l'implementazione di impianti su scala industriale richiedono un'attenta pianificazione per garantire la sostenibilità economica e ambientale, ad esempio, la localizzazione degli impianti deve essere strategicamente scelta per minimizzare i costi di trasporto dei rifiuti e massimizzare l'efficienza logistica.

In sintesi, la valorizzazione dei rifiuti agroalimentari nell'ambito dell'economia circolare offre un percorso promettente per ridurre l'impatto ambientale e migliorare la sostenibilità dei sistemi alimentari. Tuttavia, per realizzare pienamente questo potenziale, è essenziale affrontare le sfide scientifiche e tecnologiche legate alla variabilità dei rifiuti e all'ottimizzazione dei processi di conversione. Con un approccio scientifico solido e una collaborazione interdisciplinare, è possibile trasformare i rifiuti agroalimentari da un problema gestionale in una risorsa strategica per un futuro sostenibile.

## ***2.2. Gestione dei rifiuti***

La gestione sostenibile dei rifiuti è una componente cruciale dell'economia circolare, un modello che mira a ridurre l'impatto ambientale attraverso il riutilizzo e la valorizzazione delle risorse. In questo contesto, la gestione dei rifiuti assume un ruolo centrale, poiché rappresenta non solo una perdita economica significativa ma anche una fonte di inquinamento e di emissioni di gas serra. Il concetto di "End of Waste" (EoW), introdotto dall'Unione Europea, è fondamentale per convertire i rifiuti alimentari in risorse riutilizzabili, riducendo così la pressione sulle discariche e promuovendo un ciclo produttivo più sostenibile. Questo approccio non solo contribuisce alla riduzione dei rifiuti, ma favorisce anche l'efficienza nell'uso delle risorse, un aspetto critico in un mondo con risorse naturali sempre più limitate.

La produzione agricola, caratterizzata da un uso intensivo di fertilizzanti e pesticidi, ha portato a un notevole impatto sulla qualità del suolo e sulla biodiversità. Secondo la FAO, ogni anno viene sprecato circa un terzo del cibo prodotto, pari a 1,3 miliardi di tonnellate, un fenomeno che non solo comporta una perdita economica ma aggrava anche l'inquinamento atmosferico e idrico. Questo spreco alimentare si traduce in emissioni significative di gas serra, soprattutto metano, un gas con un potenziale di riscaldamento globale molto più elevato rispetto alla CO<sub>2</sub>. La riduzione dello spreco alimentare è quindi essenziale non solo per migliorare la sicurezza alimentare globale ma anche per mitigare il cambiamento climatico.

La gestione dei rifiuti alimentari può essere strutturata in accordo alla Waste Framework Directive 2008. La riduzione alla fonte è la strategia più efficace, che richiede una maggiore consapevolezza e pianificazione sia a livello di produzione che di consumo.

La redistribuzione degli scarti alimentari commestibili a comunità bisognose rappresenta un altro importante intervento per ridurre gli sprechi. Tuttavia, quando questi rifiuti non possono essere evitati, devono essere recuperati attraverso processi di riciclaggio e valorizzazione.

Ad esempio, il compostaggio consente di restituire nutrienti al suolo, mentre la digestione anaerobica può convertire i rifiuti in biogas, una fonte di energia rinnovabile.

Quest'ultima tecnologia è particolarmente promettente, poiché riduce le emissioni di metano associate alle discariche e fornisce un'alternativa sostenibile ai combustibili fossili.

Nonostante i benefici del compostaggio e della digestione anaerobica, ci sono sfide significative legate alla gestione dei rifiuti alimentari.

Le discariche continuano a essere la destinazione principale per una grande quantità di rifiuti alimentari, ma rappresentano la forma meno sostenibile di smaltimento a causa dell'impatto ambientale elevato, inclusa la produzione di percolato e la contaminazione delle falde acquifere. Inoltre, le emissioni di metano dalle discariche rappresentano circa il 20% delle emissioni globali di metano, rendendo urgente la ricerca di alternative più sostenibili.

Tecnologie come la dark fermentation e la foto-fermentazione stanno emergendo come tecnologie innovative per la produzione di idrogeno dai rifiuti organici.

Questi processi offrono il vantaggio di generare energia da scarti a basso impatto ambientale, contribuendo alla riduzione delle emissioni di gas serra.

Il concetto di "End of Waste" è centrale nella transizione verso un'economia circolare, poiché permette di reintrodurre i materiali di scarto nel ciclo produttivo.

In Europa, questo concetto è regolato da specifiche normative che definiscono i criteri che un materiale deve soddisfare per cessare di essere considerato rifiuto.

Ad esempio, i materiali derivati dai rifiuti alimentari possono essere riutilizzati come materie prime-secondarie per produrre fertilizzanti e bioplastiche, a condizione che rispettino standard di sicurezza e qualità. L'applicazione del principio di EoW è essenziale per ridurre la dipendenza dalle risorse naturali e favorire lo sviluppo di nuove filiere produttive sostenibili.

Inoltre, l'EoW contribuisce a creare nuovi mercati per i materiali riciclati, stimolando l'innovazione e la competitività nel settore della gestione dei rifiuti.

L'integrazione di tecnologie innovative per il trattamento dei rifiuti, come la digestione anaerobica e la produzione di idrogeno, può contribuire significativamente alla riduzione delle emissioni di gas serra e alla promozione di un'economia più circolare.

Tuttavia, per realizzare appieno il potenziale di queste soluzioni, è necessario un impegno coordinato tra governi, industrie e consumatori per adottare pratiche più sostenibili lungo l'intera filiera alimentare.

### **3. METODI PER LA PRODUZIONE DI IDROGENO DA BIOMASSA**

#### ***3.1 Metodologie odierne***

I metodi convenzionali per la produzione di idrogeno da biomassa consistono in processi chimici e termochimici. Tra le tecnologie odierne più comuni vi è la gassificazione della biomassa, un processo in cui la biomassa, come legno o residui agricoli, è sottoposta a temperature elevate in presenza di un agente gassificante come vapore acqueo o ossigeno parziale. Questo processo produce un gas di sintesi ricco di idrogeno, monossido di carbonio e anidride carbonica, che successivamente può essere purificato per isolare l'idrogeno.

Un altro metodo chiave è la pirolisi, che implica la decomposizione termica della biomassa in assenza di ossigeno a temperature comprese tra 400 e 600 °C. Questo processo genera una miscela di gas, liquidi e solidi, tra cui il gas di sintesi che può essere trattato per estrarre l'idrogeno. Un terzo approccio è la digestione anaerobica, un processo biologico in cui la biomassa è fermentata da microrganismi in ambienti anaerobici a temperature controllate, tipicamente tra 30 e 60 °C. Questo processo produce biogas, che contiene metano e idrogeno, con l'idrogeno estratto attraverso la purificazione del biogas. Tutti questi metodi richiedono impianti dotati di sistemi avanzati di controllo della temperatura, della pressione e della composizione del gas, nonché di tecnologie di purificazione per garantire l'efficienza e la qualità del prodotto finale.

#### ***3.2 Biogas reformation***

Il reforming del biogas è un processo avanzato che consente di convertire il biogas, composto principalmente da metano ( $\text{CH}_4$ ) e anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ), in idrogeno ( $\text{H}_2$ ) e anidride carbonica mediante reazioni chimiche specifiche. Questo processo inizia con la purificazione del biogas, dove i contaminanti come zolfo vengono rimossi attraverso filtri a carbone attivo e adsorbitori a base di ossidi metallici *Figura 3.1*.

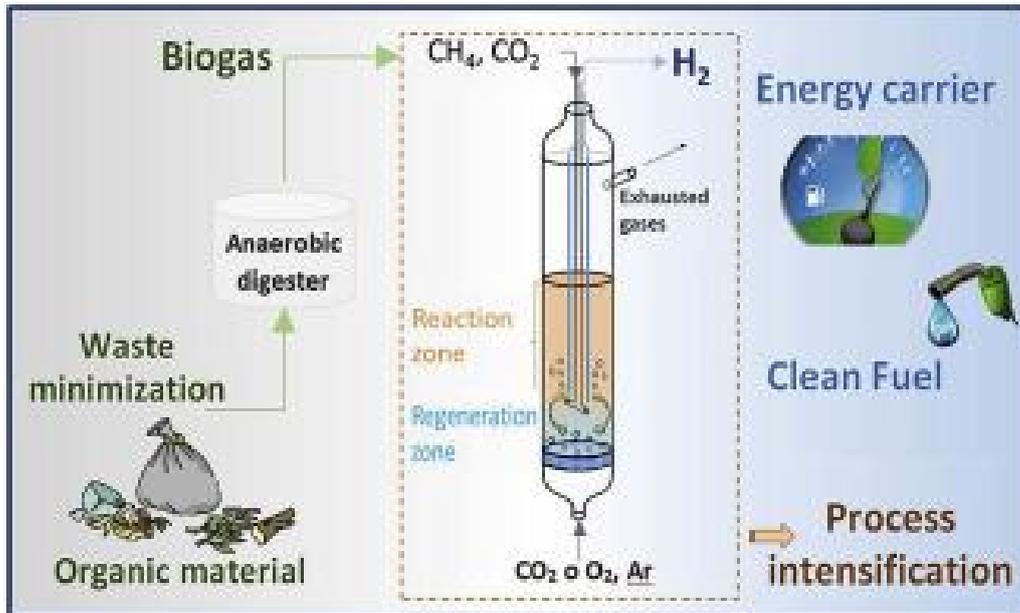


Figura 3.1- Schematizzazione del Biogas reformation (Menéndez 2017)

Successivamente, il biogas purificato viene inviato a un reattore di steam reforming, dove il metano reagisce con vapore acqueo a temperature elevate (700-1000 °C) in presenza di un catalizzatore di nichel per produrre idrogeno e monossido di carbonio (CO) secondo la reazione



Questo reattore opera in condizioni di alta pressione per ottimizzare la resa di idrogeno. Il monossido di carbonio generato viene poi convertito in ulteriore idrogeno attraverso il processo di shift reazione a bassa temperatura, in cui il monossido di carbonio reagisce con vapore acqueo per formare ulteriore idrogeno e anidride carbonica:



Il gas risultante viene quindi raffreddato e sottoposto a separazione dell'idrogeno utilizzando membrane di separazione o sistemi di adsorbimento a pressione variabile (PSA) per ottenere idrogeno di alta purezza. I sottoprodotti, principalmente  $\text{CO}_2$  ed eventuali tracce di metano residuo, sono trattati o immessi in sistemi di gestione delle emissioni, garantendo che l'intero processo sia conforme alle normative ambientali. L'efficienza di tale processo dipende dalla gestione precisa delle condizioni operative del reattore, dall'ottimizzazione del catalizzatore e dalla qualità dei materiali di separazione, per massimizzare la produzione di idrogeno e minimizzare le perdite di energia e materia.

### 3.3 Gassificazione da biomassa

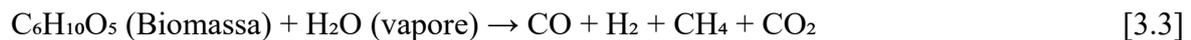
La gassificazione è un processo termochimico che converte la biomassa in gas di sintesi (syngas), una miscela di idrogeno (H<sub>2</sub>), monossido di carbonio (CO), anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), e altri gas. Questo avviene riscaldando la biomassa a temperature elevate in presenza di un agente gassificante, come vapore d'acqua o ossigeno *Figura 3.2*.



*Figura 3.2- Processo di Gassificazione della biomassa (Chi-Wang, 2018)*

Processo Chimico:

1. *Reazione di Gassificazione:*



2. *Reazione WGS (Water-Gas Shift):*



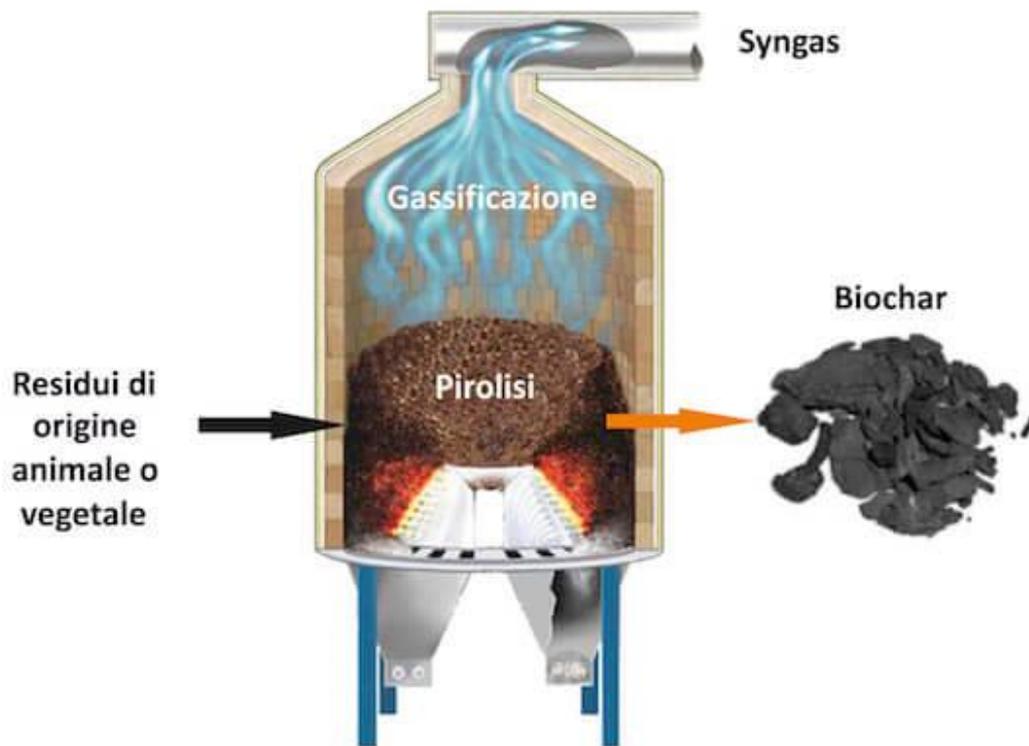
3. *Reazione di Metanazione:*



La gassificazione può essere applicata a diverse tipologie di biomassa (legno, rifiuti agricoli, ecc.), e il syngas prodotto può essere utilizzato per produrre idrogeno o altri prodotti chimici. Il processo richiede un'elevata quantità di energia e il syngas deve essere purificato per rimuovere impurità e ottenere idrogeno puro.

### 3.4 Pirolisi

La pirolisi è un processo che scompone la biomassa in gas, liquidi (bio-olio) e solidi (biochar) mediante riscaldamento in assenza o con quantità limitata di ossigeno. I prodotti gassosi e liquidi contengono composti che possono essere ulteriormente trattati per estrarre idrogeno  
*Figura 3.3.*



*Figura 3.3- Processo di Pirolisi (Benson 2019)*

*Reazione di Pirolisi Primaria:*



La pirolisi può operare a temperature più basse rispetto alla gassificazione e produce una gamma più ampia di prodotti utilizzabili.

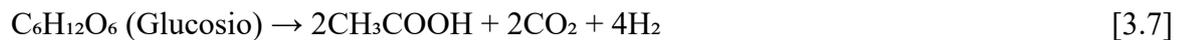
La produzione di idrogeno puro richiede ulteriori passaggi di trattamento e separazione, il che può aumentare i costi complessivi del processo.

### 3.5 Dark fermentation

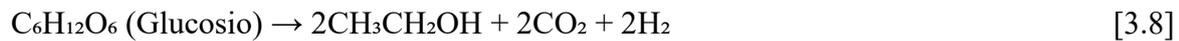
La dark fermentation è un processo biologico in cui i batteri anaerobici scompongono la biomassa (solitamente zuccheri o rifiuti organici) per produrre idrogeno e acidi organici in assenza di ossigeno.

*Processo Chimico:*

#### 1. Fermentazione del Glucosio:



#### 2. Altre Vie Metaboliche:



Il processo di produzione di bioidrogeno attraverso la digestione anaerobica e la dark fermentation, è caratterizzato da una serie di fasi ben precise. Nella digestione anaerobica, la materia organica complessa come proteine, grassi e carboidrati viene inizialmente degradata in composti più semplici come aminoacidi, acidi grassi e monosaccaridi da batteri idrolizzanti, come *Clostridium sporogenes*, e *Clostridium thermocellum*.

Successivamente, durante la fase di acidogenesi, acidi grassi volatili (VFA) e alcoli sono prodotti dalla fermentazione di questi composti, portando alla formazione di acido acetico, acido formico,  $\text{CO}_2$  e idrogeno. Infine, la metanogenesi, condotta da batteri metanogeni, converte l'acido acetico e l'idrogeno in metano e  $\text{CO}_2$ .

Questo processo, sebbene efficace nel trattare rifiuti organici e produrre metano, ha una resa di idrogeno relativamente bassa e richiede trattamenti ulteriori per separare l'idrogeno dai sottoprodotti e purificarlo. La DF, a differenza della digestione anaerobica, si focalizza sulla produzione di idrogeno escludendo la fase di metanogenesi.

Questo processo utilizza microrganismi anaerobi per convertire biomassa parzialmente in idrogeno, con le idrogenasi Fe-Fe e Ni-Fe che giocano ruoli fondamentali.

Difatti le Ni-Fe idrogenasi sono principalmente coinvolte nell'ossidazione dell'idrogeno molecolare, mentre le Fe-Fe idrogenasi sono più attive nella produzione di idrogeno.

La scelta del substrato, come carboidrati, zuccheri, proteine e lipidi, influisce notevolmente sulla resa di idrogeno finale, che varia tipicamente da 1 a 2,5 moli di idrogeno per mole di glucosio, a causa della formazione di sottoprodotti come acido acetico, butirrico e metanolo.

Diverse condizioni operative, come temperatura, pH, tipo di biomassa, e velocità di miscelazione, sono critiche per ottimizzare la resa di idrogeno.

Nella dark fermentation, è essenziale evitare la produzione di metano, e per questo si impiega un pretrattamento dell'inoculo per sopprimere i microrganismi metanigeni.

Tecniche di pretrattamento includono il riscaldamento a temperature elevate (65-100 °C), che inibisce i microrganismi non sporigeni, mentre i produttori di idrogeno, come quelli appartenenti ai generi Clostridium e Bacillus, sono resistenti a tali condizioni.

Altre tecniche di pretrattamento implementate sono ad esempio: l'aerazione, che elimina i microrganismi anaerobi, è meno efficiente e costosa, mentre pretrattamenti acidi e basici, anche se utili, richiedono aggiustamenti frequenti del pH e compatibilità dei materiali.

L'irradiazione, utilizzando microonde, ultrasuoni o radiazioni gamma, può creare condizioni estreme che sopprimono i microrganismi consumatori di idrogeno, ma i costi energetici sono rilevanti. L'inibizione chimica con composti come il bromoetanossolfonato (BES) e il cloroformio è economica ma può presentare rischi ecologici.

Le condizioni operative ottimali per DF sono fondamentali per garantire un'efficace produzione di idrogeno e metaboliti attraverso la degradazione anaerobica dei substrati organici.

La temperatura ideale per questo processo varia generalmente tra 35 e 55 °C, con un pH ottimale compreso tra 4,5 e 6,5 per mantenere l'attività dei microrganismi anaerobici in ambiente privo di ossigeno per evitare reazioni ossidative indesiderate.

La scelta del substrato, come zuccheri semplici o complessi, influisce significativamente sulla resa e sulla selettività dei metaboliti prodotti.

Inoltre, la durata del processo, dunque il tempo idraulico, e la velocità di agitazione devono essere ottimizzate in modo tale da facilitare il mass transfer delle sostanze nutritive.

Dunque, la DF rispetto ai precedenti metodi utilizzati oggi, risulta più vantaggiosa dal punto di vista economico e reattoristico.

## 4. DIGESTIONE ANAEROBICA A DOPPIO STADIO

La digestione anaerobica a doppio stadio, che separa l'idrolisi e l'acidogenesi dalla metanogenesi, è una configurazione che migliora l'efficienza complessiva del processo. Alla fase idrolitica segue quella acidogena, in cui le molecole semplici prodotte dall'idrolisi vengono trasformate in acidi volatili a catena corta - prevalentemente acido acetico, propionico, butirrico e valerico, detti anche acidi grassi volatili (Volatile Fatty Acids).

Questa separazione consente un aumento del tasso di carico organico e una riduzione del tempo di ritenzione idraulica, portando a miglioramenti significativi nella produzione di bioidrogeno e nella gestione dei rifiuti rispetto ai processi a stadio singolo.

In generale, la degradazione anaerobica di un substrato organico puro come il glucosio avviene secondo le reazioni [1],[2]:

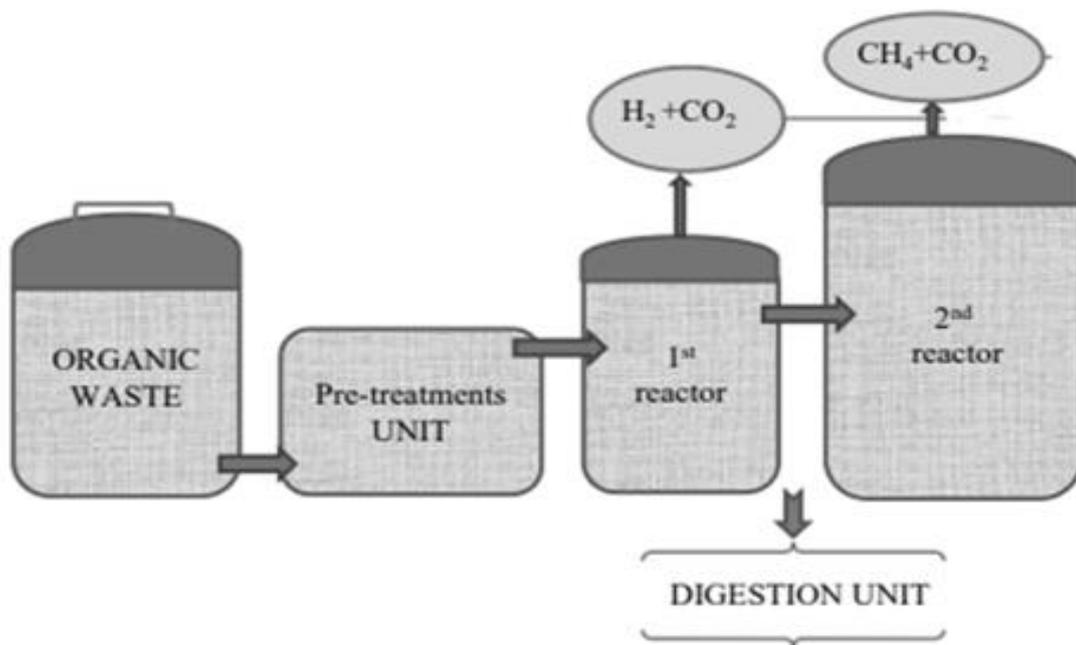
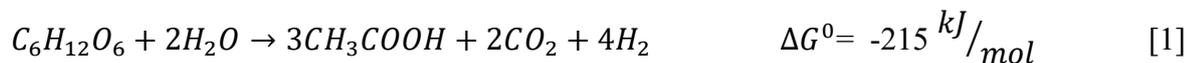


Figura 4.2 Schematizzazione fermentazione a doppio stadio (DF+DA), CDR FoodLab

#### 4.1. Descrizione del processo

La digestione anaerobica a doppio stadio è un processo di degradazione biologica della materia organica, suddiviso in due fasi principali, ciascuna ottimizzata per specifiche popolazioni microbiche. Nel primo stadio, chiamato fase idrolitica-acidogenica, la materia organica complessa, come carboidrati, proteine e lipidi, viene scomposta in molecole più semplici, come zuccheri, amminoacidi e acidi grassi volatili, ad opera di microorganismi idrolitici e acidogenici. Questa fase produce principalmente idrogeno e CO<sub>2</sub> e viene gestita in condizioni più acide, con un pH che varia generalmente tra 5,2 e 6,0, poiché questo ambiente favorisce l'attività dei batteri acidogenici. La temperatura può variare tra i 15°C e i 55°C, a seconda che il processo avvenga in condizioni psicrofile, mesofile o termofile (Levin, *et al.*, 2003).

I microrganismi anaerobici sono generalmente suddivisi in tre gruppi:

i microrganismi idrolitici e acidogeni sono in grado di solubilizzare il materiale particolato e scindere macromolecole come carboidrati, proteine e lipidi in monomeri e oligomeri, rendendo i composti risultanti facilmente trasportabili all'interno delle cellule.

Questi microrganismi fermentano con produzione di acidi grassi a corta catena, noti anche come acidi grassi volatili, insieme a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>.

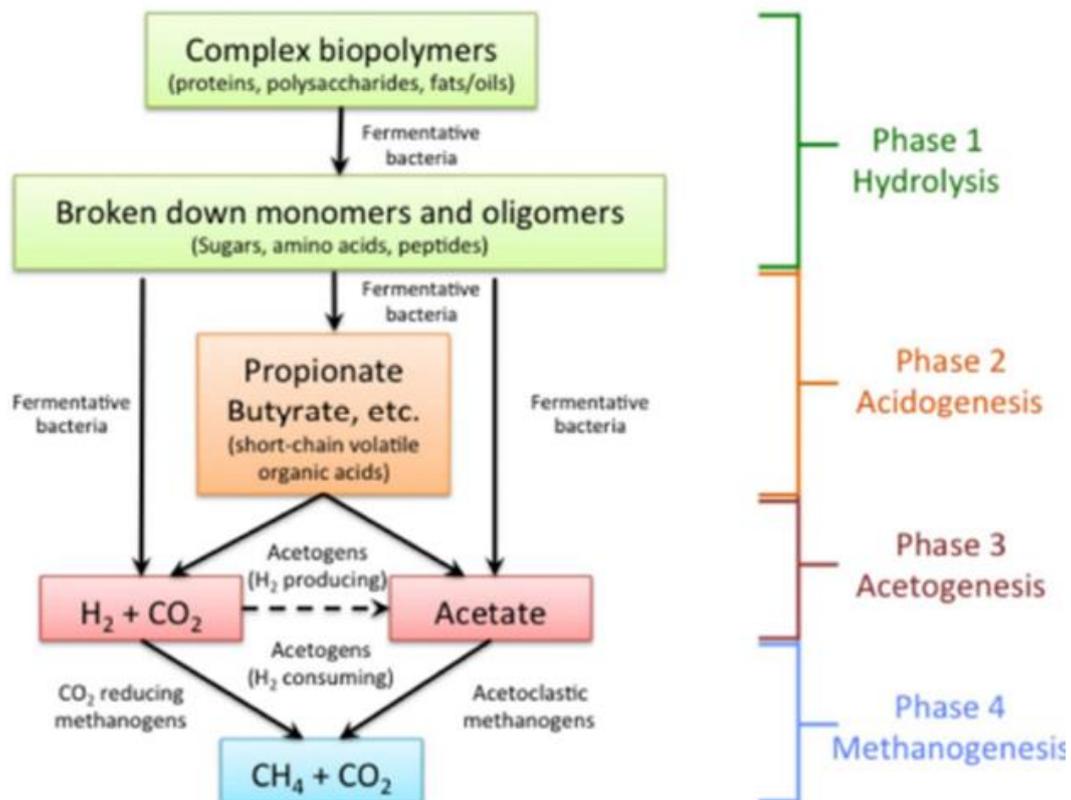


Figura 4.1 Fasi del processo di Dark Fermentation e Metanogenesi (Levin, *et al.*, 2003)

I microrganismi acetogeni produttori obbligati di idrogeno (OHPA) convertono, tramite la  $\beta$ -ossidazione, gli acidi grassi in acido acetico,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  (Ince, 1998).

Infine, i microrganismi metanigeni sono capaci di produrre metano attraverso due vie: la metanogenesi acetoclastica, in cui l'acido acetico viene decarbossilato producendo metano e anidride carbonica ( $\text{CH}_4 + \text{CO}_2$ ), e la metanogenesi idrogenofila, in cui il  $\text{CO}_2$  viene ridotto direttamente con  $\text{H}_2$  per formare metano e acqua ( $\text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ ).

Un altro studio (Wu *et al.*, 2016) ha esaminato l'approccio termofilo-mesofilo, dimostrando che l'uso di diverse temperature in ciascuna fase aumenta la velocità di degradazione dei rifiuti e riduce i tempi di ritenzione. Questo approccio ha permesso di ottenere fino al 20-30% in più di biogas rispetto ai sistemi tradizionali a stadio singolo.

Nel secondo stadio, la fase metanogenica, gli acidi grassi volatili vengono convertiti in metano e anidride carbonica da batteri metanogeni, che prosperano in ambienti meno acidi e sono sensibili alla concentrazione di intermedi come gli acidi grassi volatili.

Tale fase è condotta da microorganismi metanogeni come: Methanobacteri, Methanococcales, Methanomicrobiales i quali sono sensibili a variazioni di pH e richiedono, dunque, un ambiente meno acido, con un pH compreso tra 6,8 e 7,5.

La temperatura in questa fase può variare a seconda del regime utilizzato: mesofilo (35-40°C) o termofilo (50-55°C). Le condizioni termofile possono aumentare la velocità di reazione e ridurre i tempi di ritenzione, anche se richiedono un maggiore controllo operativo per evitare instabilità. Il doppio stadio consente un controllo più preciso dei parametri di processo (come pH e temperatura) per ottimizzare la resa in primis dell'idrogeno e nella fase successiva la resa del metano.

Questo approccio è particolarmente efficace per ridurre i tempi di ritenzione e aumentare l'efficienza complessiva, migliorando la stabilità del processo rispetto ai sistemi a stadio singolo.

## 4.2. Condizioni operative

La digestione anaerobica a doppio stadio ha suscitato un crescente interesse grazie alla sua maggiore efficienza nel trattamento dei rifiuti organici rispetto ai sistemi a stadio singolo.

Uno studio (di Zheng *et al.*,2024) evidenzia come la separazione delle fasi di produzione di idrogeno e metano consenta condizioni ottimali per diversi gruppi microbici, migliorando la resa di biogas e la stabilità operativa. In particolare, la separazione tra fase acidogenica e metanogenica permette un controllo più preciso del pH e della temperatura.

Di seguito, in tabella 4.1 vengono riassunti le condizioni operative principali della fermentazione a doppio stadio:

<b>Parametro</b>	<b>Primo Stadio (idrolisi e acidogenesi)</b>	<b>Secondo Stadio (acetogenesi e metanogenesi)</b>
<b>Temperatura</b>	30-40 °C	30-45 °C
<b>pH ottimale</b>	5.0-6.0	6.8-7.5
<b>Tempo di Ritenzione Idraulica (HRT)</b>	2-6 giorni	15-30 giorni
<b>Carico organico (OLR)</b>	2-5 kg COD/m <sup>3</sup> ·d	0.5-2 kg COD/m <sup>3</sup> ·d
<b>Rapporto CN</b>	25:1 – 30:1	20:1 – 30:1
<b>Prodotti Principali</b>	Acidi grassi volatili (VFAs), CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>	Metano (CH <sub>4</sub> ), CO <sub>2</sub>

Tabella 4.1, parametri operativi DF e AD

## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1. *Inoculo*

La resa del processo di dark fermentation è strettamente correlata alla presenza o meno di microorganismi idrogeno-consumatori come i metanigeni o omoacetogeni.

Dunque, è necessario in questo caso selezionare appositamente il consorzio batterico di inoculo o pretrattando il fango di inoculo. Il pretrattamento consente infatti di sfruttare la proprietà di alcuni batteri di generare spore se sottoposti a condizioni estreme, e di selezionare dunque all'interno del consorzio microbico solo queste specie, eliminando i batteri metanigeni che, invece, non sono sporigeni. Vi sono diverse specie batteriche, appartenenti a gruppi tassonomici e fisiologici differenti, in grado di produrre idrogeno in condizioni anaerobiche da biomassa e rifiuti. Tra queste abbiamo generi anaerobi obbligati di Clostridia (*C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. butylicum*, *C. acetobutylicum*, *thermocellum* e anaerobi facoltativi di *Escherichia Coli*, *Enterobacter* e *Citrobacter*.

Per le campagne sperimentali studiate, è stato utilizzato l'inoculo proveniente da uno stabilimento agricolo e di allevamento piemontese

### 5.2. *Substrato Sedamyl*

Sedamyl è un'azienda leader nel settore agroindustriale, specializzata nella produzione di derivati del grano. Fondata nel 1956 e con sede principale a Saluzzo, in provincia di Cuneo, Italia, l'azienda ha acquisito una posizione rilevante a livello europeo nella fornitura di ingredienti essenziali per l'industria alimentare, delle bevande, della carta, delle bioplastiche e dei mangimi. Sedamyl è attiva in diversi settori, tra cui:

1. **Amidi e Derivati dell'Amido:** L'azienda produce amidi nativi e modificati, utilizzati in vari settori industriali, inclusi alimentare, cartario, tessile e farmaceutico. Gli amidi sono utilizzati come addensanti, stabilizzanti, gelificanti e agenti leganti.
2. **Dolcificanti e Sciroppi:** Sedamyl produce sciroppi di glucosio e fruttosio, usati principalmente nell'industria alimentare e delle bevande. Questi prodotti sono ottenuti tramite idrolisi dell'amido e vengono impiegati come dolcificanti in prodotti da forno, bibite, caramelle e confetteria.
3. **Alcol e Alcolati:** L'azienda produce alcol etilico (etanolo) di alta qualità, utilizzato sia come bevanda alcolica che in prodotti farmaceutici e cosmetici. Il bioetanolo è anche una componente importante nei carburanti rinnovabili.
4. **Proteine e Fibra Alimentare:** Sedamyl estrae proteine e fibre dal grano, che sono utilizzate come ingredienti ad alto valore aggiunto per la produzione di alimenti e mangimi animali.

### 5.2.1 Caratteristiche di produzione



## THE PROCESS

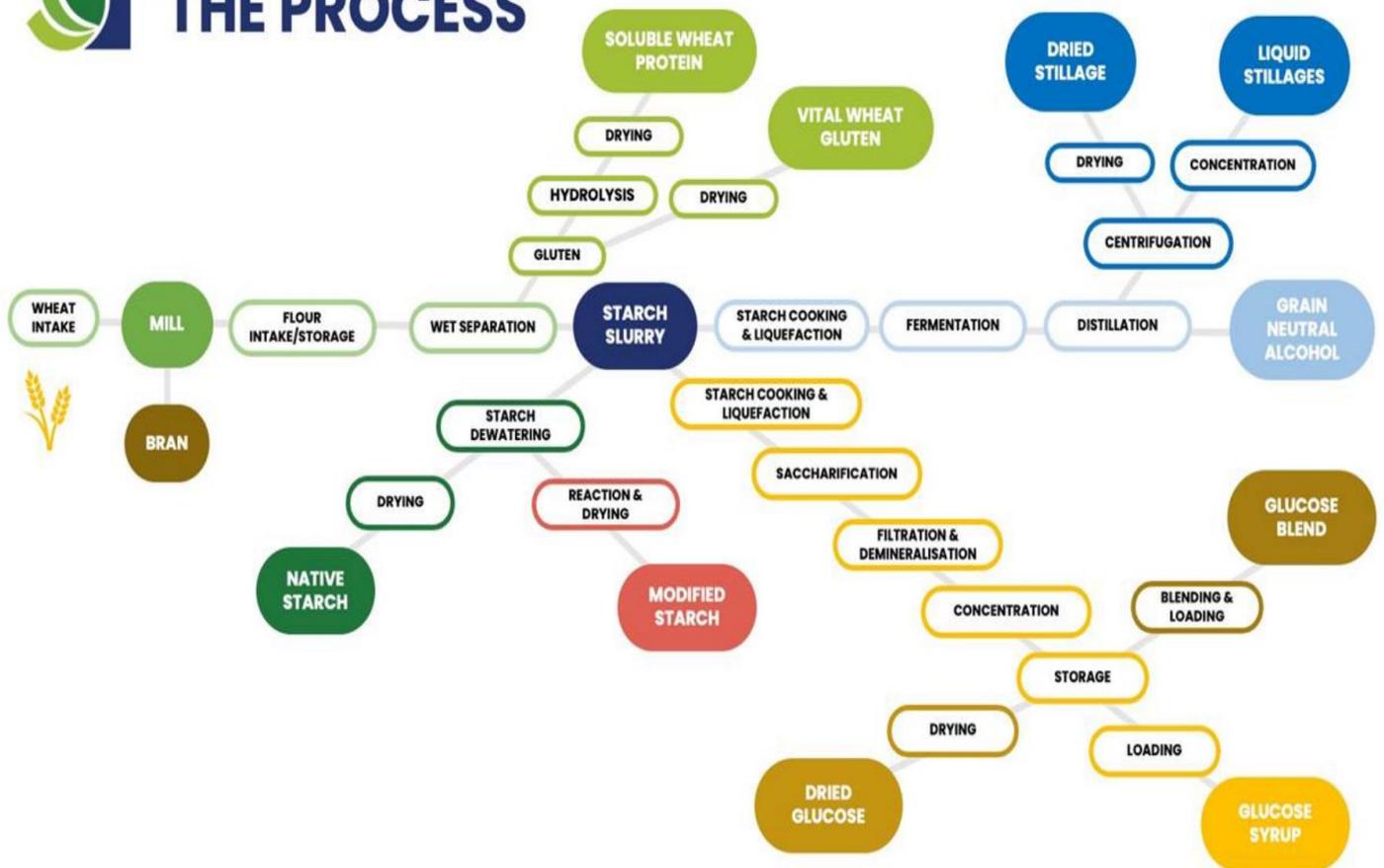


Diagramma di flusso 5.1, lavorazione del grano, Sedamyl, 2017

Il diagramma di flusso 5.1 illustra i processi industriali dell'azienda Sedamyl, per la trasformazione del grano e produzione di diversi prodotti, come amidi, sciroppi, proteine e bioetanolo.

Viene illustrato il trattamento di scarti e sottoprodotti, come sciroppi di glucosio che derivano dai processi di separazione e saccharificazione.

Il diagramma mostra le diverse fasi di lavorazione del grano, dalle prime fasi di macinazione fino alla produzione di prodotti finali destinati a vari settori industriali.

Ogni fase di questo processo è collegata a diverse tecnologie di raffinazione, estrazione e purificazione che consentono a Sedamyl di massimizzare l'efficienza e minimizzare gli sprechi.

La produzione di sciroppo di glucosio richiede un processo tecnologico avanzato che trasforma l'amido, una macromolecola complessa, in zuccheri semplici.

Questo processo include macinazione, idrolisi, filtrazione, e concentrazione:

### 1. *Macinazione del Grano*

Il grano viene inizialmente pulito per rimuovere impurità, come pietre, polvere e materiali estranei, che potrebbero compromettere l'efficienza del processo e la qualità del prodotto finale. La pulizia avviene attraverso setacci e aspiratori. Il grano pulito viene macinato in mulini a rulli o a martelli. La macinazione è progettata per separare l'amido dalla parte proteica e fibrosa del grano. L'uso di mulini a rulli a volte è preferito per ottenere una granulometria fine e uniforme. La dimensione delle particelle e l'efficienza della macinazione influenzano il rendimento dell'amido. Una macinazione troppo fine può comportare una maggiore produzione di polvere e una maggiore difficoltà nella separazione dell'amido.

### 2. *Idrolisi dell'Amido*

L'amido viene trattato con enzimi amilasi, che catalizzano la scomposizione dell'amido in zuccheri più semplici. L'idrolisi enzimatica può essere suddivisa in fasi, come la gelatinizzazione (dove l'amido è idratato e solubilizzato) e la saccarificazione (dove gli enzimi convertono l'amido in glucosio, maltosio, e oligosaccaridi). Alternativamente, si possono usare acidi come l'acido cloridrico a bassa concentrazione per idrolizzare l'amido. Questo processo richiede condizioni di alta temperatura e pressione. La temperatura, il pH e il tempo di reazione sono parametri fondamentali che influenzano il grado di idrolisi e la composizione del prodotto finale. La reazione enzimatica avviene in reattori a temperatura controllata per garantire l'efficienza della conversione.

### 3. *Filtrazione e Purificazione*

Dopo l'idrolisi, il liquido contenente il glucosio viene sottoposto a filtrazione per rimuovere impurità e componenti non desiderati come proteine, fibre, e altre particelle sospese. Tecnologie come la microfiltrazione e l'ultrafiltrazione sono comunemente impiegate. Per ottenere una purezza elevata, il liquido può essere ulteriormente purificato tramite tecniche come l'adsorbimento su resine, l'ion exchange e la deionizzazione. Le membrane di filtrazione devono essere selezionate in base alla dimensione dei pori e alla compatibilità con il liquido da trattare. La scelta delle membrane influenza l'efficienza della separazione e la qualità del permeato. Il fouling delle membrane, causato dall'accumulo di materiali sulla superficie della membrana, può ridurre l'efficienza della filtrazione e aumentare i costi di manutenzione. Tecniche di pulizia regolari e l'ottimizzazione delle condizioni di filtrazione sono fondamentali per minimizzare il fouling.

#### *4. Concentrazione*

Il liquido filtrato viene concentrato tramite evaporazione. Questo processo può avvenire in evaporatori a film sottile o a effetto multiplo, dove il liquido viene riscaldato per rimuovere l'acqua in eccesso e raggiungere la viscosità desiderata.

Dopo l'evaporazione, lo sciroppo di glucosio concentrato viene raffreddato e messo in appositi stock. La concentrazione del prodotto finale varia a seconda delle esigenze dell'industria alimentare e delle specifiche applicazioni.

Lo sciroppo di glucosio è ampiamente utilizzato come dolcificante in prodotti da forno, bevande, migliora la texture, previene la cristallizzazione dello zucchero e può prolungare la shelf life dei prodotti. È un prodotto di notevole interesse da parte di aziende industriali poiché rappresenta un substrato ideale per la crescita microbica.

Questo perché lo sciroppo di glucosio fornisce una fonte di carboidrati facilmente assimilabile, favorendo così l'attività metabolica e la proliferazione di microrganismi utilizzati in vari processi biotecnologici. La sua composizione chimica e il suo profilo di zuccheri solubili lo rendono particolarmente adatto per applicazioni che richiedono un supporto nutritivo efficace per colture microbiche, rendendolo un elemento chiave in numerosi settori industriali, dalla produzione di bio prodotti alla fermentazione e alla sintesi di composti biologici. Nello specifico, la produzione di sciroppi di glucosio presso impianti avanzati come quelli di Sedamyl coinvolge una serie di processi interconnessi.

Inizia con la cottura dell'amido, un processo che richiede la gelatinizzazione completa dell'amido estratto dalla farina di grano attraverso vapore ad alta pressione e temperatura superiore a 100°C. Questo passo è fondamentale per rompere le strutture cristalline dell'amido e renderlo reattivo agli enzimi. I reattori a vapore devono essere progettati per garantire un controllo preciso della temperatura e della pressione per evitare la denaturazione dell'amido o la formazione di sottoprodotti indesiderati.

Successivamente, l'amido gelatinizzato viene sottoposto a idrolisi enzimatica, in cui l'amilasi rompe i legami  $\alpha$ -1,4-glicosidici per produrre maltosio e destrine, seguita dalla saccarificazione con amiloglicosidasi per convertire ulteriormente le destrine in glucosio.

#### ***5.2.2. Caratteristiche Sottoprodotti Sedamyl***

Dopo l'idrolisi, il liquido contenente glucosio viene filtrato tramite membrane ceramiche in una fase di microfiltrazione, progettata per rimuovere impurità solide e particelle non desiderate, mantenendo un'elevata purezza del prodotto. Le membrane devono essere progettate per minimizzare il fouling e garantire un flusso costante.

Il filtrato è poi concentrato tramite evaporazione a film sottile o evaporazione a effetto multiplo, che riduce l'acqua per raggiungere la viscosità richiesta; questo processo richiede una gestione efficiente della temperatura e della pressione di evaporazione per migliorare l'efficienza energetica. Il retentato della produzione di destrosio, ricco di circa il 90-95% di destrosio e impurità accumulate, è sottoposto a un'ulteriore microfiltrazione su membrane metalliche sinterizzate, separando il prodotto in permeato e retentato. Il **Retentato** è destinato alla fermentazione alcolica, mentre il **Permeato** è inviato a un'ulteriore fase di demineralizzazione per rimuovere i minerali in eccesso e preparare il prodotto per utilizzi successivi. Sedamyl è specializzata nell'industria agroalimentare, in particolare per la produzione di derivati ottenuti attraverso il trattamento delle frazioni liquide della lavorazione del grano. Tra questi derivati vi sono il **Permeato**, il **Retentato** e l'**Alimento** tre sottoprodotti, derivanti dai processi di filtrazione a membrana come l'ultrafiltrazione e la microfiltrazione. Questi processi sono essenziali per separare i componenti della frazione liquida in base alla loro dimensione e proprietà chimico-fisiche. La filtrazione a membrana (*figura 5.1*) è una tecnologia separativa avanzata che sfrutta membrane semipermeabili per separare i componenti di una soluzione liquida. In particolare, l'ultrafiltrazione e la microfiltrazione sono tecniche di filtrazione che utilizzano membrane con diverse dimensioni di poro per ottenere separazioni specifiche:

- Microfiltrazione (MF): Impiega membrane con pori più grandi, generalmente nell'ordine di 0,1 a 10 micrometri. La microfiltrazione è efficace nel rimuovere particelle solide in sospensione e le macromolecole più grandi.
- Ultrafiltrazione (UF): Utilizza membrane con pori di dimensioni comprese tra 1 e 100 nanometri. Questa tecnologia consente di separare le proteine, i polipeptidi mantenendo la maggior parte dei sali e dei piccoli soluti.

Queste tecniche sono importanti per il trattamento delle frazioni liquide ottenute dalla lavorazione del grano, ottimizzando la qualità e la purezza dei sottoprodotti.

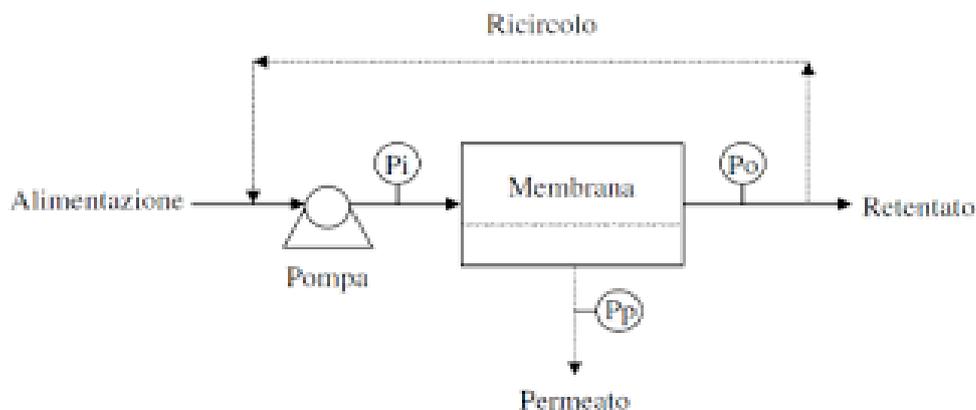


Figura 5.1- Separazione a membrana sottoprodotti liquidi, Denko Cop 2016

Nel contesto della separazione a membrana, il termine “Feed” o “Alimento” si riferisce alla soluzione o sospensione che viene introdotta nel sistema di separazione per essere trattata. Questa soluzione contiene il materiale da separare. La qualità e composizione del feed influenzano direttamente l'efficacia del processo di separazione e le caratteristiche finali dei prodotti ottenuti, cioè il retentato e il permeato.

Il **Feed** è la miscela iniziale di componenti che viene sottoposta al processo di separazione a membrana. Esso può contenere una varietà di sostanze disciolte e sospese, a seconda del materiale di partenza e degli obiettivi del processo. Esso contiene principalmente:

- **Solidi Sospesi:** Particelle solide, inclusi detriti vegetali o cellulari, che devono essere rimosse.
- **Soluti:** Molecole disciolte come zuccheri, sali minerali, e proteine.
- **Macromolecole:** Proteine, polisaccaridi, e altre grandi molecole.

Durante il processo di separazione a membrana, il feed viene pompato attraverso un sistema che utilizza una membrana di nanofiltrazione semipermeabile (*figura 5.2*). La membrana separa i componenti del feed in base alla loro dimensione, carica e altre proprietà fisiche e chimiche. Spesso è necessario pretrattare il feed per rimuovere particelle grossolane e ridurre la viscosità, migliorando così l'efficienza del processo e prolungando la vita della membrana. Il **Permeato** è la frazione liquida che attraversa la membrana durante il processo di filtrazione. Dal punto di vista chimico e biochimico, il permeato è caratterizzato da un'elevata solubilità di componenti piccoli e soluti, come il glucosio, minerali (elementi come calcio, magnesio e sodio), e piccole molecole organiche. Il **Retentato**, invece, è la frazione solida o concentrata che rimane sulla superficie della membrana e non riesce a passare attraverso di essa. Questa frazione è ricca di macronutrienti, tra cui: proteine, grassi e carboidrati.



Figura 5.2 -Processo di Filtrazione a membrana Sedamyl,2018

Nel settore alimentare, il retentato è spesso utilizzato come additivo in prodotti ad alto contenuto proteico e per la produzione di alimenti specializzati. La sua ricchezza in proteine e altri nutrienti lo rende particolarmente utile per migliorare il profilo nutrizionale di prodotti alimentari e mangimi per animali. I prodotti come il permeato e il retentato non solo ampliano le applicazioni industriali dei sottoprodotti della lavorazione del grano, ma promuovono anche la sostenibilità e l'efficienza nella gestione delle risorse.



Figura 5.3 - Campioni dei substrati Sedamyl

La cottura dell'amido rappresenta una fase fondamentale nella produzione di sciroppi di glucosio, in cui si verifica la depolimerizzazione delle lunghe catene polisaccaridiche costituenti l'amido nativo, che è insolubile in acqua. Questo processo si realizza mediante l'applicazione congiunta di calore e di enzimi specifici, che facilitano la rottura dei legami glicosidici all'interno delle molecole di amido, trasformandole in zuccheri più semplici. Durante questa fase, l'amido viene esposto a vapore saturo ad alta temperatura ( $>100^{\circ}\text{C}$ ) in un reattore a pressione controllata, che garantisce una gelatinizzazione uniforme dell'amido. L'uso di enzimi come alfa-amilasi e amiloglicosidasi consente di ottenere una varietà di sciroppi con composizioni saccaridiche diversificate: da sciroppi ricchi di glucosio (destrosio) a soluzioni predominanti di maltosio o oligosaccaridi a catena corta (meno di dieci monomeri).



Figura 5.4 - Step lavorazione dell'amido, Sedamyl, 2018

Dopo l'idrolisi enzimatica, il processo di filtrazione rimuove impurità insolubili (*figura 5.4*), come fibre e grassi, utilizzando membrane di microfiltrazione che trattengono particelle solide e colloidali, garantendo la purezza del liquido grezzo. Successivamente, la demineralizzazione avviene attraverso resine di scambio ionico che rimuovono sali minerali, tracce di proteine e altri componenti organici polari. Questo trattamento di demineralizzazione è fondamentale per stabilizzare la microbiologia e il colore del prodotto, migliorando la sua stabilità e durata di conservazione. Una membrana selettiva (diametro pori  $\approx$  1-5 nm) permette di separare il monomero del glucosio dal resto degli oligo e polisaccaridi.

La rimozione dei sali e dei contaminanti organici riduce il rischio di crescita microbica e preserva le caratteristiche sensoriali e chimiche dello sciroppo, ottimizzando così la qualità e la durata del prodotto finale. Di seguito viene riportata la *tabella 5.1* che riassume le caratteristiche principali degli scarti Sedamyl:

<b>Parametri</b>	<b>Valori</b>
<b>pH</b>	3.5
<b>Conducibilità</b>	600 $\mu$ S/cm
<b>Composizione Acidi Grassi</b>	15%
<b>Fibre</b>	8%
<b>Not (azoto)</b>	0.05%
<b>Polisaccaridi non amilacei</b>	1%
<b>Destrosio</b>	>95%
<b>Fruttosio</b>	0.5%
<b>Trilosio</b>	1%
<b>Maltosio</b>	2%

*Tabella 5.1 parametri scarti Sedamyl, 2018*

### **5.3. Set-up digestione a doppio stadio**

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

1. La prima campagna sperimentale rivolge l'attenzione sulla DF associata al secondo stadio anaerobico AD per la produzione di metano.
2. La seconda campagna sperimentale, come la prima, studia il processo di fermentazione anaerobica a doppio stadio apportando implementazioni e ottimizzazioni dei parametri operativi.
3. La terza campagna sperimentale, invece, si focalizza sulla singola DF conducendo in modo parallelo un confronto con sistemi re-inoculati.
4. La quarta campagna sperimentale è finalizzata scale-up del sistema in DF con confronto sull'analisi della crescita microbica.

### 5.4.1 Prima Campagna sperimentale: Fermentazione a doppio stadio

L'esperimento è stato condotto utilizzando otto reattori di 250 ml (volume di lavoro 200 ml) al fine di studiare la digestione anaerobica a doppio stadio. Nello specifico sono stati realizzate duplici configurazioni reattoristiche finalizzate allo studio degli scarti Sedamyl (Permeato, Retentato e Alimento) e analisi dell'inoculo in possesso. In *Tabella 5.1* sono elencate le configurazioni adottate per lo studio dei substrati e dell'inoculo utilizzati:

Configurations	Sigla	Working volume (ml)	Real working volume (ml)	S:I	HCl 5 M added (ml)	pH after HCl
PERMEATO	PERM1	200,00	200.8	1-1	3	6.52
	PERM2	200,00	201.1	1-1	3	6.55
RETENTATO	RET1	200,00	201.8	1-1	3	6.47
	RET2	200,00	200.3	1-1	3	6.42
ALIMENTO	ALIM1	200,00	202.7	1-1	3	6.5
	ALIM2	200,00	202.2	1-1	3	6.51
INOCULUM	INOC1	200,00	203	1-1	4	6.55
	INOC2	200,00	204	1-1	4	6.48

*Tabella 5.1, configurazioni reattoristiche prima campagna sperimentale*

Il pH di partenza è stato regolato verso un valore ottimale di 6.5 per raggiungere le condizioni di pH ottimali per la DF, mediante l'utilizzo di HCl 5 M. Al fine di inibire le comunità idrogeno-consumatori nella prima fase di DF, l'inoculo è stato pretrattato termicamente ad una temperatura di 80 °C per 90 minuti. I reattori sono stati agitati quotidianamente per facilitare il mass-transfer dei nutrienti e garantire una distribuzione uniforme della biomassa e dei substrati, facilitando il processo metabolico dei microrganismi anaerobi. Per garantire l'assenza di ossigeno, condizione essenziale per la digestione anaerobica, i reattori sono stati insufflati con gas inerte (azoto) per 45 minuti, tempo calcolato in base al volume del sistema, al fine di prevenire l'ossidazione e la proliferazione di batteri aerobici. Come illustrato in *figura 5.4* è possibile notare la configurazione reattoristica utilizzata. Essa è costituita reattori di vetro sigillate per simulare un ambiente batch aventi un tappo a due vie per insufflare azoto nella fase di up-stream (tappo rosso) e consentire lo spurgo del biogas prodotto (tappo blu). In quest'ultimo, il biogas viene inviato in apposite sacche da 2 litri ciascuna e successivamente analizzato al gascromatografo.



Figura 5.4, configurazione impiantistica

Il rapporto substrato-inoculo adottato è di 1:1, calcolato sulla base ai solidi volatili. Per determinare le quantità di inoculo, substrato da introdurre nel reattore, sono state fatte valutazioni sui solidi totali e sui solidi volatili immessi. Il calcolo dei grammi di solidi totali da somministrare è stato eseguito utilizzando la formula 5.1:

$$ST_{alimentati}(g) = \frac{6\% * volume\ di\ lavoro}{100} = 12\ g \quad [5.1]$$

Considerando i solidi totali e i solidi volatili dei substrati utilizzati, si può calcolare la massa dei solidi volatili da alimentare in base alla formula 5.2:

$$\frac{ST_{alimentati}(g)}{\frac{1}{\frac{SV}{ST}\%inoculo} + \frac{1}{\frac{SV}{ST}\%substrato}} = SV_{alimentati}(g) \quad [5.2]$$

In seguito, sono stati calcolati i solidi volatili presenti nel substrato determinati utilizzando la formula 5.3:

$$SV_{substrato} = SV_{alimentati} * \%_{substrato} \quad [5.3]$$

La somma dei solidi totali di inoculo e substrato deve essere in totale di 12 grammi per rispettare la percentuale del 6% di solidi totali da alimentare al reattore.

Successivamente, è stato calcolato il quantitativo di massa tal quale da introdurre nel reattore, come indicato dalle *formule 5.4, 5.5*:

$$ST_{substrato}(g) = \frac{SV_{substrato}}{\frac{SV}{ST}\%_{substrato}} \quad [5.4]$$

$$ST_{inoculo}(g) = \frac{SV_{inoculo}}{\frac{SV}{ST}\%_{inoculo}} \quad [5.5]$$

Infine, è stato effettuato il calcolo della massa tal quale da alimentare al reattore come mostrato nelle *formule 5.6, 5.7*.

$$tal\ quale\ substrato\ (g) = \frac{ST_{substrato}}{ST\%_{substrato}} \quad [5.6]$$

$$tal\ quale\ inoculo\ (g) = \frac{ST_{inoculo}}{ST\%_{inoculo}} \quad [5.7]$$

Sono state effettuate le seguenti analisi: misurazione del volume del biogas prodotto mediante svuotamento delle sacche di raccolta del gas, analisi del biogas tramite gas cromatografia, e misurazione del pH sia prima che dopo la fermentazione. Inoltre, sono stati calcolati i solidi totali (ST) e i solidi volatili (SV), e sono state eseguite analisi elementari sui digestati. Al termine del processo, il digestato del primo stadio è stato utilizzato come substrato per il secondo stadio di digestione anaerobica, con l'obiettivo di produrre metano e valorizzare lo scarto del primo stadio per ottenere un composto ad alto valore aggiunto.

#### **5.4.2 Seconda campagna sperimentale: implementazione fermentazione a doppio stadio**

La seconda campagna sperimentale, simile alla prima, si concentra sullo studio del processo di fermentazione anaerobica a doppio stadio, introducendo implementazioni e ottimizzazioni dei parametri operativi. A differenza del caso studio precedente, sono state realizzate dodici configurazioni, con percentuali di solidi totali (TS) introdotti pari rispettivamente al 6% e al 3%, al fine di consentire un confronto tra le due diverse condizioni operative.

Le configurazioni adottate sono riportate nella *Tabella 5.2*.

Configurazioni	Reattori	Volume Reattori (ml)	Volume operativo reale (ml)	S:I	pH corretto con HCl
PERMEATO 6%	1	200	200.4	1-1	6.5
	2	200	200.1	1-2	6.5
PERMEATO 3%	3	200	201.2	1-1	6.3
	4	200	200.2	1-1	6.5
RETENTATO 6%	5	200	200.7	1-1	6.5
	6	200	200.2	1-1	6.5
RETENTATO 3%	7	200	200.5	1-1	6.1
	8	200	200.4	1-1	6.1
ALIMENTO 6%	9	200	200.9	1-1	6.5
	10	200	201.2	1-1	6.5
ALIMENTO 3%	11	200	200.7	1-1	6.17
	12	200	201.3	1-1	6.16

*Tabella 5.2 - Configurazioni seconda campagna sperimentale*

Inoltre, si è tenuto conto dell'influenza del rapporto C/N. Difatti, da letteratura scientifica risulta che il rapporto ottimale tra carbonio e azoto (C/N) si attesta intorno a 30, condizione ideale per favorire una corretta attività microbica nei processi biologici di digestione anaerobica (Zhang *et al.*, 2014). Di seguito in *tabella 5.3* vengono espressi i valori C/N dei substrati studiati.

SUBSTRATO	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	C/N ratio
PERMEATO	0.42±0.74	12.69±1.89	7.49±0.92	0.007±0.001	31.31±1.62
RETENTATO	0.35±0.62	12.84±1.78	8.56±0.88	0.005±0.001	36.77±1.77
ALIMENTO	0.34±0.43	12.76±1.55	7.65±1.12	0.01±0.002	37.32±1.23

*Tabella 5.3- rapporto carbonio azoto substrati.*

Pertanto, nelle suddette configurazioni sono state applicate le *formule 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4*, considerando, tuttavia, che per le configurazioni con il 3% di solidi totali, la somma dei solidi totali è stata determinata in conformità alla *formula 5.8*.

$$ST_{alimenti}(g) = \frac{3\% * volume\ di\ lavoro}{100} = 6\ g \quad [5.8]$$

Al termine del processo, il digestato ottenuto dal primo stadio è stato impiegato come substrato per il secondo stadio della digestione anaerobica, con l'intento di produrre metano e valorizzare ulteriormente il residuo del primo stadio, al fine di ottenere un composto di elevato valore aggiunto.

### 5.4.3. Terza campagna sperimentale: DF e reinocolo.

La terza campagna sperimentale si concentra esclusivamente sulla dark fermentation e include un confronto parallelo con sistemi re-inoculati. A differenza delle campagne precedenti, qui si è optato per una configurazione avente il 10% vol. di inoculo come da letteratura scientifica (Chong 2013) in modo tale da avere un sistema meno torbido e migliorare la stabilità operativa del sistema. Una concentrazione più alta di inoculo può ridurre i tempi di avvio, stabilizzare la produzione di biogas e migliorare la digestione dei materiali organici complessi offrendo così indicazioni su come diverse concentrazioni influenzano l'efficacia complessiva del processo. Tale configurazione, infatti, ha presentato come risultato una rappresentazione accurata della crescita microbica nelle sue fasi costituenti, con tempo di ritenzione idraulica maggiore rispetto alle precedenti e ciò ha permesso di delineare con maggiore precisione. Di seguito *in tabella 5.4* sono i parametri utilizzati:

	<b>PERMEA TO TS 8%</b>	<b>PERMEATO 10% inoculo</b>	<b>RETENTATO TS 8%</b>	<b>RETENTATO 10% inoculo</b>	<b>ALIMENTO TS 8%</b>	<b>ALIMENTO 10% inoculo</b>
<b>QUANTITA' SUBSTRATO (g)</b>	39.33	39.33	34.39	34.39	38.22	38.22
<b>QUANTITA' DI INOCULO (ml)</b>	78.31	20.00	150.9	20.00	150.9	20.00
<b>QUANTITA' DI ACQUA (ml)</b>	82.36	140.67	14.71	145.61	10.88	141.78
<b>VS PERMEATO (g)</b>	12.62	12.62	12.62	12.62	12.62	12.62
<b>VS INOCULO (g)</b>	2.47	0.63	4.75	0.63	4.75	0.63

Tabella 5.4, Configurazioni terza campagna sperimentale

Come mostrato nella *Tabella 5.4*, sono state adottate sei configurazioni suddivise in due gruppi, differenziati in base alla percentuale di solidi totali, fissata all'8%, e alla quantità di inoculo presente, pari al 10%. Al termine della fase di DF, è stato prelevato il digestato contenente l'inoculo, già adattato al substrato, per reintrodurlo in ulteriori reattori.

Questo procedimento è stato finalizzato a ridurre il tempo della fase lag del processo microbico.

#### **5.4.4. Quarta Campagna sperimentale: DF, scale-up e crescita microbica**

La quarta campagna sperimentale è dedicata all'implementazione della singola DF effettuando uno scale-up. In questo esperimento è stato variato il volume dei reattori utilizzati, permettendo un'analisi più approfondita del processo con parametri reattoristici simili a quelli precedenti. Sono stati impiegati reattori da 500 ml, mantenendo la capacità massima dell'80%, in particolare si è introdotto una quantità di inoculo del 10% in volume in tutte le configurazioni come mostrato nella *Tabella 5.5*.

	<b>PERMEATO 10% inoculo</b>	<b>RETENTATO 10% inoculo</b>	<b>ALIMENTO 10% inoculo</b>
<b>QUANTITA' SUBSTRATO (g)</b>	79.66	68.42	79.66
<b>QUANTITA' DI INOCULO (ml)</b>	40.00	40.00	40.00
<b>QUANTITA' DI ACQUA (ml)</b>	281.64	290.3	283.34
<b>VS PERMEATO (g)</b>	25.22	25.22	25.22
<b>VS INOCULO (g)</b>	1.21	1.21	1.21

*Tabella 5.5- Configurazioni quarta campagna sperimentale*

La suddetta campagna ha coinvolto l'impiego di nove configurazioni, al fine di garantire una maggiore attendibilità dei dati raccolti e di consentire un prelievo giornaliero del brodo di coltura mediante siringa, così da analizzare successivamente la quantità di biomassa presente all'interno dei reattori. Il prelievo del brodo di coltura è stato eseguito con cadenza giornaliera per un periodo di 7 giorni, al fine di monitorare l'andamento della crescita microbica e correlare lo sviluppo della biomassa alla produzione giornaliera di biogas.

Ogni campione estratto, pari a circa 2 ml, è stato immediatamente congelato dopo il prelievo, per inibire eventuali ulteriori processi di crescita o attività metabolica all'interno della provetta, garantendo così che le analisi successive riflettessero accuratamente le condizioni sperimentali presenti al momento del campionamento.

## ***5.5. Monitoraggio della produzione giornaliera di biogas***

Il monitoraggio della produzione giornaliera di biogas avviene prelevando campioni di gas direttamente dalle sacche di raccolta utilizzando una siringa.

I campioni prelevati vengono successivamente analizzati tramite gascromatografia, una tecnica che separa i diversi componenti del biogas e altri gas. Questo metodo permette una precisa quantificazione dei gas prodotti e offre dati fondamentali per valutare l'efficienza della digestione anaerobica e ottimizzare i parametri del processo.

### ***5.5.1. Analisi al gas cromatografo***

L'analisi al gascromatografo (GC) è una tecnica analitica avanzata utilizzata per separare, identificare e quantificare i componenti volatili e semi-volatili presenti in una miscela complessa. Il funzionamento di un gascromatografo si basa su tre fasi principali: iniezione del campione, separazione dei componenti e rilevazione dei singoli composti.

Il campione, in forma liquida o gassosa, viene iniettato nel gascromatografo tramite una siringa in un dispositivo chiamato iniettore, per poi attraversare una colonna cromatografica in cui vi è un gas di trasporto (carrier gas), generalmente elio o idrogeno.

Il cuore del sistema è costituito dalla colonna cromatografica situata all'interno di un forno con temperatura controllata. Questa colonna è riempita con una fase stazionaria, un materiale che interagisce diversamente con ciascun componente del campione.

I composti più volatili o meno interagenti con la fase stazionaria attraversano la colonna più velocemente, mentre quelli più affini alla fase stazionaria vengono trattenuti più a lungo.

La volatilità e la polarità dei composti, oltre che le caratteristiche della fase stazionaria stessa governano fondamentalmente questo processo di interazione e separazione

La separazione dei composti avviene in base al tempo di ritenzione, ovvero il tempo necessario affinché un particolare composto attraversi la colonna e raggiunga il rivelatore.

Il rivelatore, che può essere di vari tipi (tra cui il rivelatore a ionizzazione di fiamma, FID, e il rivelatore a cattura di elettroni, ECD), misura la concentrazione del composto al momento in cui emerge dalla colonna, producendo un segnale che viene registrato sotto forma di picchi in un cromatogramma. L'area sotto ciascun picco è proporzionale alla quantità del composto presente nel campione.

La gascromatografia è ampiamente utilizzata per diverse applicazioni. In ambito ambientale, serve per monitorare la qualità dell'aria e dell'acqua, rilevando la presenza di inquinanti organici volatili (VOC) e pesticidi. Nell'industria petrolchimica, la GC viene impiegata per analizzare la composizione degli idrocarburi nei prodotti petroliferi, come benzine e oli, poiché garantisce la

conformità alle specifiche richieste. Nel settore alimentare, viene utilizzata per il controllo di qualità, identificando aromi, additivi e contaminanti presenti negli alimenti.

L'analisi dei prodotti di reazione in processi catalitici è una delle principali applicazioni della GC nell'ingegneria chimica. Per esempio, nella sintesi di biocarburanti, la GC permette di monitorare l'efficienza della conversione delle materie prime in bioprodotto, perché identifica e quantifica i sottoprodotti indesiderati.

### 5.5.2. *Analisi elementare CHNSO*

La tecnica utilizzata per determinare la composizione elementare di un campione, in termini di carbonio (C), idrogeno (H), azoto (N), zolfo (S) e ossigeno (O) è l'analisi elementare CHNSO. 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.

Il funzionamento dell'analisi CHNSO si basa sulla combustione totale del campione in un ambiente ricco di ossigeno, ad alta temperatura, generalmente attorno ai 1000-1100° C.

Durante la combustione, gli elementi presenti nel campione vengono ossidati e convertiti in gas semplici: il carbonio diventa anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), l'idrogeno diventa acqua (H<sub>2</sub>O), l'azoto diventa ossido di azoto (NO<sub>x</sub>) o azoto molecolare (N<sub>2</sub>), lo zolfo diventa anidride solforosa (SO<sub>2</sub>) e l'ossigeno viene misurato indirettamente, generalmente attraverso la differenza di massa. Questi gas vengono poi separati e quantificati utilizzando tecniche di rilevamento avanzate, come la cromatografia a conduzione termica (TCD), per determinare la concentrazione di ciascun elemento nel campione. In aggiunta, si può ricavare la percentuale di ossigeno mediante complemento a cento rispetto agli altri elementi ottenuti mediante la *formula 5.9*:

$$O\% = 100 - C\% - H\% - N\% - S\% \quad [5.9]$$

Per confermare la purezza di un composto, per l'ottimizzazione dei processi di sintesi chimica e per il bilancio di massa nelle reazioni chimiche l'analisi CHNSO è essenziale.

Nell'ambito della produzione di biocarburanti, ad esempio, tale analisi consente di valutare la qualità del biocarburante prodotto e la sua conformità agli standard internazionali, garantendo così efficienza energetica e sostenibilità ambientale.

### 5.5.3. Analisi dei solidi totali e analisi dei solidi volatili

Le due procedure fondamentali utilizzate per caratterizzare i materiali solidi presenti in campioni di acque reflue, fanghi, suoli e biomasse sono l'analisi dei solidi totali (TS) e dei solidi volatili (VS). Queste analisi sono cruciali per comprendere la composizione dei solidi e la loro potenziale biodegradabilità, e giocano un ruolo essenziale nel controllo e nella gestione dei processi di trattamento delle acque e nella produzione di biogas.

L'analisi dei solidi totali (TS) misura la quantità totale di solidi presenti in un campione, che include sia i solidi sospesi che quelli disciolti.

Il processo inizia con l'essiccazione del campione a una temperatura di circa 105 °C fino a ottenere un peso costante. L'acqua viene così completamente evaporata, e il residuo solido rimanente viene pesato per determinare la concentrazione totale di solidi espressa in mg/L o g/L. Questo valore rappresenta la somma dei solidi volatili (VS) e dei solidi fissi (FS), fornisce una misura complessiva della materia solida nel campione. Il calcolo dei TS è espresso dalla *formula 5.10*:

$$TS \% = \frac{\text{massa campione post essiccazione a } 105 \text{ } ^\circ\text{C (g)}}{\text{massa campione iniziale (g)}} * 100 \quad [5.10]$$

Successivamente, per l'analisi dei solidi volatili (VS), il residuo ottenuto dall'analisi dei TS viene sottoposto a una combustione a una temperatura di circa 550 °C in un forno a muffola (*formula 5.11*). A questa temperatura, la materia organica presente nei solidi viene ossidata e volatilizzata, lasciando solo i solidi inorganici non combustibili, che costituiscono le ceneri.

Il calcolo dei VS/TS è espresso dalla *formula 5.11*:

$$\frac{VS}{TS} \% = \frac{1 - \text{massa campione post essiccazione a } 550 \text{ } ^\circ\text{C (g)}}{\text{massa campione iniziale (g)}} * 100 \quad [5.11]$$

Il calo di peso del residuo tra i 105° C e i 550° C è quindi attribuito ai solidi volatili, che rappresentano la frazione organica del campione. Questa differenza di massa permette di quantificare la percentuale di solidi volatili (VS), che è un indicatore diretto del contenuto organico e quindi del potenziale di degradazione biologica del materiale.

L'importanza di queste analisi risiede nel fatto che i solidi totali e volatili sono parametri chiave nella gestione dei processi di trattamento delle acque reflue e dei fanghi, in particolare nella digestione anaerobica per la produzione di biogas. Un alto contenuto di VS indica una maggiore presenza di materia organica, che è potenzialmente convertibile in biogas (principalmente metano e anidride carbonica) attraverso processi microbiologici.

Questo rende l'analisi VS fondamentale per valutare l'efficienza del processo di digestione e per prevedere la resa energetica. Inoltre, il rapporto tra VS e TS è utilizzato per monitorare la stabilità dei fanghi e la necessità di ulteriori trattamenti, come la stabilizzazione o il compostaggio.

#### ***5.5.4. Peso Secco e Crescita microbica***

##### ***Peso Secco***

Il metodo del peso secco mediante l'utilizzo di una pompa sottovuoto è una tecnica per determinare la massa di un campione dopo l'eliminazione dell'umidità, fondamentale in molte applicazioni industriali e di ricerca, come il controllo della qualità dei materiali e la caratterizzazione delle proprietà fisico-chimiche di campioni solidi.

Il processo inizia con la preparazione del campione, che viene posizionato su un filtro di separazione all'interno di una camera a vuoto.

Il filtro di separazione, solitamente realizzato con un materiale poroso come il vetro sinterizzato o un filtro di membrane specifiche come acetato di cellulosa, permette il passaggio dell'aria e dell'acqua con piccole molecole disciolte mentre trattiene il campione solido.

Una volta versato il campione sul filtro posizionato su un becher, si attiva una pompa sottovuoto che riduce la pressione all'interno del becher in modo tale da creare internamente una pressione negativa e facilitare la nanofiltrazione (*Figura 5.5*).



*Figura 5.5- Filtrazione brodo di coltura mediante pompa a vuoto*

Questo metodo consente di isolare i microorganismi dalla matrice del digestato per una quantificazione accurata e per un'analisi dettagliata del loro sviluppo.

Per separare i microorganismi, il digestato viene filtrato costituendo una “torta” di microorganismi, mentre il liquido e le particelle più piccole percolano nel becher.

In tal modo, volta che l'umidità è stata rimossa, il campione di microorganismi viene essiccato in stufa e pesato per ottenere il peso secco. La quantificazione della biomassa secca consente di calcolare il tasso di crescita microbica e di costruire curve di crescita, che tracciano l'aumento della biomassa in funzione del tempo. Le curve di crescita forniscono informazioni sulla velocità di crescita, sullo stato fisiologico e sull'efficienza dei microorganismi nel digestato.

Inoltre, la misura del peso secco e la costruzione delle curve di crescita microbica offrono uno strumento di monitoraggio e controllo per garantire che i processi biologici avvengano come previsto, facilitando anche la validazione dei modelli biologici e delle simulazioni previste per la scala industriale.

### ***Crescita microbica:***

La crescita microbica può essere descritta tramite modelli matematici che correlano la velocità di crescita con la disponibilità di nutrienti. La velocità di crescita netta dei microrganismi è data dalla espressione generale *formula 20* (Malpei *et al.*,2007):

$$\frac{dX}{dt} = Y \frac{dS}{dt} - k_d X \quad [20]$$

Dove:  $\frac{dX}{dt}$  è la velocità di crescita dei microrganismi, [massa/volume  $tempo^{-1}$ ]; Y è il coefficiente di rendimento di crescita, [massa microrganismi formati massa substrato utilizzato];  $\frac{dS}{dt}$  è la velocità di utilizzazione del substrato da parte dei microrganismi, [ $tempo^{-1}$ ];

$k_d$  è il coefficiente di decadimento dei microrganismi, [ $tempo^{-1}$ ]; X è la concentrazione di microrganismi, [massa/volume].

La degradazione del substrato, in un percorso fermentativo, è descritta da modello cinetico di Michaelis-Menten o di Monod.

L'andamento della degradazione è ben rappresentato da una cinetica a saturazione, esprimibile analiticamente attraverso la *formula 21*.

$$\mu = \mu_{MAX} \frac{S}{k_S + S} - k_d \quad [21]$$

dove:  $\frac{dX}{dt}$  è la velocità di crescita dei microrganismi per una data concentrazione di substrato S, [ $tempo^{-1}$ ];  $\mu_{MAX}=k_M Y$  è la massima velocità di crescita dei microrganismi, [ $tempo^{-1}$ ]; S, concentrazione del substrato a contatto con i microrganismi, [massa/volume];  $K_s$  è il coefficiente di semisaturazione, corrispondente alla concentrazione di substrato S alla quale la velocità di utilizzo del substrato per unità di massa di microrganismi è pari alla metà della velocità massima, [massa/volume];  $k_d$  è il coefficiente di decadimento dei microrganismi, [ $tempo^{-1}$ ].

Il reinocolo di un microrganismo in un nuovo sistema è una pratica comune per favorire l'adattamento a un ambiente diverso e ottimizzare il rendimento biologico.

In questo contesto, il trasferimento di microrganismi da un bioreattore o da un ambiente naturale a un altro può essere finalizzato all'aumento dell'efficienza metabolica o alla colonizzazione di un ambiente specifico. Il processo di reinocolo prevede che il microrganismo venga prima acclimatato al nuovo substrato e alle condizioni ambientali attraverso una fase di preadattamento. Questa fase può richiedere modifiche graduali della temperatura, del pH, della concentrazione di ossigeno e della disponibilità di nutrienti, al fine di consentire al microrganismo di regolare i suoi processi metabolici interni senza subire stress fisiologico. Durante il reinocolo, è fondamentale garantire che la popolazione microbica venga introdotta in una fase attiva di crescita, in quanto ciò aumenta la probabilità di adattamento rapido e riduce il tempo di latenza.

## 6. RISULTATI

### *Inoculo*

Per le campagne sperimentali studiate, è stato utilizzato l'inoculo proveniente da uno stabilimento agricolo e di allevamento piemontese avente le seguenti caratteristiche riportate in *tabella 6.1*:

<b>Inoculo</b>	<b>Percentuali</b>	
SOLIDI TOTALI (TS)	4.3 ± 0.058	%
SOLIDI VOLATILI (VS)	3.15 ± 0.012	%
VS/TS	73.2 ± 0.21	%

*Tabella 6.1 percentuali TS e VS inoculo*

L'inoculo utilizzato inoltre possiede le seguenti percentuali riportate di elementi in *tabella 6.2*, misurati tramite analisi elementare al CHNSO:

	<b>N [%]</b>	<b>C [%]</b>	<b>H [%]</b>	<b>S [%]</b>	<b>O [%]</b>	<b>C/N</b>
<b>Inoculo</b>	3.01± 0.106	34.58 ±1.138	4.41 ±0.011	0.33± 0.026	55.68 ±1.28	11.52 ±0.085

*Tabella 6.2 Composizione elementare dell'inoculo*

Una volta che le condizioni ottimali sono ristabilite, solo le specie sporigene riescono a degradare il substrato e ciò consente di aumentare la selettività del processo verso la produzione in prima fase di idrogeno.

Il pretrattamento più utilizzato in letteratura scientifica è principalmente quello termico in cui si porta il sistema ad una temperatura tra 60-100°C per 45-120 minuti (Chong *et al*, 2009).

### 6.2.1. Prima Campagna sperimentale

La prima campagna sperimentale è finalizzata allo studio preliminare della digestione anaerobica a doppio stadio (DF e AD), rappresentando un approccio iniziale volto a indagare il processo nel suo complesso, al fine di ottimizzarne le prestazioni nelle successive fasi di sperimentazione. Durante il periodo di incubazione, il biogas prodotto è stato generato nelle percentuali riportate in *Tabella 6.1 Figura, 6.1.6.2*:

Composizione biogas		DF	DA
H <sub>2</sub>	%	22.3± 3.5	0
CH <sub>4</sub>	%	0	58.1±7.4
CO <sub>2</sub>	%	27.6±4.1	41.3± 6.2

Tabella 6.1 Composizione biogas DF e AD

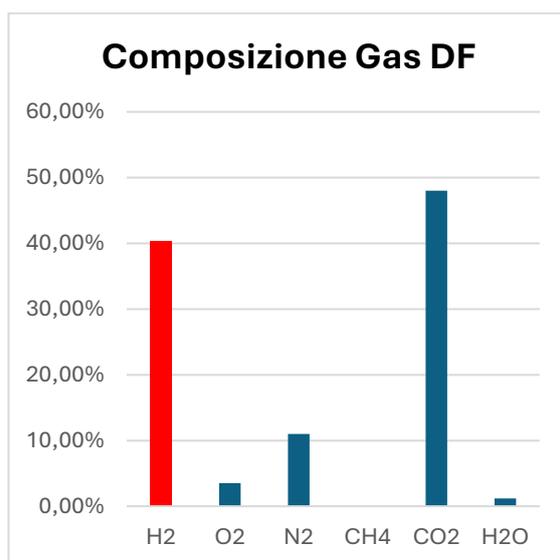


Figura 6.1 composizione gas DF

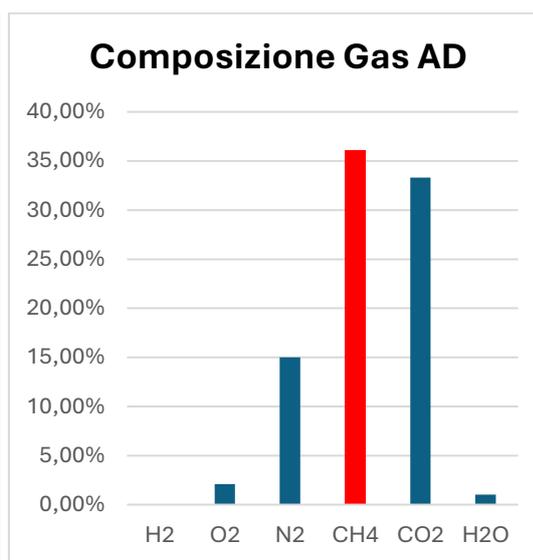


Figura 6.2 composizione gas AD

Dalla *figura 6.3*, si può osservare la produzione cumulata di idrogeno espressa in volume su solidi volatili (ml/gVS). Si nota un periodo iniziale di latenza di circa 24 ore, seguito da un aumento significativo della produzione di biogas, che raggiunge un picco intorno a 48.2 ml/gVS.

Questo rapido incremento nei primi cinque giorni è indicativo di un'intensa attività microbiologica e del consumo rapido del substrato disponibile.

Come si può osservare, per tutti e tre i substrati utilizzati, la quantità di bioidrogeno prodotto si attesta all'interno di un intervallo compreso tra  $40 \pm 8$  ml/gVS.

Questo risultato indica che i substrati analizzati mostrano un comportamento analogo in termini di efficienza nella produzione di idrogeno, suggerendo che essi sono tutti ugualmente favorevoli ai processi fermentativi. Tale omogeneità nella resa del bioidrogeno riflette una similitudine nelle caratteristiche chimiche e biochimiche dei substrati, favorendo lo sviluppo di condizioni ottimali per la DF.

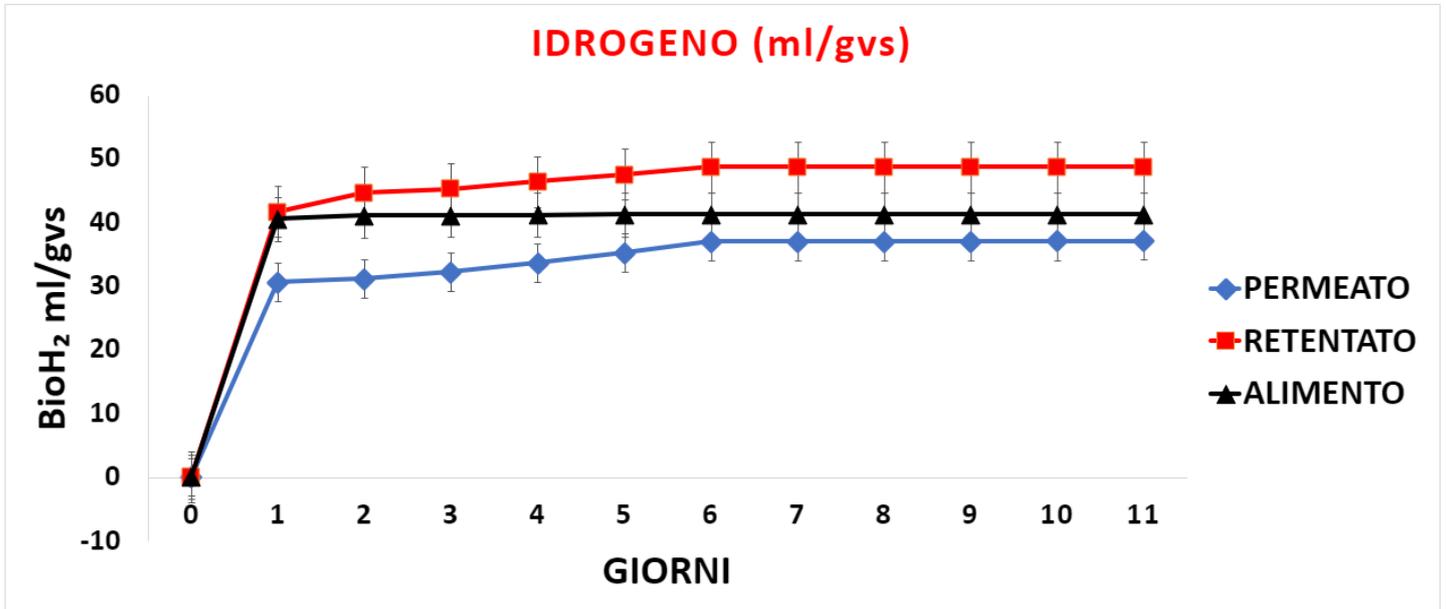


Figura 6.3-Produzione cumulata di bioidrogeno nella prima campagna sperimentale in DF

La fase di picco è poi seguita da un rallentamento, che può essere attribuito all'esaurimento del substrato disponibile, ma anche a cambiamenti fisiologici nel sistema, come la progressiva riduzione della popolazione batterica attiva e della variazione del pH fisiologico a seguito della produzione di acidi grassi *Figura 6.4*:

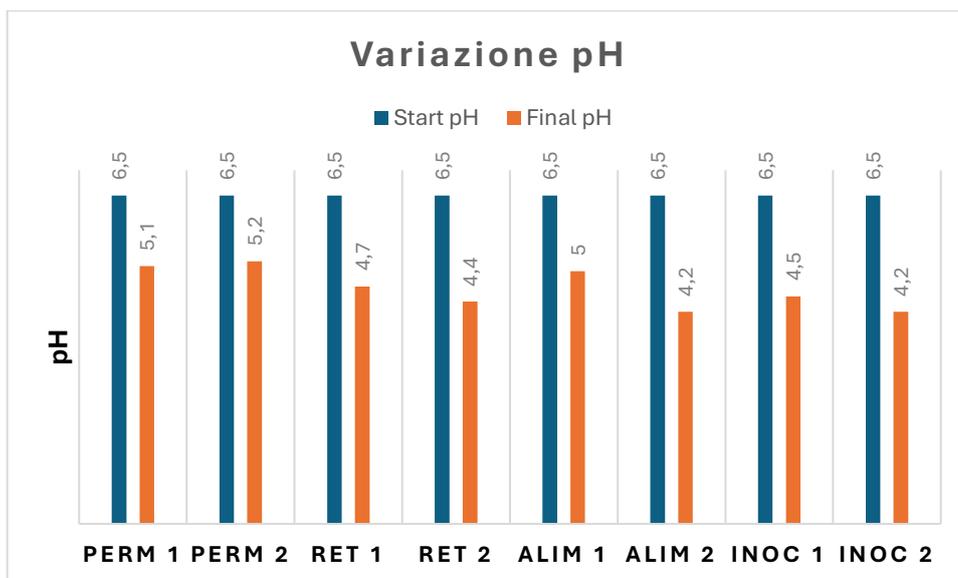
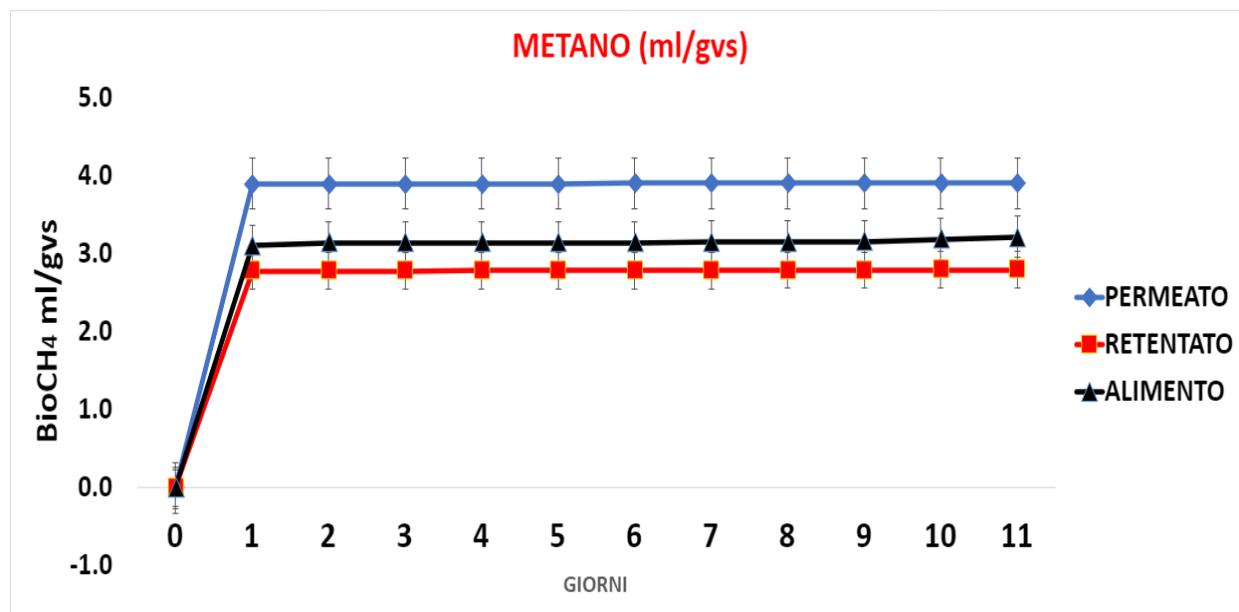


Figura 6.4- Variazione pH prima campagna sperimentale

Allo stesso modo è stata analizzata la produzione giornaliera di metano *Figura 6.5*, che risulta trascurabile durante tutto il periodo sperimentale arrivando ad un valore massimo di 4,7 ml/gVS. Ciò conferma che le condizioni create nel sistema, sono inospitali per i batteri metanogeni, a causa del pretrattamento termico dell'inoculo, che ha impedito la crescita di questa popolazione microbica al fine di ottenere l'idrogeno come prodotto principale nella DF.



*Figura 6.5-Produzione cumulata di metano nella prima campagna sperimentale in DF*

Infine, nella *figura 6.6* si osserva l'andamento della produzione di anidride carbonica, la cui curva segue un pattern simile a quella dell'idrogeno, con una fase di crescita iniziale seguita da un assestamento. Questo indica che la CO<sub>2</sub> viene prodotta durante la fase di fermentazione, parallela alla produzione di idrogeno, confermando il buon funzionamento della fase acidogenica del processo arrivando ad un valore cumulato di 137 ml/gVS.

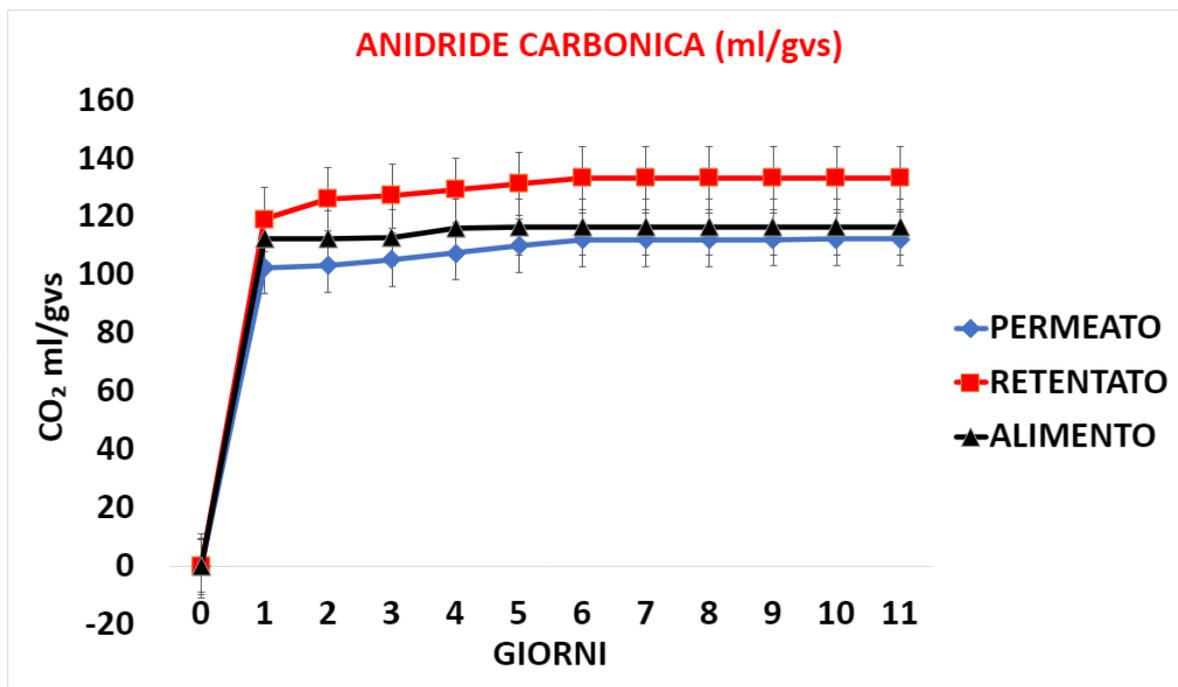


Figura 6.6 - Produzione cumulata di anidride carbonica nella prima campagna sperimentale in DF

Nella figura 6.7 viene riportata la quantità complessiva di biogas prodotto durante la DF. Il grafico funge da strumento di sintesi per valutare l'efficienza del processo arrivando ad una produzione cumulata di biogas ad un valore di  $164 \pm 12$  ml/gVS, permettendo di riassumere i risultati finali ottenuti in questo primo stadio fermentativo.

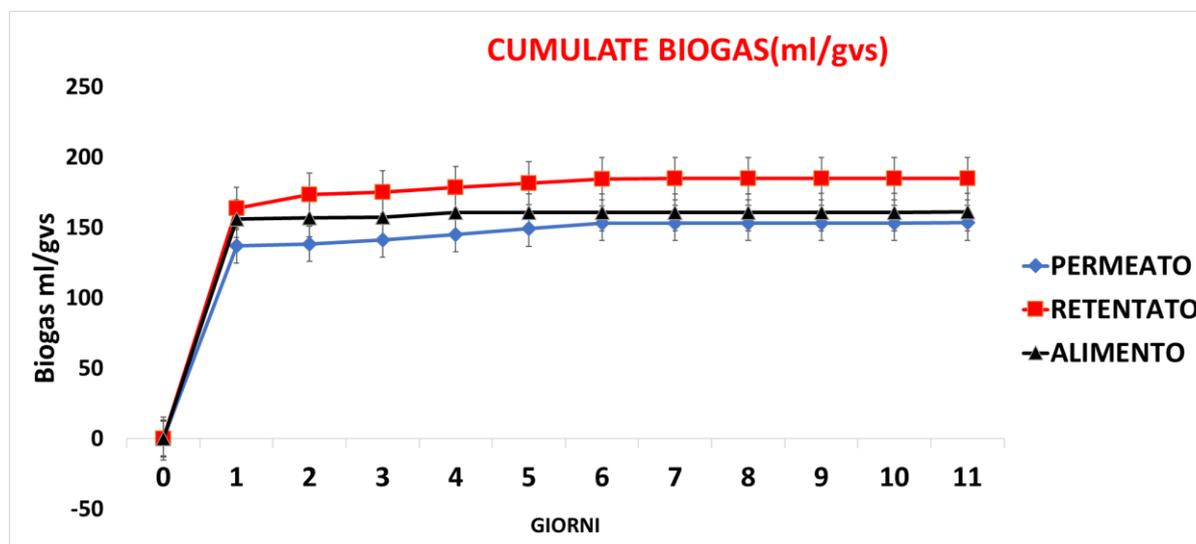
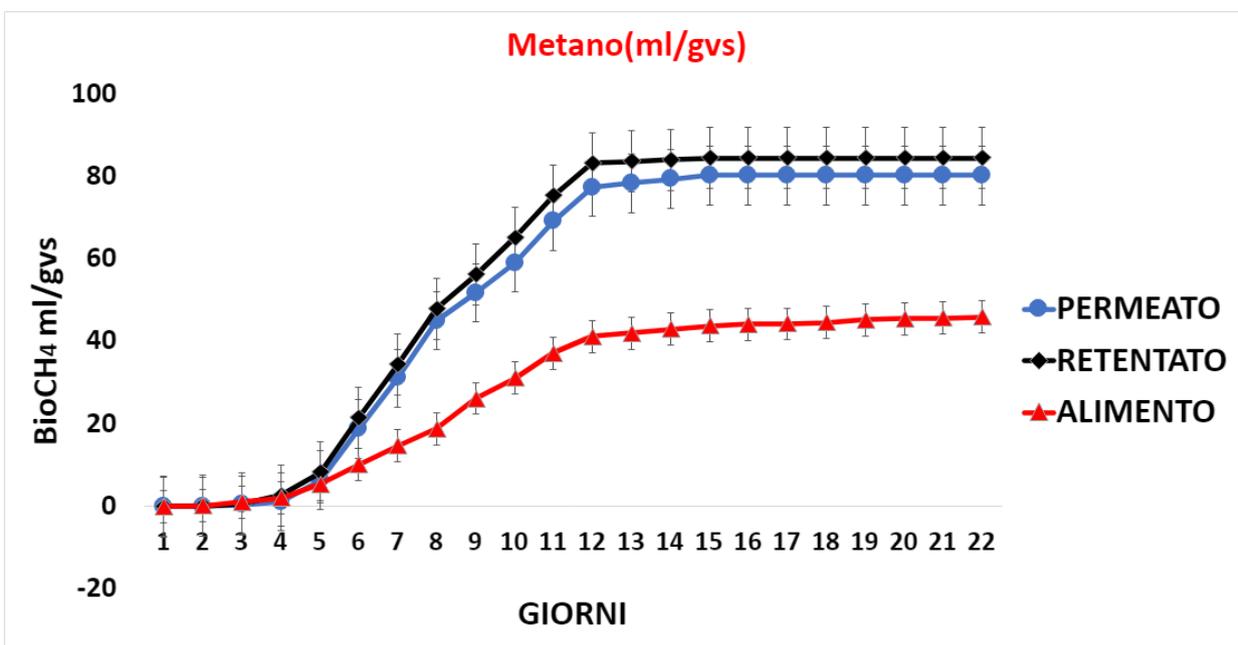


Figura 6.7 - Produzione cumulata di biogas nella prima campagna sperimentale in DF

### ***Secondo stadio di fermentazione anaerobica: produzione di metano***

Successivamente, l'attenzione è stata spostata sull'analisi delle produzioni cumulative di metano durante il secondo stadio della fermentazione anaerobica. In questa fase, la produzione di idrogeno è completamente assente, poiché il sistema è entrato nella fase metanogenica. La *figura 6.5* mostra una produzione massima di metano di 83 ml/gVS nel caso specifico del retentato, accompagnata da una consistente produzione di anidride carbonica *figura 6.8*. La produzione di metano nella configurazione contenente alimento è risultata significativamente inferiore (39 ml/gVS) rispetto a quella delle altre configurazioni sperimentali. Tale riduzione potrebbe essere attribuita a una variazione del pH, potenzialmente sfavorevole per l'attività microbica metanogenica, o all'esaurimento del substrato organico disponibile, il che avrebbe limitato la crescita e l'attività dei microorganismi coinvolti nel processo di digestione anaerobica. Questo andamento è stato ottenuto attraverso il monitoraggio per un periodo di oltre 22 giorni, poiché il secondo stadio del processo, dominato dalla metanogenesi, è significativamente più lento rispetto alla fase precedente di idrolisi e acidogenesi. Difatti, il tempo idraulico di ritenzione più lungo richiesto è dovuto alla lentezza del metabolismo dei batteri metanogeni, che trasformano gli acidi grassi volatili prodotti nella fase iniziale in metano e CO<sub>2</sub>.



*Figura 6.8- Produzione cumulata di metano nella prima campagna sperimentale in AD*

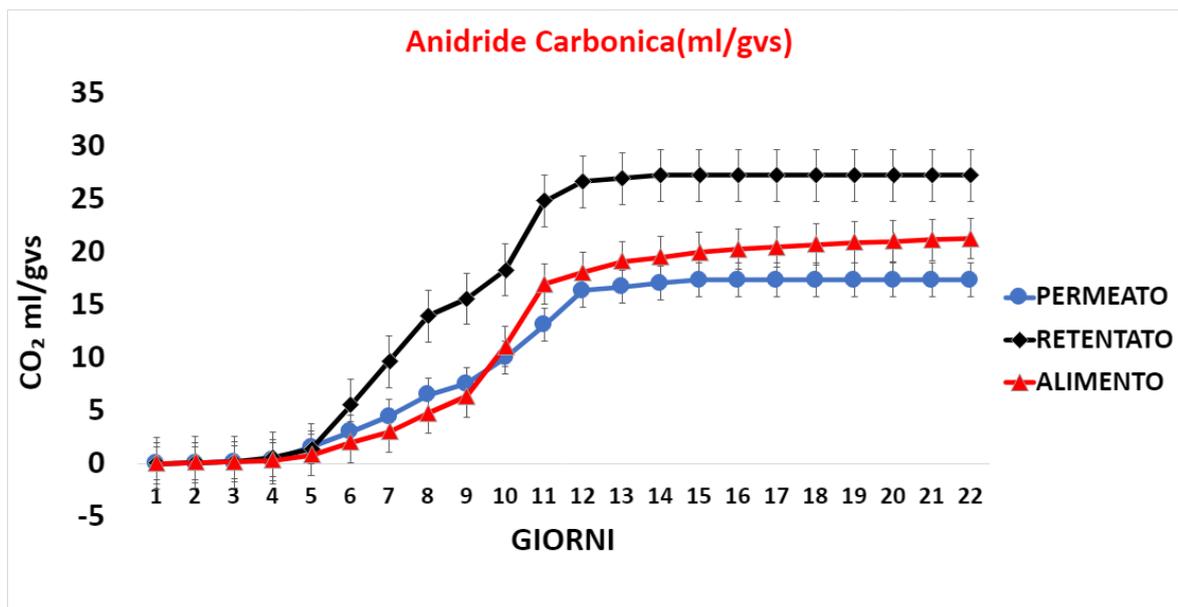


Figura 6.9- Produzione cumulata di anidride carbonica nella prima campagna sperimentale in AD

Nella figura 6.10 viene riportata la quantità complessiva di biogas prodotto durante la AD. Il grafico funge da strumento di sintesi per valutare l'efficienza del processo arrivando ad una produzione cumulata di biogas ad un valore di  $84 \pm 33$  ml/gVS, permettendo di riassumere i risultati finali ottenuti in questo secondo stadio fermentativo.

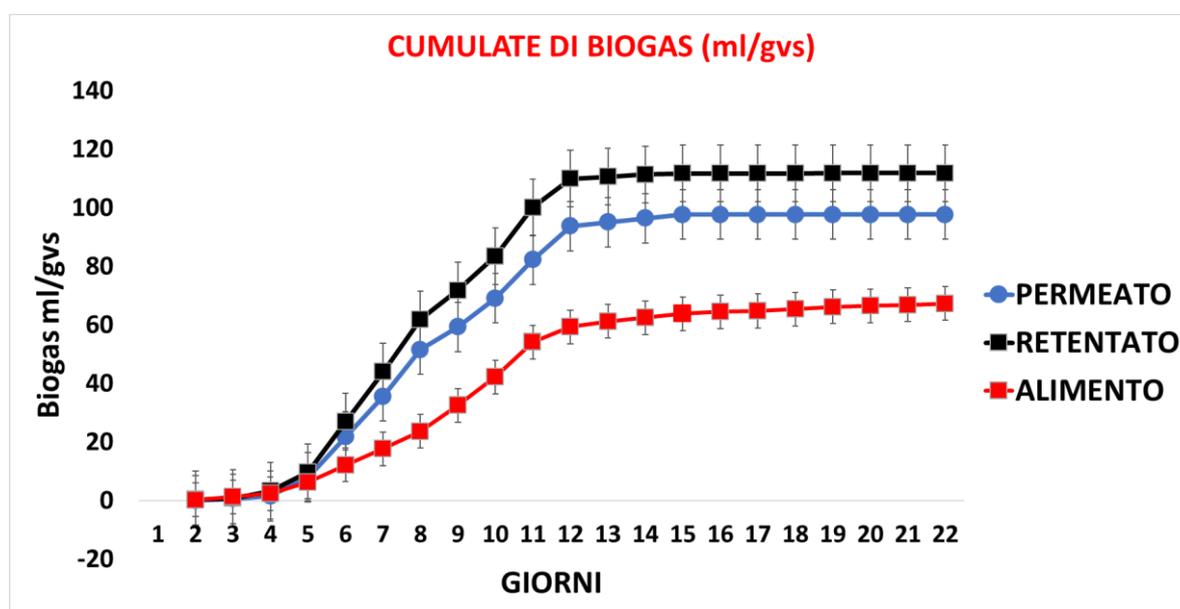


Figura 6.10- Produzione cumulata di biogas nella prima campagna sperimentale in AD

In base alle analisi effettuate sulla variazione del pH durante il processo e sull'andamento delle curve di produzione cumulativa, è possibile concludere quanto segue: l'inoculo utilizzato ha dimostrato la capacità di degradare zuccheri costituenti il substrato Sedamyl, come il

saccarosio, glucosio e fruttosio, evidenziando un'efficace attività metabolica; il pretrattamento termico applicato ha mostrato una buona efficacia nell'inibire i microrganismi metanigeni, confermando la sua utilità nel selezionare consorzi microbici non metanogenici; infine, tutte le configurazioni sperimentali hanno comunque raggiunto il plateau produttivo.

In *Tabella 6.5* sono elencati i valori dei solidi totali e dei solidi volatili dei digestati di ogni configurazione adottata nella prima campagna sperimentale.

	<b>Permeato</b>	<b>Retentato</b>	<b>Alimento</b>
<b>Solidi totali (ST%)</b>	4.53 ± 0.41	3.84 ± 0.39	3.71 ± 0.45
<b>Solidi volatili su solidi totali (SV/ST %)</b>	73.09 ± 3.21	72.66 ± 1.76	68.38 ± 2.78

*Tabella 6.5 – Solidi totali e solidi volatili su solidi totali dei digestati della prima campagna sperimentale*

In *Tabella 6.6*, invece sono forniti i valori della composizione elementare dei digestati di ogni configurazione impiegata nella prima campagna sperimentale.

	<b>N [%]</b>	<b>C [%]</b>	<b>H [%]</b>	<b>S [%]</b>	<b>O [%]</b>	<b>C/N</b>
<b>Inoculo</b>	3.01± 0.11	34.58 ±1.13	4.41 ±0.01	0.33± 0.02	55.68 ±1.28	11.52 ±0.08
<b>Permeato</b>	2,62± 0.14	32,6 ±1.34	4,38± 0.008	0,361±0.021	57.24± 1.17	12.44± 0.73
<b>Retentato</b>	2,9± 0.22	35,8± 1.07	4,86± 0.06	0,362± 0.14	54.11± 1.26	12.35± 0.64
<b>Alimento</b>	2,54± 0.42	29,17± 1.1	3,72± 0.10	0,339± 0.03	62.31± 1.38	11.49± 0.71

*Tabella 6.9 – Analisi elementare dei digestati della prima campagna sperimentale*

Basandosi sulla letteratura scientifica, uno studio (Liu *et al.*, 2021) ha approfondito l'efficacia della digestione anaerobica a doppio stadio con substrato alimentare, focalizzandosi su una configurazione ibrida composta da una prima fase acidogenica e una seconda fase metanogenica, volta a massimizzare la produzione di biogas e la degradazione del substrato organico. L'esperimento è stato eseguito in condizioni mesofile ( $37 \pm 0.5$  °C), con un tempo di ritenzione idraulica (HRT) di 5 giorni per il primo stadio e 20 giorni per il secondo stadio.

Il substrato era costituito da una miscela di scarti alimentari domestici (80%) e fanghi attivi biologici (20%), con un contenuto organico rappresentato prevalentemente da residui di cereali (45%), verdure (35%) e frutta (20%). Nella fase acidogenica si è registrata una notevole produzione di acidi grassi volatili (VFA), in particolare acido acetico (45% del totale VFA), acido butirrico (30%) e acido propionico (15%), con una produzione di biogas di  $215 \pm 15$  ml/gSV, composto per il 60% da idrogeno.

La fase metanogenica ha visto la conversione dei VFA prodotti nella prima fase in metano, attraverso l'attività dei microrganismi metanogeni acetoclastici e idrogenotrofi, con una produzione complessiva di  $320 \pm 20$  ml  $\text{CH}_4/\text{gSV}$ . Lo studio ha evidenziato una maggiore efficienza di degradazione del substrato nel sistema a doppio stadio, con una riduzione del 35% della domanda chimica di ossigeno (COD) rispetto ai sistemi a stadio singolo, e un incremento del 18% nella produzione di biogas complessivo.

Un altro studio (Zhang *et al.*, 2022) ha approfondito l'efficacia della digestione anaerobica a doppio stadio con substrato alimentare, focalizzandosi in particolare sull'ottimizzazione delle condizioni operative e sulla separazione delle fasi acidogenica e metanogenica per migliorare la produzione complessiva di biogas. L'esperimento è stato eseguito utilizzando una miscela di scarti di vegetali e fanghi attivi come substrato, mantenendo il processo in condizioni mesofile stabili ( $35 \pm 1$  °C) e pH controllato, neutro ( $7.0 \pm 0.2$ ), con tempi di ritenzione idraulica (HRT) differenziati per i due stadi: 10 giorni per il primo stadio (acidogenesi) e 15 giorni per il secondo stadio (metanogenesi).

Il substrato principale utilizzato era costituito per il 70% da scarti alimentari (composti principalmente da residui di verdure, frutta e avanzi di cibo organico) e per il 30% da fanghi attivi provenienti da impianti di trattamento delle acque reflue. L'inoculo per il primo stadio di acidogenesi è stato prelevato da un impianto di trattamento di rifiuti organici, mentre l'inoculo per il secondo stadio di metanogenesi derivava da un digestore anaerobico già in funzione, specializzato nella fase metanogenica.

Durante il primo stadio, sono stati prodotti in prevalenza acidi grassi volatili (VFA), tra cui acido acetico, acido propionico e acido butirrico, con una concentrazione massima di VFA pari a 7.2 g/l. La produzione di biogas nel primo stadio è stata pari a 150 ml/gSV, con una composizione di gas che includeva il 55% di idrogeno ( $\text{H}_2$ ), il 30% di anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ) e tracce di altri gas.

Nel secondo stadio, la fase metanogenica ha processato i VFA accumulati, convertendoli in metano ( $\text{CH}_4$ ) e anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ). La produzione di metano nel secondo stadio è stata pari a 200 ml  $\text{CH}_4/\text{gSV}$ , con una purezza del metano nel biogas finale pari al 65%. Complessivamente, la resa totale di biogas (somma di idrogeno e metano) ottenuta attraverso il sistema a doppio stadio è stata superiore del 15% rispetto a un sistema a stadio singolo, evidenziando l'efficienza superiore del processo a due stadi nel migliorare la conversione del substrato e la separazione delle fasi microbiche.

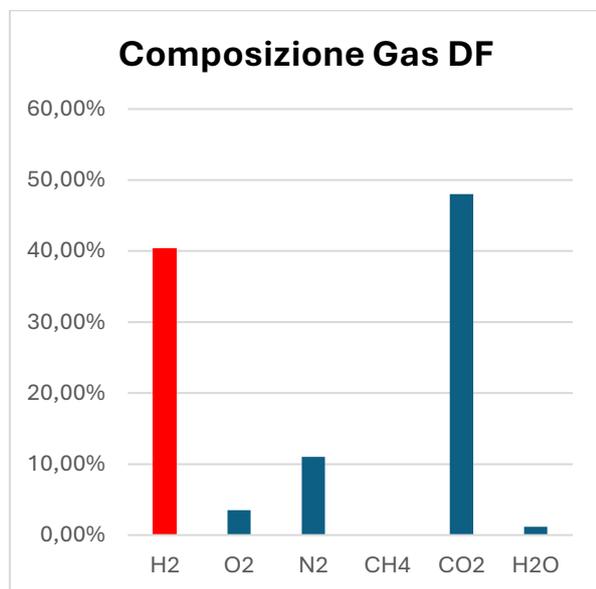
## 6.2.2. Seconda Campagna sperimentale

La seconda campagna sperimentale, simile alla prima, si concentra sullo studio del processo di fermentazione anaerobica a doppio stadio, introducendo implementazioni e ottimizzazioni dei parametri operativi. A differenza del caso studio precedente qui si è condotta una fermentazione a doppio stadio con una percentuale diversa di TS alimentati (al 3% vol. e al 6%), per studiare meglio l'andamento della produzione tenendo conto anche dell'influenza del rapporto C/N come riportato in *tabella 6.11*.

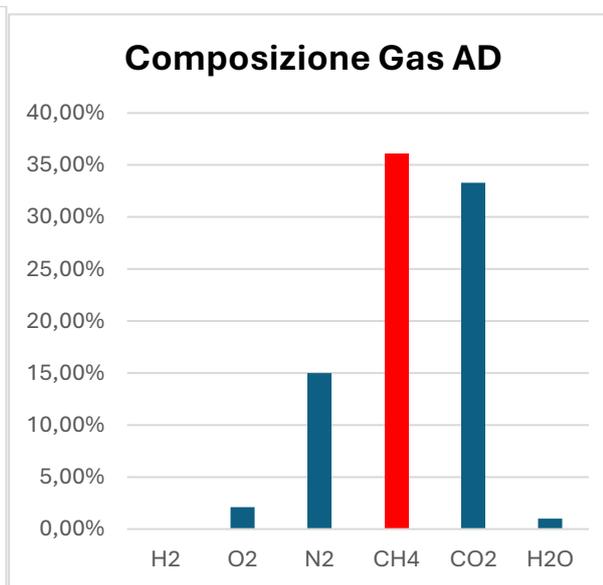
Durante il periodo di incubazione, il biogas prodotto è stato generato nelle percentuali riportate in *Tabella 6.7, Figura 6.11, 6.12*:

Composizione biogas		DF	DA
<b>H<sub>2</sub></b>	%	39.8±5.3	0
<b>CH<sub>4</sub></b>	%	0	36.1±4.2
<b>CO<sub>2</sub></b>	%	48.6±6.7	34.3 ±5.1

*Tabella 6.7 Composizione biogas DF e AD*



*Figura 6.11 Composizione biogas DF*



*Figura 6.12 Composizione biogas AD*

Nella fase DF, sono state nuovamente determinate le produzioni cumulative di bioidrogeno e anidride carbonica in relazione alla suddivisione dei solidi totali alimentati a concentrazioni del 3% e del 6%, come illustrato in *Figura 6.13*.

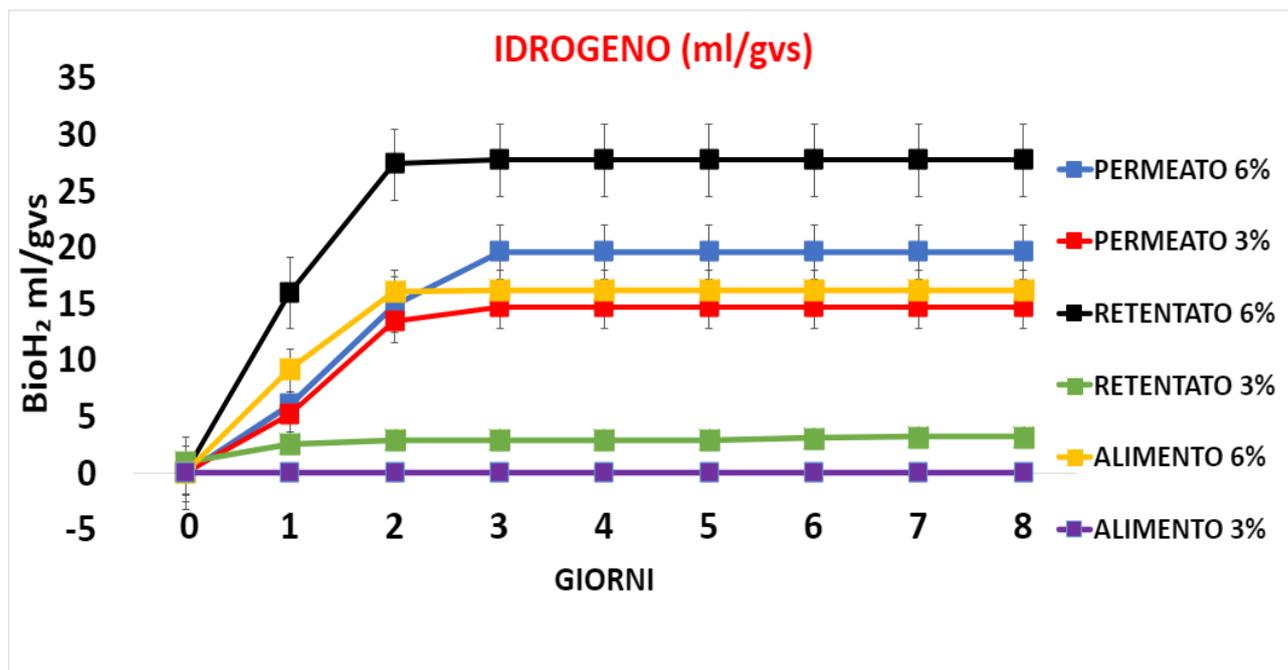


Figura 6.13- Produzione cumulata di bioidrogeno nella seconda campagna sperimentale in DF

I valori cumulativi di produzione di idrogeno ottenuti sono distribuiti in un intervallo di  $17 \pm 22$  mL/gVS. Tale variabilità è attribuibile principalmente alla differente composizione dei componenti presenti nel substrato. In particolare, per il campione alimentato al 3% di solidi totali (TS), non si è verificato l'avvio del processo di digestione.

I risultati ottenuti evidenziano l'influenza della concentrazione di solidi sul rendimento dei gas prodotti, permettendo di analizzare le dinamiche fermentative e le correlazioni tra il carico organico iniziale e la produzione di bioidrogeno, nonché anche la produzione concomitante di CO<sub>2</sub> (figura 6.14), contribuendo a una migliore comprensione dei processi di conversione energetica e delle condizioni ottimali per massimizzare l'efficienza del sistema.

In figura 6.14 invece si riportano le produzioni di anidride carbonica con un picco di 98 ml\gVS nella configurazione contenente retentato al 6%.

In aggiunta in figura 6.15 è presente la produzione cumulata del biogas.

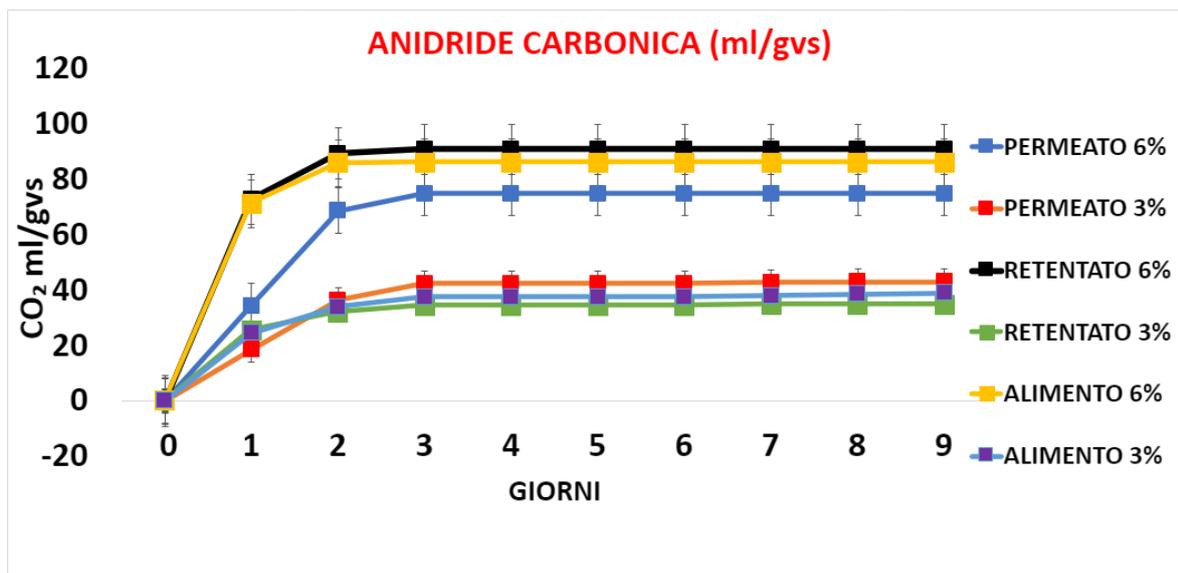


Figura 6.14- Produzione cumulata di anidride carbonica nella seconda campagna sperimentale in DF

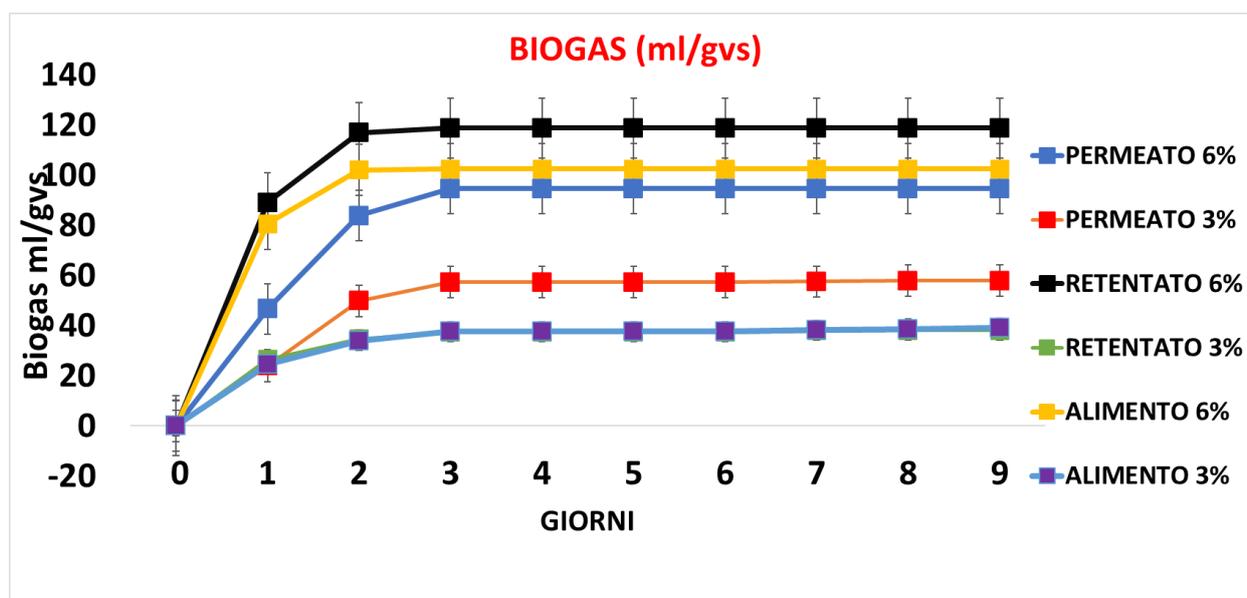


Figura 6.15 - Produzione cumulata di biogas nella seconda campagna sperimentale in DF

### ***Secondo stadio di fermentazione anaerobica: produzione di Metano***

Anche in questa seconda campagna sperimentale, il processo di DF è stato seguito da una successiva fase di digestione anaerobica (AD), con l'obiettivo di aumentare l'efficienza energetica complessiva del sistema. L'integrazione delle due fasi ha ottimizzato il recupero di biogas, incrementando la produzione di metano come rappresentato in figura 6.16:

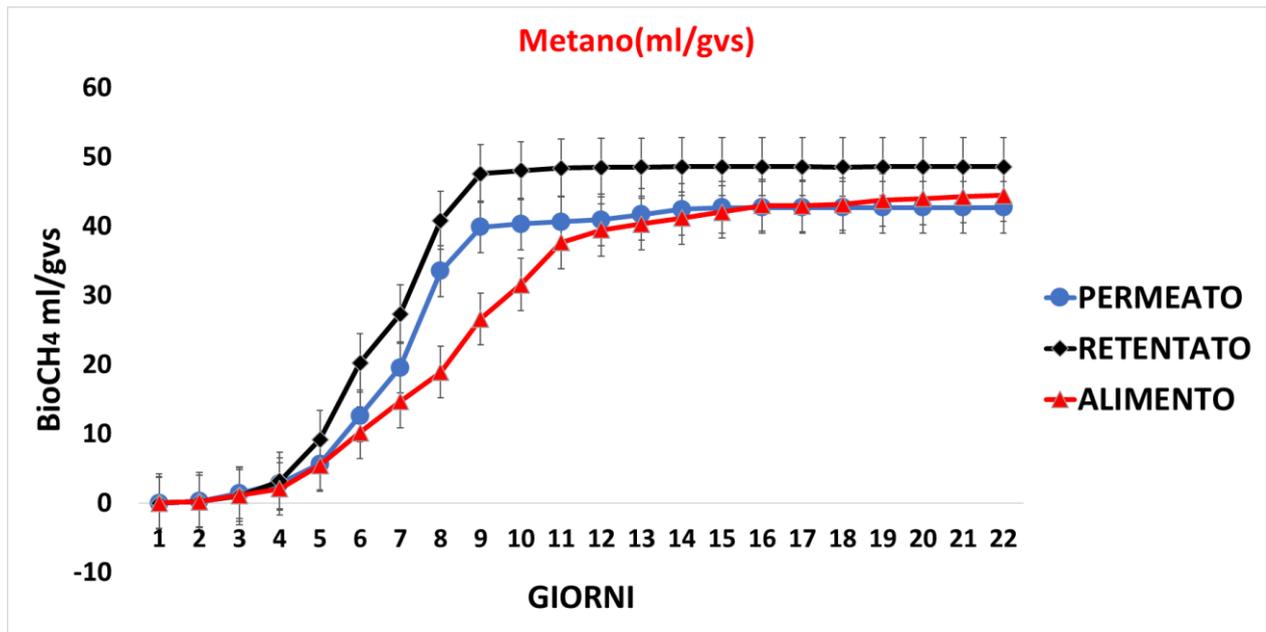


Figura 6.16- Produzione cumulata di metano nella seconda campagna sperimentale in DF

Al tempo stesso, vi è stata una produzione di anidride carbonica al 30% in vol. del biogas totale, raggiungendo un massimo valore pari a 24.2 ml/gVS nel caso del retentato (figura 6.17).

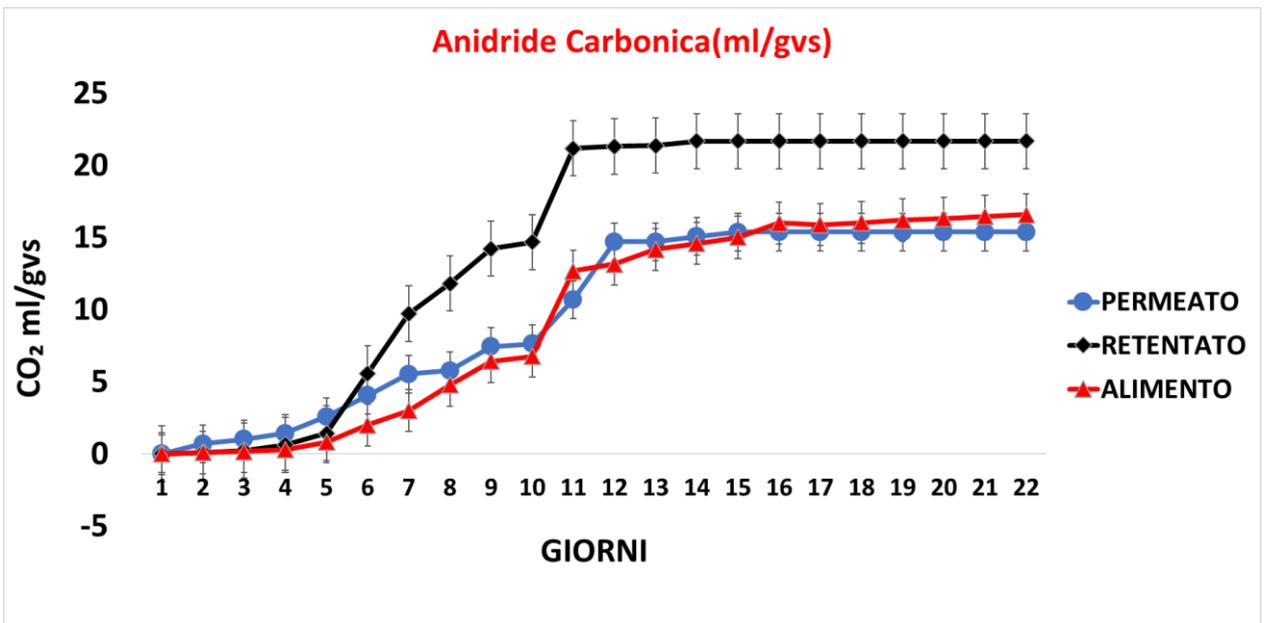


Figura 6.17- Produzione cumulata di anidride carbonica nella seconda campagna sperimentale in AD

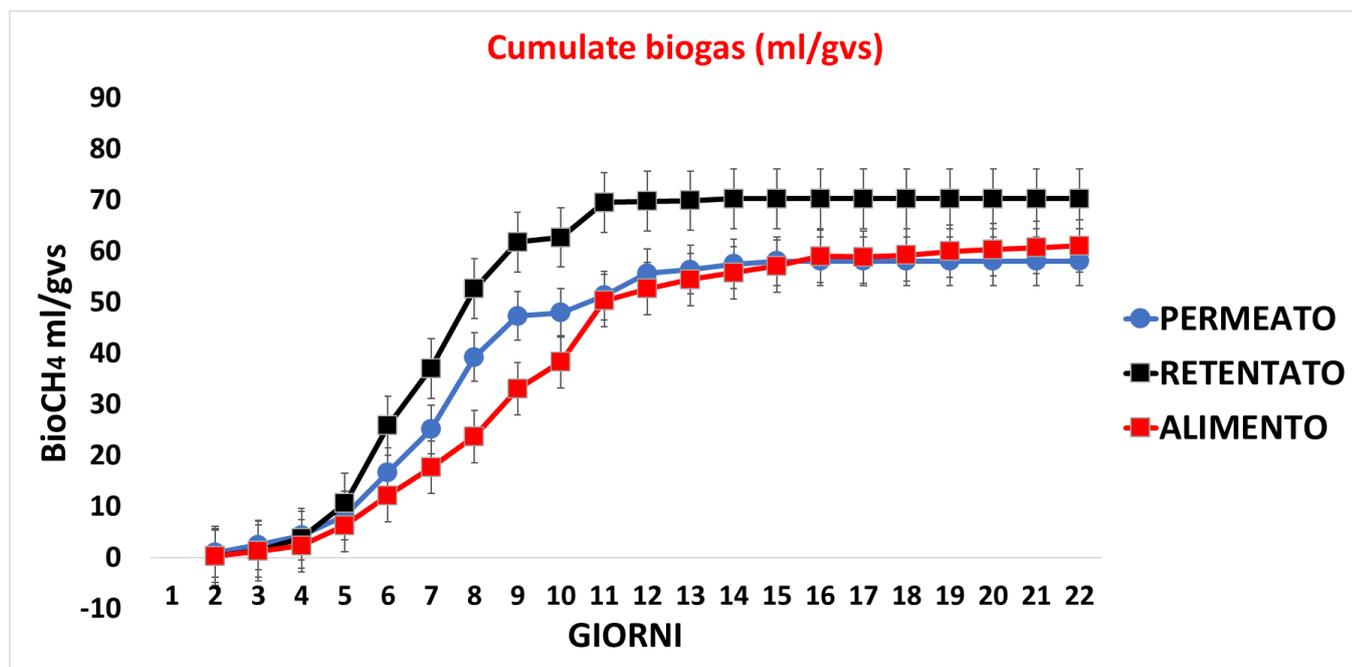


Figura 6.18 - Produzione cumulata di biogas nella seconda campagna sperimentale in AD

In Tabella 6.10 sono elencati i valori dei solidi totali e dei solidi volatili dei digestati di ogni configurazione adottata nella seconda campagna sperimentale.

	Permeato	Retentato	Alimento
<b>Solidi totali (ST%)</b>	3.84 ± 0.71	4.31 ± 0.59	3.42 ± 0.85
<b>Solidi volatili su solidi totali (SV/ST %)</b>	72.42 ± 3.71	74.26 ± 1.96	67.28 ± 2.11

Tabella 6.10 – Solidi totali e solidi volatili su solidi totali dei digestati della seconda campagna sperimentale

In Tabella 6.11, invece sono forniti i valori della composizione elementare dei digestati di ogni configurazione impiegata nella seconda campagna sperimentale.

SUBSTRATO	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	C/N ratio
PERMEATO	0.35 ± 0.05	12.71 ± 1.23	7.89 ± 0.59	0.007 ± 0.002	34.31 ± 3.28
RETENTATO	0.36 ± 0.02	12.84 ± 1.42	8.56 ± 0.42	0.005 ± 0.001	36.77 ± 4.72
ALIMENTO	0.32 ± 0.08	12.76 ± 1.37	7.67 ± 0.65	0.01 ± 0.004	37.39 ± 2.41

Tabella 6.11 – Analisi elementare dei digestati della seconda campagna sperimentale

Allo stesso modo come riporta uno studio (Wang *et al.*,2021) si è approfondito l'effetto del rapporto carbonio/azoto (C/N) ottimale sulla digestione anaerobica di rifiuti organici misti. L'obiettivo principale era determinare come il rapporto C/N influenzasse la produzione di biogas e l'efficienza del processo di digestione.

Il substrato utilizzato è composto da una miscela di scarti alimentari e letame bovino, con variazioni controllate del rapporto C/N, che andavano da 15:1 a 35:1.

L'esperimento è stato condotto in condizioni mesofile (37 °C) con un tempo di ritenzione idraulica di 30 giorni.

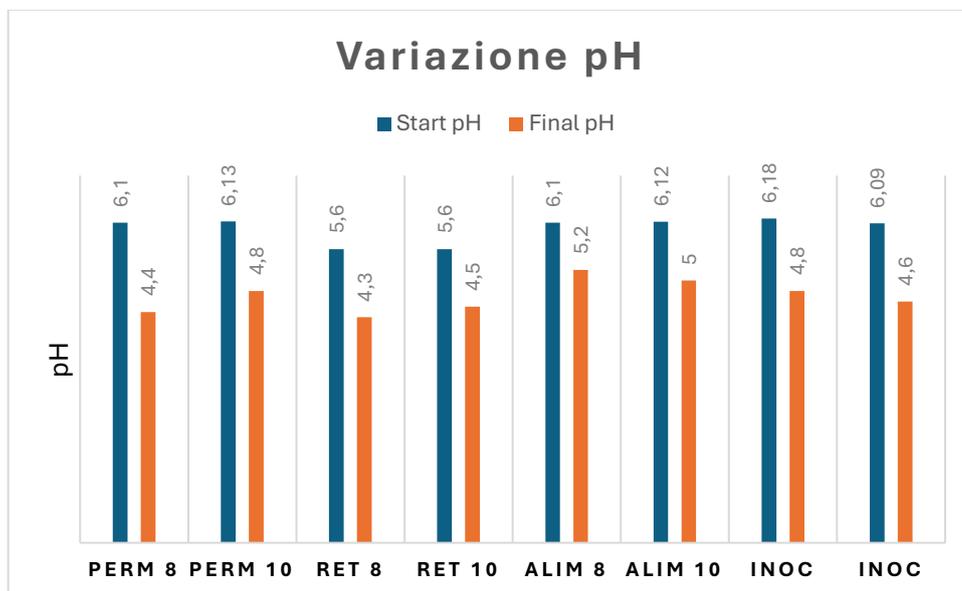
È stato osservato che un rapporto C/N troppo basso (15:1) comportava un eccesso di azoto, che ha portato ad un aumento della concentrazione di ammoniaca nel digestore, con conseguente inibizione dell'attività microbica e una ridotta produzione di biogas (circa 150 ml/gSV di biogas totale, con una percentuale di metano inferiore al 50%).

Al contrario, un rapporto C/N troppo elevato (35:1) ha provocato una limitazione di azoto disponibile, compromettendo la crescita e l'attività dei batteri metanogeni, con una produzione di biogas ancora inferiore (circa 120 ml/gSV).

Il rapporto ottimale di C/N per massimizzare la produzione di biogas è stato determinato essere pari a 25:1. A questo rapporto, la produzione di biogas ha raggiunto il valore massimo di 218 ml/gSV, con una composizione di biogas contenente il 65% di metano e il 35% di CO<sub>2</sub>. Lo studio conclude che il rapporto C/N gioca un ruolo chiave nella digestione anaerobica, influenzando non solo la stabilità del processo, ma anche la composizione del biogas prodotto. Il rapporto ottimale di 25:1 rappresenta un equilibrio tra il carbonio, necessario come fonte di energia per i microrganismi, e l'azoto, essenziale per la sintesi proteica. Risultati inferiori o superiori a questo valore comportano rispettivamente inibizione da ammoniaca o limitazione di nutrienti, riducendo così l'efficienza della digestione anaerobica e la produzione di metano.

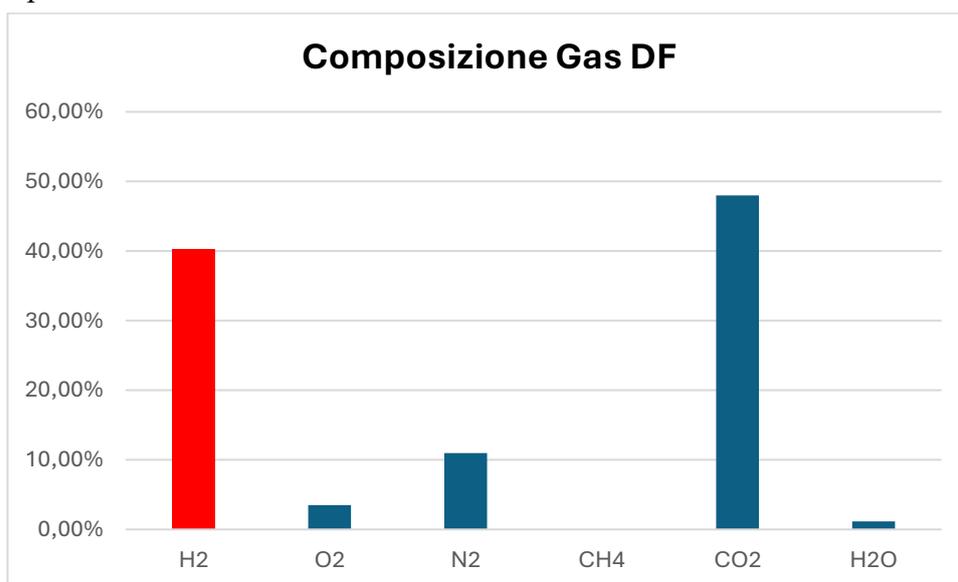
### 6.2.1. Terza Campagna sperimentale

La terza campagna sperimentale, invece, si focalizza sulla singola DF conducendo in modo parallelo un confronto con sistemi re-inoculati. In prima analisi si osserva la variazione di pH a seguito della produzione di acidi grassi nella DF come si può notare nel *Figura 6.19*:



*figura 6.19. Variazione pH nella terza campagna sperimentale in DF*

Durante il periodo di incubazione, il biogas prodotto è stato generato nelle percentuali riportate in *Tabella 6.20*:



*Tabella 6.20 Composizione biogas DF*

Nella figura 6.21 è possibile osservare la produzione cumulata di idrogeno, distinta in base alle configurazioni adottate rispettivamente con un carico di solidi totali pari all'8% e un inoculo del 10%. In particolare, al quinto giorno di fermentazione è stato prelevato inoculo già adattato al terreno di coltura dai reattori contenenti permeato con TS 8%, retentato al 10% e alimento al 10%, e successivamente reintrodotta in un secondo sistema ricco di substrato, al fine di ridurre la fase di latenza dovuta all'adattamento e promuovere una più rapida produzione di bioidrogeno. Tale strategia ha portato a un incremento di circa 20 ml/gVS della produzione di biogas, osservabile in corrispondenza del nono giorno di fermentazione. È stata quindi adottata una configurazione in modalità simil fed-batch permettendo un controllo ottimale della crescita microbica e della produzione di idrogeno che ha raggiunto valori nell'intervallo compreso tra  $22 \pm 16$  ml/gVS.

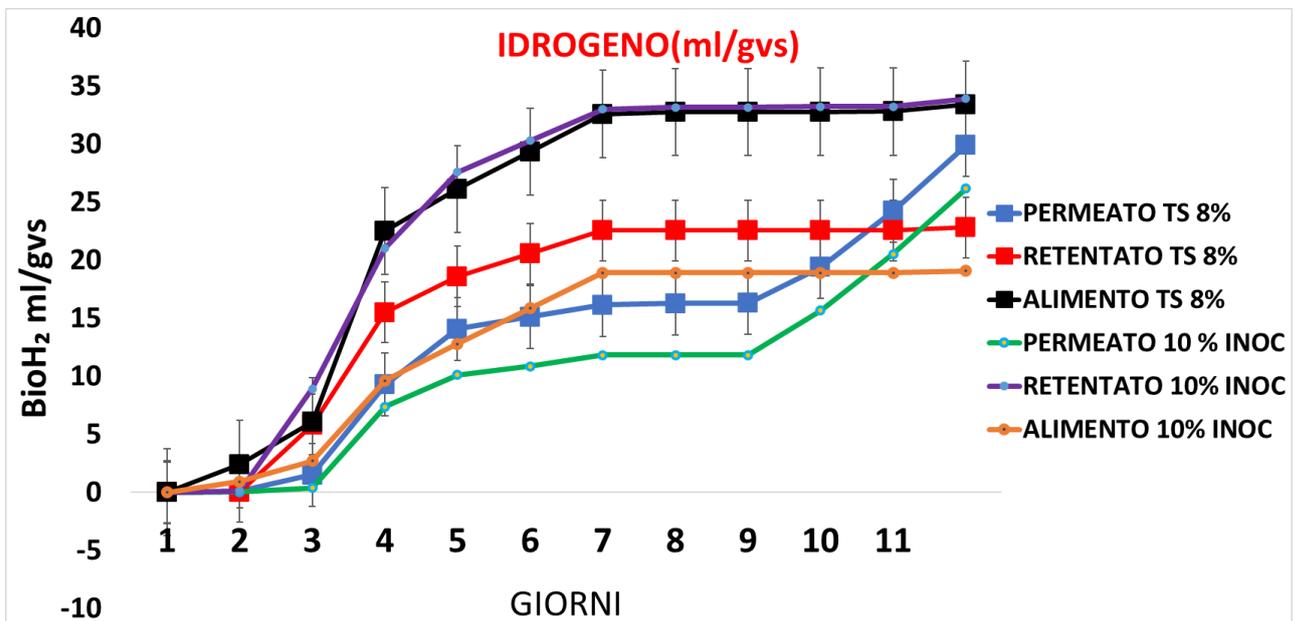


Figura 6.21 - Produzione cumulata di anidride carbonica nella terza campagna sperimentale in DF

Allo stesso modo si rappresenta l'andamento della produzione cumulata di anidride carbonica in figura 6.22 dove è possibile notare in modo analogo l'incremento dell'anidride carbonica prodotta in corrispondenza della reinoculazione.

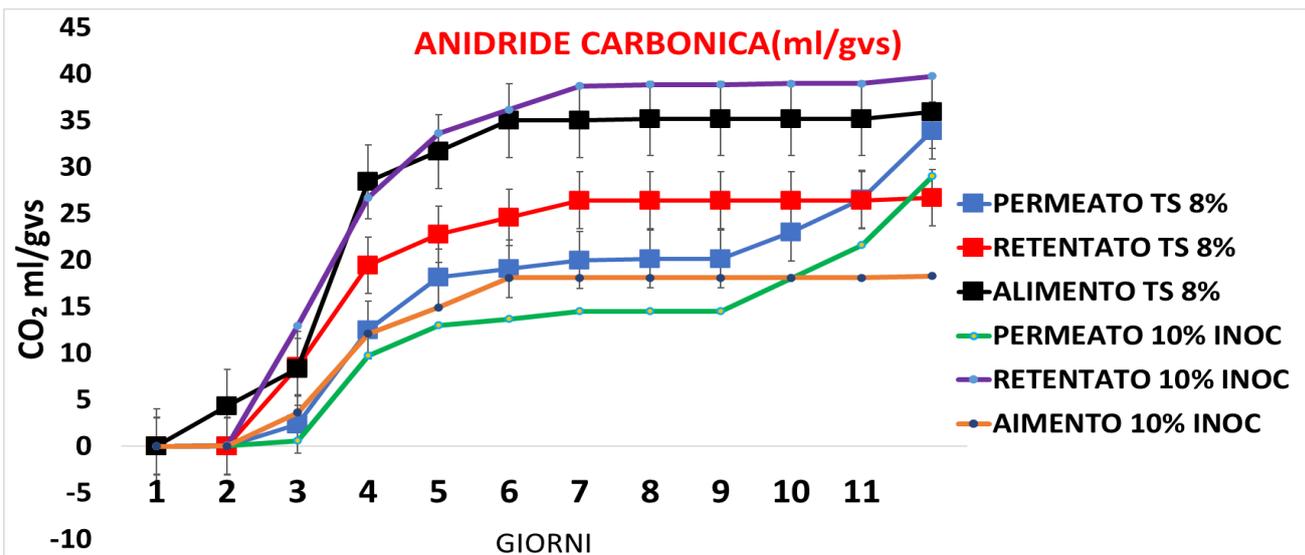


Figura 6.22 - Produzione cumulata di anidride carbonica nella terza campagna sperimentale in DF

Infine, si conclude con la rappresentazione del biogas prodotto in figura 6.23 con valori compresi tra  $54 \pm 18$  ml/gVS.

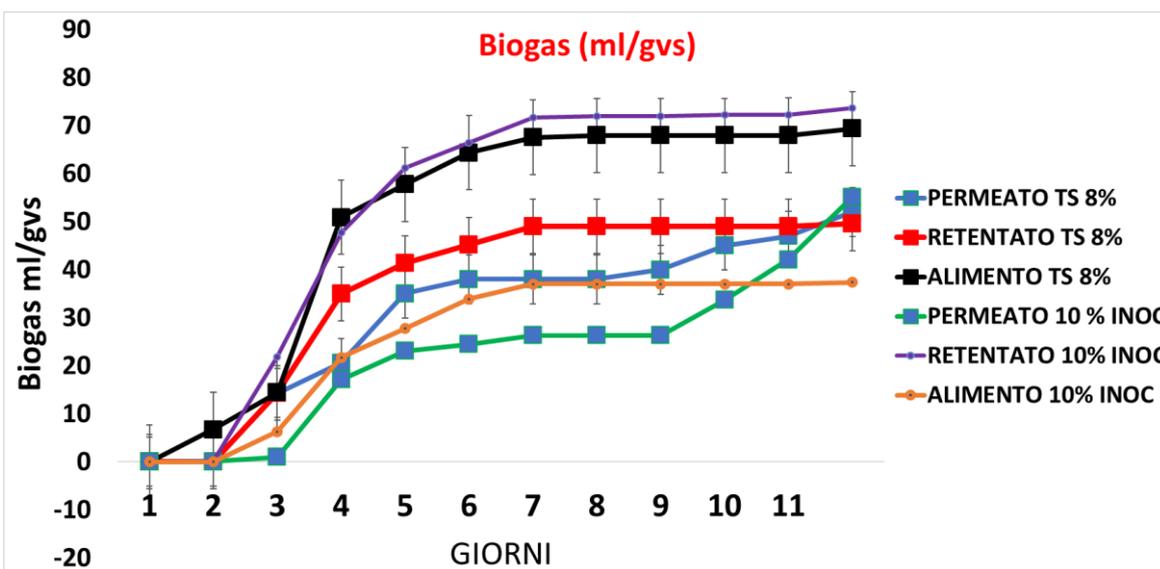


Figura 6.23 - Produzione cumulata di biogas nella terza campagna sperimentale in DF

In Tabella 6.12 sono elencati i valori dei solidi totali e dei solidi volatili dei digestati di ogni configurazione adottata nella prima campagna sperimentale.

	Permeato	Retentato	Alimento
<b>Solidi totali (ST%)</b>	$3.43 \pm 0.72$	$3.91 \pm 0.78$	$3.22 \pm 0.57$
<b>Solidi volatili su solidi totali (SV/ST %)</b>	$70.41 \pm 2.27$	$74.36 \pm 1.09$	$67.32 \pm 2.26$

Tabella 6.12 – Solidi totali e solidi volatili su solidi totali dei digestati della terza campagna sperimentale

In *Tabella 6.13*, invece sono forniti i valori della composizione elementare dei digestati di ogni configurazione impiegata nella prima campagna sperimentale.

	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
<b>Inoculo</b>	1.77± 0.18	31.27 ±1.76	4.7 ±0.84	0.28± 0.01	58.32 ±1.23	28.94 ±4.32
<b>Permeato</b>	1,53± 0.41	30,8 ±1.85	3,92± 0.046	0,33±0.02	56.11± 1.2	31.25± 3.11
<b>Retentato</b>	3.1± 1.13	34,2± 1.82	4,21 ± 0.07	0,38± 0.13	52.78± 1.72	30.74± 3.76
<b>Alimento</b>	2,11± 0.72	27,24± 1.94	3,25± 0.18	0,32± 0.02	63.24± 1.47	34.24± 3.72

*Tabella 6.13 – Analisi elementare dei digestati della terza campagna sperimentale*

Tali sistemi reinoculati trovano analogie con uno studio (Li *et al.*,2020) che ha esaminato il processo di DF per la produzione di idrogeno utilizzando substrati alimentari, con particolare attenzione a un sistema reinoculato in modalità fed-batch.

Il substrato alimentare utilizzato è composto da scarti di alimentari, principalmente costituiti da verdure e riso, con un rapporto di solidi volatili pari a circa 50 g/L.

Il processo è stato condotto in condizioni mesofile (37 °C) e a pH controllato tra 5.2 e 5.5, ottimale per favorire la produzione di idrogeno e limitare la proliferazione di batteri metanogeni.

Si è operato con un reattore di 5 litri, con un volume di lavoro effettivo di 4 litri, in condizioni fed-batch per un periodo complessivo di 30 giorni.

L'inoculo iniziale è stato prelevato da un impianto di digestione anaerobica e sottoposto a pretrattamento termico a 105 °C per 30 minuti, al fine di inibire selettivamente i batteri metanogeni e preservare i batteri produttori di idrogeno, principalmente appartenenti al genere *Clostridium*. Dopo ogni ciclo di scarico del digestato, il reattore è stato reinoculato con una quantità pari al 10% del volume di lavoro, al fine di mantenere un'alta concentrazione di batteri attivi nel sistema.

Nel corso dello studio, la produzione di idrogeno è stata costantemente monitorata, con misurazioni giornaliere del volume di gas prodotto e della sua composizione.

Durante i primi cicli di alimentazione, la produzione di idrogeno ha raggiunto un picco massimo di 182 ml H<sub>2</sub>/gSV, con una composizione del biogas pari al 60% di H<sub>2</sub> e il 40% di CO<sub>2</sub>, senza rilevanti tracce di metano (CH<sub>4</sub>).

La reinoculazione si è dimostrata efficace nel mantenere una concentrazione stabile di batteri produttori di idrogeno all'interno del reattore, contribuendo a preservare l'efficienza del processo anche in condizioni di sovraccarico di substrato.

Il confronto con un sistema non reinoculato, condotto in parallelo come controllo, ha mostrato che quest'ultimo presentava una produzione di idrogeno leggermente inferiore, con un calo della resa già dopo i primi 5 giorni di operazione, a causa di un progressivo esaurimento della popolazione batterica attiva.

Dunque, lo studio ha concluso che l'utilizzo di un sistema reinoculato rappresenta una strategia promettente per la DF di scarti alimentari, in quanto consente di mantenere una produzione di idrogeno elevata e stabile nel tempo.

Tuttavia, è stato osservato che la gestione degli acidi grassi volatili e la loro rimozione periodica potrebbero essere necessari per prolungare ulteriormente la stabilità del processo e prevenire la diminuzione delle rese di idrogeno nelle fasi più avanzate della fermentazione.

#### 6.2.4. Quarta Campagna sperimentale

La quarta campagna sperimentale è finalizzata scale-up del sistema in DF con confronto sull'analisi della crescita microbica. Durante il periodo di incubazione, il biogas prodotto è stato generato nelle percentuali riportate in *Figura 6.24*:

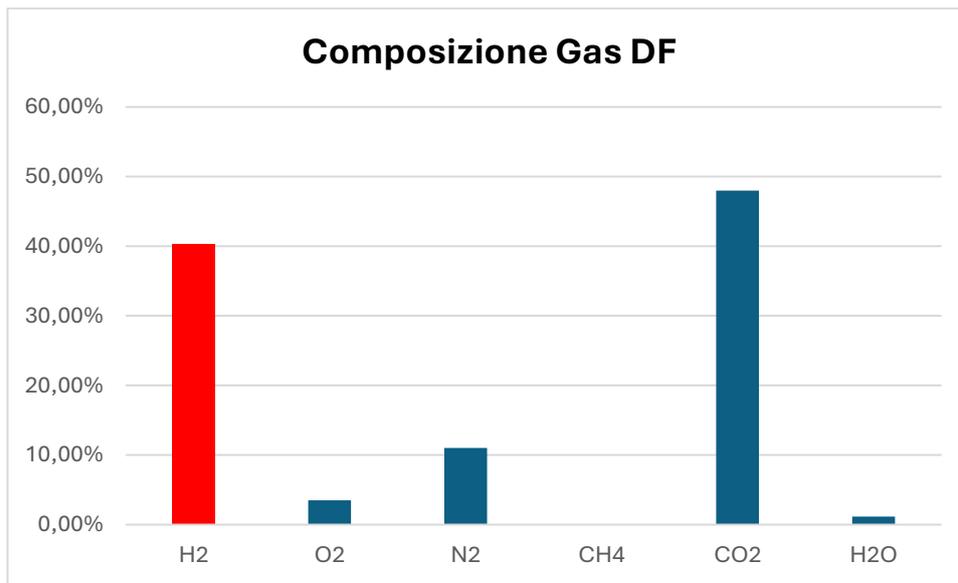


Tabella 6.14 Composizione biogas DF

In *Figura 6.25* si possono osservare i valori di pH iniziali e finali relativi alla dark fermentation:

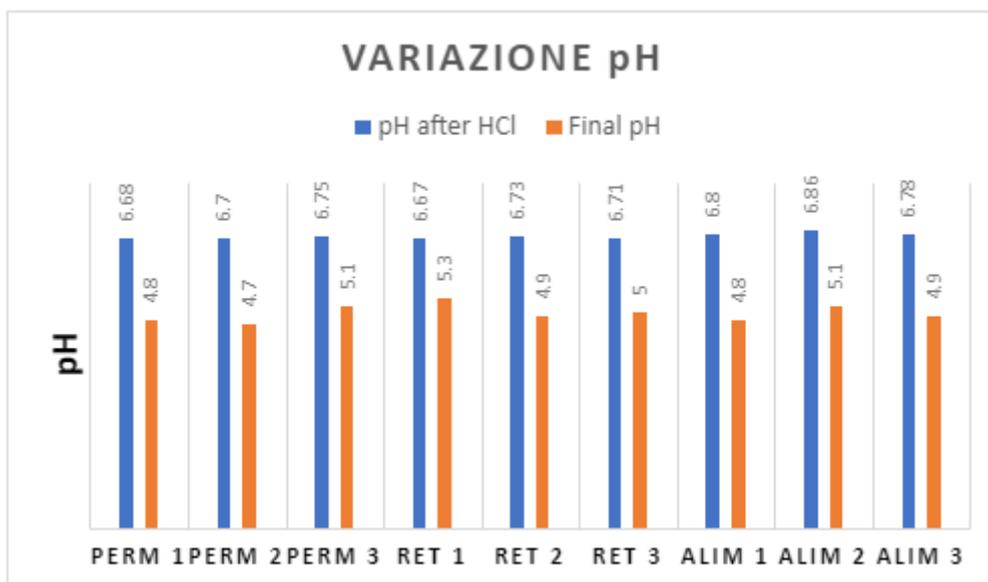


Figura 6.25- Variazione pH quarta campagna sperimentale in DF

In questo studio, l'aspetto distintivo risiede nel monitoraggio della crescita microbica in correlazione con la produzione di biogas. In particolare, mediante l'impiego della tecnica del peso secco, è stata determinata la concentrazione di biomassa nel corso della residenza idraulica. È stata osservata una correlazione diretta tra la crescita microbica e la produzione di biogas, come evidenziato dal grafico sperimentale 6.26, che mostra l'andamento della crescita microbica nel tempo.

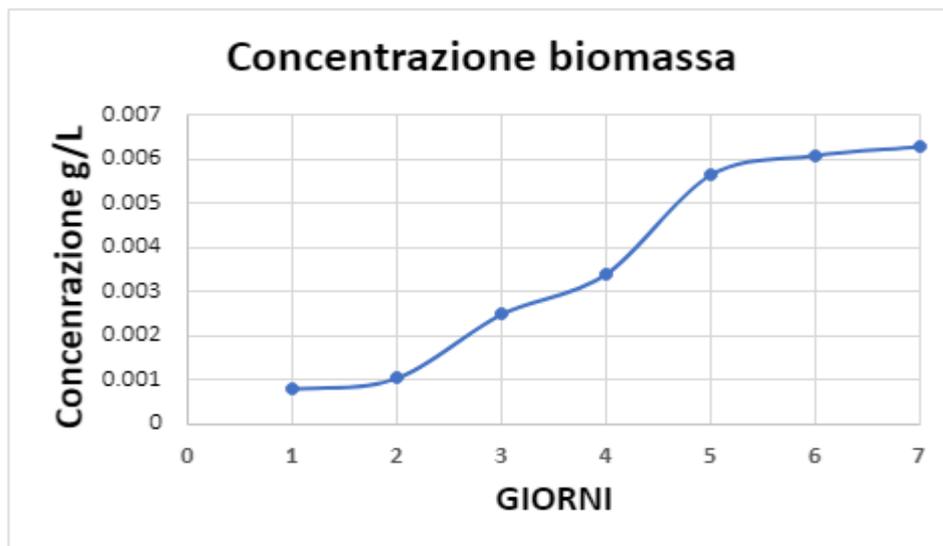


Figura 6.26- Crescita microbica nella quarta campagna sperimentale

La curva ottenuta consente di identificare chiaramente le principali fasi del ciclo di crescita: la fase di latenza (lag), la fase esponenziale e la fase stazionaria, offrendo una rappresentazione dettagliata della dinamica di sviluppo cellulare in funzione del tempo di residenza. Tale parallelismo, dunque, offre uno strumento di monitoraggio per garantire che i processi biologici avvengano come previsto, facilitando anche la validazione dei modelli biologici e delle simulazioni previste per la scala industriale. Difatti, confrontando la *Figura 6.26* con la *Figura 6.27*, è possibile osservare un pattern di produzione di bioidrogeno molto simile, con un valore di  $27 \pm 6$  ml/gVS. Questo risultato conferma l'adeguato utilizzo del substrato e la crescita microbica ottimale, validando così l'efficacia del processo sperimentale adottato.

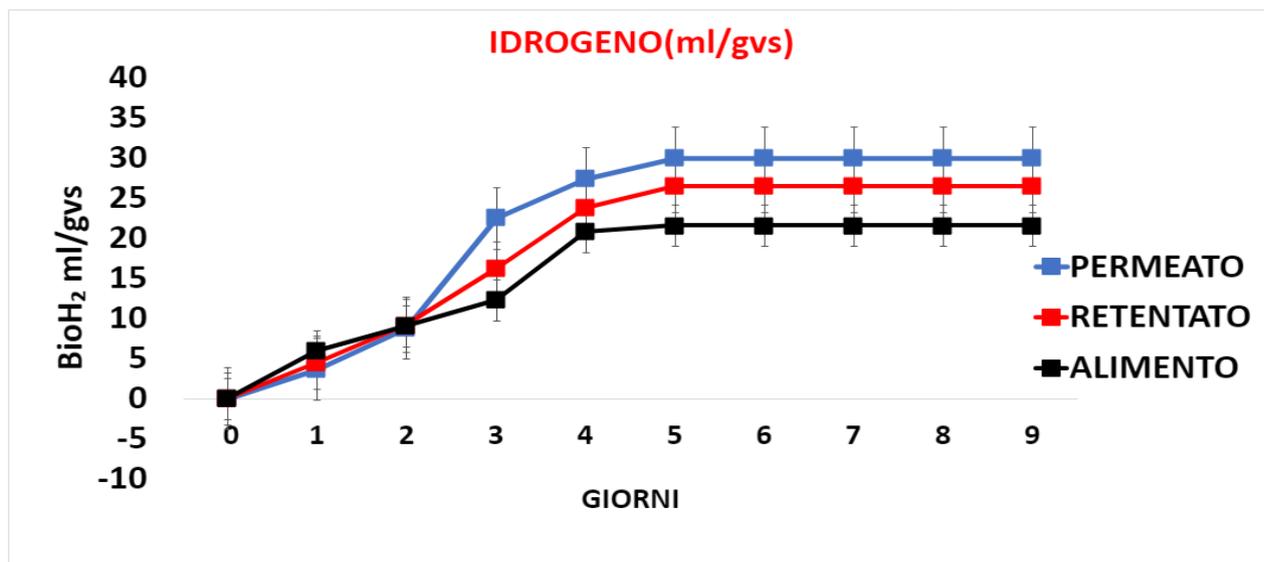


Figura 6.27- Produzione cumulata di anidride carbonica nella terza campagna sperimentale in DF

In modo analogo, per tutti e tre i substrati utilizzati, la quantità di anidride carbonica prodotta si attesta all'interno di un intervallo compreso tra  $31 \pm 11$  ml/gVS.

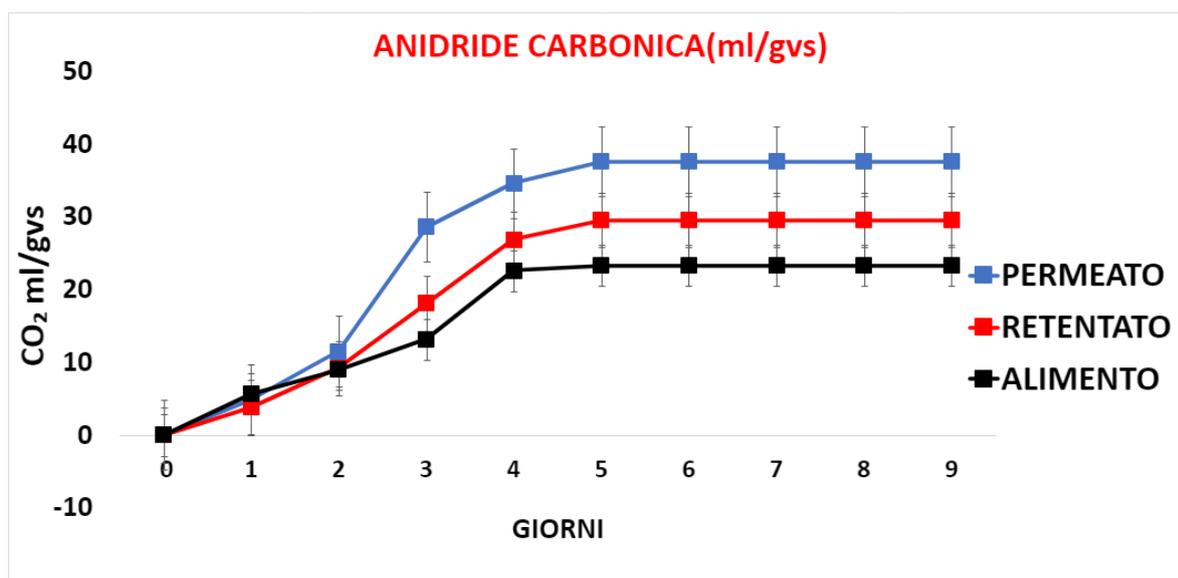


Figura 6.28- Produzione cumulata di anidride carbonica nella terza campagna sperimentale in DF

Nella figura 6.29 viene riportata la quantità complessiva di biogas prodotto durante la DF. Il grafico funge da strumento di sintesi per valutare l'efficienza del processo arrivando ad una produzione cumulata di biogas ad un valore di  $57 \pm 14$  ml/gVS, permettendo di riassumere i risultati finali ottenuti in questo primo stadio fermentativo.

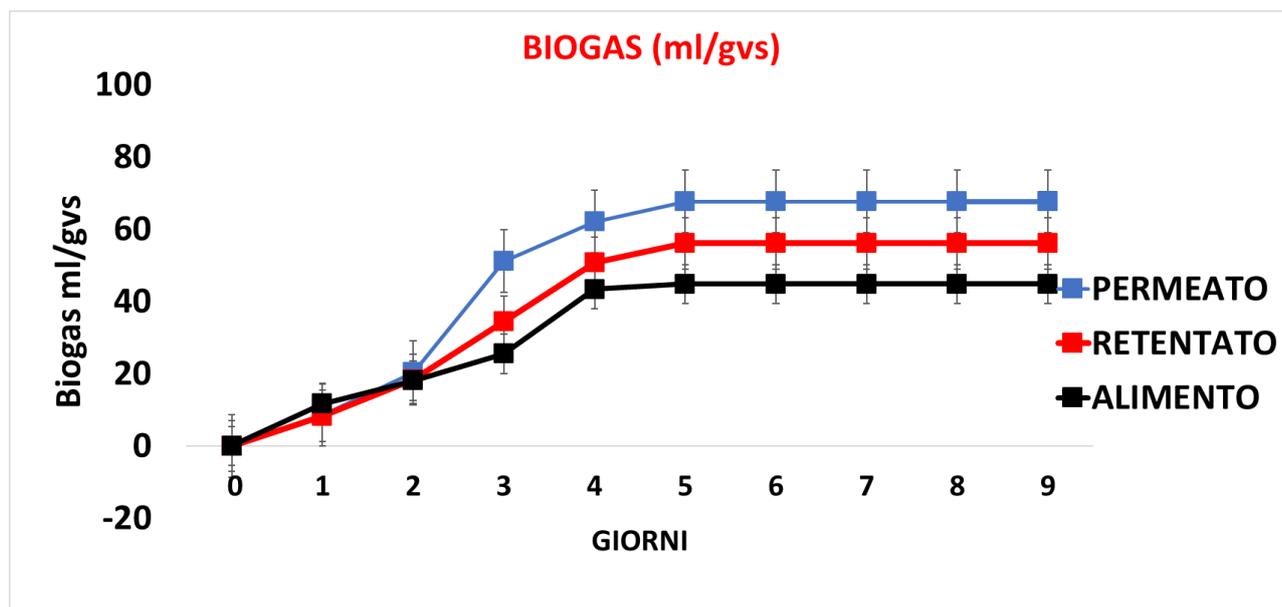


Figura 6.29 - Produzione cumulata di biogas nella quarta campagna sperimentale in DF

In Tabella 6.16 sono elencati i valori dei solidi totali e dei solidi volatili dei digestati di ogni configurazione adottata nella prima campagna sperimentale.

	<b>Permeato</b>	<b>Retentato</b>	<b>Alimento</b>
<b>Solidi totali (ST%)</b>	3.76 ± 0.46	3.63 ± 0.89	3.21 ± 0.63
<b>Solidi volatili su solidi totali (SV/ST %)</b>	72.09 ± 3.01	73.76 ± 1.13	66.77 ± 2.98

Tabella 6.16 – Solidi totali e solidi volatili su solidi totali dei digestati della quarta campagna sperimentale

In Tabella 6.17, invece sono forniti i valori della composizione elementare dei digestati di ogni configurazione impiegata nella prima campagna sperimentale.

	<b>N [%]</b>	<b>C [%]</b>	<b>H [%]</b>	<b>S [%]</b>	<b>O [%]</b>	<b>C/N</b>
<b>Inoculo</b>	1.46± 0.12	32.51 ±1.13	4.33 ±0.92	0.34± 0.02	58.18 ±1.13	29.66 ±3.58
<b>Permeato</b>	1.25± 0.34	33,47 ±1.83	4,59± 0.08	0,38±0.02	56.74± 1.27	29.32± 3.24
<b>Retentato</b>	3.46± 0.98	34,22± 1.14	4,11± 0.09	0,36± 0.11	58.66± 1.98	28.72± 2.57
<b>Alimento</b>	2.63± 0.56	29,89± 1.78	3,45± 0.10	0,33± 0.03	60.11± 1.07	31.25± 2.36

Tabella 6.17– Analisi elementare dei digestati della quarta campagna sperimentale

Tale campagna sperimentale risulta essere simile ad uno studio (Chen *et al.*, 2019) che ha esaminato la produzione di idrogeno mediante DF utilizzando scarti alimentari. Il reattore anaerobico è stato mantenuto in condizioni mesofile (35 °C) e pH iniziale leggermente acido (5.5), con un volume operativo di 5 litri. Il substrato alimentare impiegato comprendeva avanzi di verdura, pretrattati meccanicamente per aumentare la disponibilità di zuccheri fermentescibili. Il processo è stato inoculato con un consorzio microbico proveniente da fanghi anaerobici.

Durante i 5 giorni di fermentazione, è stata monitorata giornalmente la produzione di idrogeno, la crescita microbica tramite la determinazione del peso secco cellulare (DCW).

La produzione di idrogeno ha mostrato un picco di 178 ml H<sub>2</sub>/gSV al terzo giorno, per poi stabilizzarsi e diminuire leggermente nei giorni successivi.

La crescita microbica, misurata tramite il peso secco, ha seguito una dinamica simile: il peso secco è aumentato rapidamente nelle prime 48 ore, passando da un valore iniziale di 0.4 g/l a un massimo di 1.1 g/l al terzo giorno.

Successivamente, la crescita microbica ha subito un rallentamento, probabilmente a causa dell'accumulo di acidi grassi volatili, che hanno raggiunto concentrazioni inibitorie per i microrganismi idrogeno-produttori.

Lo studio ha concluso che un periodo di fermentazione di 5 giorni è adeguato a ottenere un'alta produzione di idrogeno da scarti alimentari, ma ha evidenziato che l'accumulo di prodotti fermentativi, come gli acidi grassi volatili, può limitare la crescita microbica e la produzione di idrogeno a causa di alterazioni del pH del sistema.

La misurazione del peso secco cellulare è stata determinante per monitorare la dinamica di crescita dei microrganismi nel reattore e per correlare l'attività microbica con l'efficienza della produzione di idrogeno.



## 7. CONCLUSIONI

L'economia circolare, con l'obiettivo di ridurre le emissioni di scarti e massimizzare il recupero di risorse anche dai cosiddetti "rifiuti", può essere realizzata dalla ricerca emergente riguardante la produzione di bioidrogeno e biometano partendo dagli scarti alimentari. L'oggetto della presente tesi ha riguardato proprio questo tema, concentrandosi in particolare sulla valorizzazione di scarti alimentari per la produzione di bioidrogeno e biometano attraverso processi biologici. Questo studio ha dimostrato che i substrati derivati da scarti alimentari dell'azienda Sedamyl presentano notevoli vantaggi rispetto ad altri tipi di biomasse, principalmente grazie al loro alto contenuto di zuccheri semplici che risultano facilmente digeribili dai microorganismi coinvolti nei processi fermentativi e di digestione anaerobica. Nel corso delle quattro campagne sperimentali descritte nel sesto capitolo, è stato esaminato il processo di produzione di bioidrogeno e biogas mediante fermentazione oscura (DF) e digestione anaerobica (DA) a doppio stadio.

Ogni campagna ha seguito un approccio specifico per valutare l'influenza dei parametri operativi fondamentali, come il pH, i solidi totali (TS), i solidi volatili (VS), il reinocolo e la crescita microbica, sull'efficienza della produzione di bioidrogeno e biogas.

La prima campagna ha investigato il processo a doppio stadio, osservando una produzione di bioidrogeno cumulata di  $40 \pm 8$  ml/gVS e una produzione trascurabile di metano (massimo 4,7 ml/gVS), confermando l'efficacia del pretrattamento termico per inibire la crescita dei batteri metanogeni. L'analisi dei TS e dei VS ha evidenziato un'efficienza ottimale, con valori di SV/ST per il permeato del 72%, per il retentato del 73%, e per l'alimento del 66%, suggerendo una buona degradazione della materia organica.

La seconda campagna ha introdotto l'ottimizzazione dei parametri, includendo due diverse concentrazioni di solidi totali (3% e 6%) e del rapporto C/N per comparare le configurazioni operative. È stato osservato che una maggiore concentrazione di TS ha portato a una riduzione della resa di idrogeno, confermando che concentrazioni elevate possono limitare il trasferimento di nutrienti e rallentare l'attività microbica.

Il pH, mantenuto tra 6.1 e 6.5, è risultato parametro chiave per favorire la crescita dei batteri acidogenici e ottimizzare la produzione di idrogeno e biogas.

La terza campagna si è focalizzata su un sistema re-inoculato, evidenziando che il reinocolo ha un effetto positivo sul prolungamento della fase esponenziale della crescita microbica. Questo ha portato a un incremento della produzione di bioidrogeno ( $27 \pm 6$  ml/gVS),

dimostrando che il reinocolo favorisce la stabilità del processo e migliora la capacità del sistema di metabolizzare substrati complessi.

Infine, la quarta campagna ha esplorato uno scale-up del sistema, con un'attenzione particolare alla crescita microbica, monitorata tramite misurazioni del peso secco cellulare. I dati hanno evidenziato una correlazione diretta tra la crescita microbica e la produzione di biogas, confermando la centralità del controllo della biomassa e del pH per il successo della fermentazione.

I dati ottenuti in laboratorio indicano che l'efficienza di produzione di bioidrogeno e biometano è stata abbastanza soddisfacente, con rendimenti conformi, rispetto a quelli riportati in letteratura di altre tipologie di rifiuti organici, come le biomasse lignocellulosiche o agroalimentari. Questo risultato è stato attribuito proprio alla composizione chimica dei substrati utilizzati, caratterizzati da una concentrazione elevata di carboidrati semplici, che forniscono una fonte di energia prontamente accessibile per i microorganismi. In letteratura, è ben noto che la digestione anaerobica di materiali lignocellulosici richiede spesso pretrattamenti complessi per la degradazione della lignina e della cellulosa, che altrimenti limiterebbero l'accesso dei microbi ai polisaccaridi.

Al contrario, i substrati alimentari scartati, come quelli utilizzati in questo studio, non necessitano di tali pretrattamenti, semplificando così il processo e aumentando l'efficienza complessiva.

Durante i vari esperimenti condotti in laboratorio su scala ridotta (lab scale), è stato possibile ottimizzare alcune delle condizioni operative, quali il rapporto C/N (carbonio/azoto), il pH, e la temperatura, per massimizzare la produzione di bioidrogeno e biometano. In particolare, l'ottimizzazione del rapporto C/N ha permesso di evitare fenomeni di inibizione, che avrebbero potuto limitare l'efficienza del processo.

Tuttavia, è importante sottolineare che questi risultati, sebbene promettenti, sono stati ottenuti in condizioni controllate di laboratorio.

La transizione verso una produzione su scala industriale richiederà ulteriori studi e ottimizzazioni per affrontare le sfide legate alla variabilità del substrato, ai potenziali problemi di scala e all'integrazione del processo con altre fasi del ciclo produttivo.

L'efficienza di conversione e la stabilità del processo, tuttavia, potrebbero essere ulteriormente migliorate con la messa a punto di strategie di controllo più sofisticate e l'implementazione di tecnologie di pretrattamento che potrebbero aumentare la biodisponibilità dei nutrienti per i microorganismi.

In conclusione, la ricerca condotta ha dimostrato il grande potenziale della valorizzazione degli scarti alimentari per la produzione di bioidrogeno e biometano, fornendo una solida base per ulteriori studi e sviluppi in scala industriale.

La possibilità di integrare questi processi in un ciclo di produzione più ampio, magari in sinergia con altre tecnologie di recupero energetico e di trattamento dei rifiuti, rappresenta una prospettiva molto interessante per il futuro.

L'implementazione industriale di tali processi potrebbe non solo contribuire a una gestione più sostenibile dei rifiuti, ma anche a un significativo progresso verso la realizzazione di un'economia circolare a basse emissioni di carbonio.

Pertanto, è fondamentale che la ricerca prosegua in questa direzione, esplorando le potenzialità di altre biomasse e raffinando ulteriormente le tecniche di produzione per garantire un futuro più sostenibile ed energeticamente efficiente.

La tesi conclude che la produzione di bioidrogeno e biometano da scarti alimentari rappresenta una soluzione sostenibile in linea con i principi dell'Economia Circolare e del Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (PNRR).

## **BIBLIOGRAFIA**

Angelidaki I., Chen X., Cui J., Kaparaju P. and Ellegaard, L. "Thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of household municipal solid waste: start-up procedure for continuously stirred tank reactor." *Water research*, 40(14) (2006), 2621-2628.

Angelidaki, I., and. Ahring B. K. "Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia." *Applied Microbiology and biotechnology* 38.4 (1993): 560-564.

Angenent L. T., Karim K., Al-Dahhan M. H., Wrenn B. A. and Domínguez-Espinoza R. "Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater." *TRENDS in Biotechnology*, 22(9) (2004), 477-485.

Bičáková O. and Straka P. "Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness." *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(16) (2012), 11563-11578.

Brentner L.B., Jordan, P.A., Zimmerman, J.B., 2010. Challenges in developing biohydrogen as a sustainable energy source: Implications for a research agenda. *Environmental Science and Technology*, 44:2243-2254.

Cappai, G., De Gioannis, G., Muntoni, A., Spiga, D., Boni, M. R., Poletti, A., Pomi, R., & Rossi, A. (2018). Biohydrogen production from food waste: Influence of the inoculum-to-substrate ratio. *Sustainability (Switzerland)*, 10(12).

Chen WM., Tseng ZJ., Lee KS., Chang JS., 2005. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy* 30: 1063- 1070.

Chong M. L., Sabaratnam V., Shirai Y. and Hassan M. A. "Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation." *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8) (2009), 3277-3287.

Chong, S., Sen, T.K., Kayaalp, A., & Ang, H.M. (2013). The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment – A state-of-the-art review. *Water Research*, 47(11), 4643-4657

Datar R., Huang J., Maness P. C., Mohagheghi A., Czernik S., Chornet E., 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32:932-939.

Davila-Vazquez G., Arriaga S., Alariste-Mondragon F., Leon-Rodriguez A., Rosales-Colunga L. M., RazoFlores E., 2008. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Environmental Science and Biotechnology*, 7:27-45.

Deublein D. and Steinhauser A. "Biogas from waste and renewable resources" Second revised and expanded edition Wiley-VCH (2012)

Enea, Rapporto tecnico, 2012. Studi sulla produzione di energia elettrica locale da biomasse e scarti. Accordo di Programma MSE/ENEA.

Fang H. H. and Liu H. "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture." *Bioresource technology*, 82(1) (2002), 87-93.

Ghosh S, Chowdhury R, Bhattacharya P. A review on single stage integrated dark-photo fermentative biohydrogen production: insight into salient strategies and scopes. *Int J Hydrogen Energy* 2018; 43-107

Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes "Anaerobic digestion model no. 1 (ADM1)" 2002 IWA Publishing, London.

Gujer, W. - Zehnder, A.J.B., 1983. Conversion process in anaerobic digestion. *Water Science and Technology* 15:127 - 167.

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

Hawkes F. R., Dinsdale R., Hawkes, D. L. and Hussy, I. "Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation." *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11) (2002), 1339-1347.

Hawkes F. R., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R. and Hawkes D. L. "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress." *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2) (2007), 70

Hawkes F. R., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R. and Hawkes D. L. "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress." *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2) (2007), 172-184.

Hydrogen Production Technologies: current State and future developments  
Conf. Pap. Energy, vol. 2013 (2013), pp. 1-9.

Insabato G. Malpei F and Scaglione D. "Aspetti tecnici e normativi dell'utilizzo di sottoprodotti in impianti di biogas" (2014): 9-21.

Karim G. A., Wierzba I. and Al-Alousi Y. "Methane-hydrogen mixtures as fuels." *International Journal of Hydrogen Energy* 21.7 (1996): 625-631.

Karlsson A., Vallin L., Ejlertsson J., 2008. Effects of temperature, hydraulic retention time and hydrogen extraction rate on hydrogen production from the fermentation of food industry residues and manure. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:953–962.

Khanal S. K., Chen W. H., Li L., Sung S., 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29:1123-1131.

Krupp M, Widmann R, 2009. Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale. *International Journal of Hydrogen Energy* 34: 4509-4516.

Kyazze G., Dinsdale R., Guwy A. J., Hawkes F. R., Premier G. C. and Hawkes D. L. "Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously." *Biotechnology and bioengineering*, 97(4) (2007), 759-770.

Lee Y.J., Miyahara T., Noike T., 2001. Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresour Technol.* 80: 227–31.

Lin C. Y. and Chang R. C. (1999), "Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(6) 498-500.

Liu, C., Zhang, Y., Yang, J., Li, X., Chen, H., & Wang, Q. (2021). Anaerobic digestion of food waste in a two-stage system: Focusing on the hybrid configuration with an acidogenic phase followed by a methanogenic phase. *Journal of Environmental Management*, 292

Majizat A., Mitsunori Y., Mitsunori W., Michimasa N. and Jun'ichiro M. "Hydrogen gas production from glucose and its microbial kinetics in anaerobic systems." *Water Science and technology*, 36(6) (1997), 279-286.

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.

Nath K., Das D., 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: Various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:520-529.

Prakasham R.S., T. Sathish, P. Brahmaiah, Ch. Subba Rao, R. Sreenivas Rao, P.J. Hobbs, 2009. Biohydrogen production from renewable agri-waste blend: Optimization using mixer design, *International Journal of Hydrogen Energy* 34:6143-6148.

Schröder C., Selig M., Schönheit P., 1994. Glucose fermentation to acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima* – Involvement of the Embden-Meyerhof pathway. *Archives of Microbiology*, 161:460-470.

Siddique, M. N. I., Zaid, 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.

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.

Wang, J., Wan W., 2008 (a). Effect of Ni<sup>2+</sup>concentration on biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 99: 8864-68.

Wang J., Wan W., 2008 (b). Effect of Fe<sup>2+</sup>concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 1215-1220.

Yokoyama H., Waki M., Moriya N., Yasuda T., Tanaka Y., Haga K., 2007. Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry, *Applied Microbiology and Biotechnology* 74: 474-483.

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.

Zhang M. L., Fan Y., Xing Y., Pan C., Zhang G., Lay J., 2007. Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 250-254.

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.

## **RINGRAZIAMENTI**

Il percorso di elaborazione della tesi ha rappresentato un momento essenziale per la mia crescita personale e professionale. Desidero esprimere la mia più profonda gratitudine alla Professoressa Tonia Tommasi per avermi offerto l'opportunità di intraprendere questa attività, la quale si è rivelata estremamente gratificante e formativa.

Un sentito ringraziamento va inoltre alla Professoressa Francesca Demichelis, per il prezioso supporto fornito durante le fasi di analisi e rielaborazione tesi e per la sua costante disponibilità.

Desidero infine rivolgere un sincero ringraziamento alla Dottoressa Gaia Mazzanti per il suo continuo supporto e per avermi guidato nell'apprendimento durante l'attività di laboratorio, arricchendo così il mio percorso accademico.