

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

PROCESSO MULTISTADIO PER LA VALORIZZAZIONE DI ACQUE DI VEGETAZIONE DALLA PRODUZIONE DI OLIO DI OLIVA: RECUPERO DI COMPOSTI FENOLICI, DIGESTIONE ANAEROBICA E VALUTAZIONE ECONOMICO- AMBIENTALE

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Mattia Cavina

RELATORE

Prof. Davide Pinelli

CORRELATORE

Prof. Dario Frascari

Dott.ssa Giorgia Rubertelli

Dott. Alessandro Ragini

Anno Accademico 2017-2018

Sessione III

ABSTRACT

Olive mill wastewaters (OMWs) are an environmental concern due to their high organic load and phytotoxic activity, but they are rich of phenolic compounds (PCs) and their recovery is interesting, thanks to their antioxidant and antimicrobial properties. The anaerobic digestion of the resulted dephenolized water (D-OMW), in order to produce methane and to obtain a treated water for irrigation, is an additional advantage. The goal of this work is to propose an integrated process of PCs recovery through an adsorption step (evaluated also with LCA-CBA) and anaerobic digestion of D-OMW. Two resins (XAD16 and IRA958 in OH form) were compared with semicontinuous-flow adsorption/desorption tests conducted in a 1-m packed column. A test was also conducted with a mixed bed of the two resins. The D-OMWs resulted from the previous tests were then used for anaerobic digestions. The LCA confirms the possible decreasing of the environmental impact of the process through the addition of an anaerobic digestion step for the production of irrigation water from dephenolized OMW, while the PC market price needed for a positive business case is reasonable. The results indicate that the proposed PC adsorption/desorption technology, if integrated with an anaerobic digestion step, which has an optimal methane yield, represents a promising solution for the treatment and valorisation of OMWs.

INDICE

1 INTRODUZIONE	3
1.1 Chimica verde e valorizzazione degli scarti agroalimentari	3
1.2 Acque di vegetazione da produzione di olio d'oliva.....	4
1.3 I polifenoli nelle acque di vegetazione	5
1.4 Progetto <i>MadForWater</i>	6
1.5 Processo integrato	7
2 SCOPO	9
3 MATERIALI E METODI	11
3.1 Filtrazione delle acque di vegetazione	11
3.2 Isotherme di adsorbimento di composti fenolici (PC) e COD	11
3.3 Allestimento prove di adsorbimento in semi-continuo	13
3.3.1 Impaccamento colonne e caratterizzazione fluidodinamica.....	13
3.3.2 Prove di breakthrough con una singola resina.....	13
3.3.3 Prove di breakthrough con resina mista	14
3.4 Analisi costi-benefici (CBA) e valutazione del ciclo di vita (Lyfe cycle assessment - LCA) di un processo di recupero di polifenoli	15
3.5 Allestimento prove di digestione anaerobica di acque defenolizzate	17
3.5.1 Acque defenolizzate con resina XAD16	17
3.5.2 Acque defenolizzate con resina IRA958	17
3.5.3 Bianchi.....	17
3.6 Caratterizzazione prodotti ed allestimento prove potere batteriostatico	18
3.6.1 Risospensione acquosa del prodotto desorbito.....	18
3.6.2 Preparazione brodo di coltura e piastre Petri.....	18
3.6.3 Curve di crescita.....	18
3.6.4 Prove per potere batteriostatico e determinazione del MIC	19
3.7 Reagenti e resine	20

4 DESCRIZIONE TECNICHE ANALITICHE	21
4.1 Determinazione dei solidi volatili e solidi totali	21
4.2 Misura della produzione di biogas	21
4.3 Analisi della composizione del biogas	21
4.4 Pretrattamento campioni liquidi	22
4.5 Misura della concentrazione dei polifenoli	22
4.5 Misura della concentrazione degli Acidi Grassi Volatili (VFA)	23
4.6 Misura del potere antiossidante	24
4.7 Misura della concentrazione proteica	24
4.8 Misura della Domanda Chimica di Ossigeno	25
4.9 Misura dell'Azoto-Ammoniacale	25
4.10 Misura degli zuccheri riducenti	25
4.11 Misura della Domanda Biochimica di Ossigeno.....	26
5 RISULTATI E DISCUSSIONE	27
5.1 Isotherme di adsorbimento.....	27
5.2 Prove di adsorbimento in semi-continuo	30
5.2.1 Prove di breakthrough su singole resine.....	32
5.2.2 Prova di breakthrough su resine miste	35
5.3 Caratterizzazione prodotto e potere batteriostatico.....	38
5.4 Digestione anaerobica di acque defenolizzate	40
5.4.1 Digestione di acque defenolizzate con XAD16	42
5.4.2 Digestione di acque defenolizzate con IRA958	48
5.5 Analisi costi-benefici e valutazione del ciclo di vita	55
5.5.1 Valutazione del ciclo di vita.....	57
5.5.2 Analisi costi-benefici.....	60
6 CONCLUSIONI	62
BIBLIOGRAFIA	63

1 INTRODUZIONE

1.1 Chimica verde e valorizzazione degli scarti agroalimentari

Il XXI secolo è caratterizzato ed afflitto da differenti problematiche di carattere ambientale e di conseguenza si è reso necessario che le tecnologie in uso nell'industria chimica e, per il caso in oggetto di tesi, agrochimica dovessero utilizzare un approccio differente, per garantire la sostenibilità ambientale del processo, oltre che a quella meramente economica. Si è quindi venuta a delineare il concetto di chimica sostenibile (o chimica verde) che si pone come fine sia quello di intervenire sui vecchi processi ammodernandoli o convertendoli, sia quello di fare in modo che i nuovi processi ed i nuovi prodotti siano sostenibili, eco-compatibili o che il loro impatto ambientale sia il più basso possibile.

Un primo approccio è stato quello di usare nuove materie prime che fossero di origine vegetale, ossia le biomasse di prima generazione, come mais, girasole o barbabietole, per arrivare alla produzione di energia o *building blocks* per l'industria chimica: il problema che sorse è stato maggiormente di tipo etico, dal momento che si impiegavano ettari di terreno agricolo per coltivare piante, normalmente ad uso alimentare, per alimentare i biodigestori o le prime bioraffinerie. Si è quindi pensato di passare ad una valorizzazione degli scarti della filiera agroalimentare e non solo, passando quindi alle biomasse di seconda generazione.

Questi scarti infatti, che solo in Italia sono quantificabili in circa 12 milioni di tonnellate annue¹, rappresentano un costo per l'industria agroalimentare nel momento in cui devono essere smaltiti, a meno che non si provveda ad una loro valorizzazione energetica, come possono essere la combustione diretta, la trasformazione di parte di essi in *building blocks* per l'industria chimica o la digestione anaerobica. Con quest'ultimo processo in particolare si punta alla trasformazione della frazione organica per mezzo di consorzi batterici in prodotti liquidi o gassosi, che poi vengono impiegati come biocombustibili per la produzione di energia elettrica e termica, tramite impianti di cogenerazione. L'energia elettrica così ottenuta viene poi spesso reimpiegata nel funzionamento degli stessi impianti industriali che producono questi scarti oppure ceduta alla rete elettrica nazionale.

Uno degli scarti dell'industria agroalimentare, che può essere valorizzato in diversi modi, è l'acqua di vegetazione derivante dalla produzione dell'olio d'oliva.

1.2 Acque di vegetazione da produzione di olio d'oliva

Nella produzione dell'olio d'oliva le acque di vegetazione (in inglese *Olive mill wastewater* - OMW) rappresentano gli effluenti in uscita dal frantoio costituiti dalle acque con cui vengono lavate le olive e l'impianto, dalla parte acquosa derivante dalla spremitura e dalle acque di diluizione delle paste. Se si considera che il dato mondiale della stagione 2017/2018 sulla produzione di olio d'oliva, circa 3,3 milioni di tonnellate di cui il 96% prodotto nella sola area mediterranea², e che per ogni tonnellata di olio d'oliva, si producono all'incirca 7-8 m³ di acque di vegetazione, si può stimare che nella sola area mediterranea si producano tra i 23 e i 24 milioni di m³/anno di OMW.

La composizione chimico-fisica delle OMW è variabile ed è dipendente da diversi fattori, tipo il grado di maturazione e la varietà delle olive o la tipologia di processo per la produzione dell'olio d'oliva; i composti che generalmente caratterizzano le OMW sono polifenoli (0,1-18 g/L), olii e grassi (5-10 g/L), zuccheri (fino a 20-30 g/L), oltre ad altre molecole organiche come proteine e acidi organici. La grande quantità di composti organici presente nelle OMW si traduce in alti valori di COD (*Chemical oxygen demand* – Domanda chimica di ossigeno), compresi tra i 20 e i 60 g/L e BOD₅ (*Biochemical oxygen demand* – domanda biochimica di ossigeno)^{3,4}.

Visti gli alti valori di COD, le acque di vegetazione rappresentano un problema nel momento in cui si vogliono smaltire all'interno di un impianto di depurazione acque con processi aerobici: si stima che ogni m³ di OMW abbia lo stesso carico inquinante di 100-200 m³ di acque reflue urbane (equivalenti alla produzione di reflui di una città di 100000 abitanti) e che il suo smaltimento costi al frantoio tra i 30 ed i 50 €/m³ a seconda della regione⁵.

L'alternativa allo smaltimento in un depuratore è lo spandimento al suolo come metodo di fertirrigazione, regolato dalla Legge 11 novembre 1996, n. 574 (*“Nuove norme in materia di utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e di scarichi dei frantoi oleari”*) e dal Decreto Ministeriale 6 luglio 2005 del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (*“Criteri e norme tecniche generali per la disciplina regionale dell'utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e degli scarichi dei frantoi oleari”*). La normativa prevede che, a seconda del processo di produzione di olio d'oliva, possano essere sparsi

tra i 50 e gli 80 m³ di OMW per ettaro all'anno e determina anche tutte le casistiche in cui non si possano spandere questi effluenti di frantoio.

Tuttavia, se da una parte la fertirrigazione può essere utile per irrigare gli oliveti, la normativa parla di generici terreni agricoli, il che porta ad un abuso nello spandimento in quanto impiegabile anche su terreni agricoli lasciati incolti⁶. Inoltre, nonostante la carica organica sia ottima per fertilizzare il terreno, la contemporanea presenza di polifenoli conferisce alle OMW proprietà fitotossiche e antimicrobiche che recano all'ambiente un impatto non trascurabile, specie in presenza di falde freatiche.

Un'alternativa a questi trattamenti può essere la digestione anaerobica di queste acque, ma in precedenti lavori di tesi⁷, è stato dimostrato che le OMW tal quali hanno un basso potenziale metanogenico a causa dell'inibizione data dai polifenoli, senza considerare che gli stessi polifenoli sono molecole ad alto valore aggiunto che potrebbero essere recuperati per altri usi.

1.3 I polifenoli nelle acque di vegetazione

Nonostante la loro presenza sia un problema nelle OMW, i polifenoli, come l'idrossitirosolo, l'oleuropeina ed il tirosolo (Figura 1), hanno diverse proprietà benefiche sia come antimicrobici che come antiossidanti: in particolare la loro alta capacità antiossidante è in grado di prevenire l'ossidazione delle proteine e l'eliminazione dei radicali liberi.

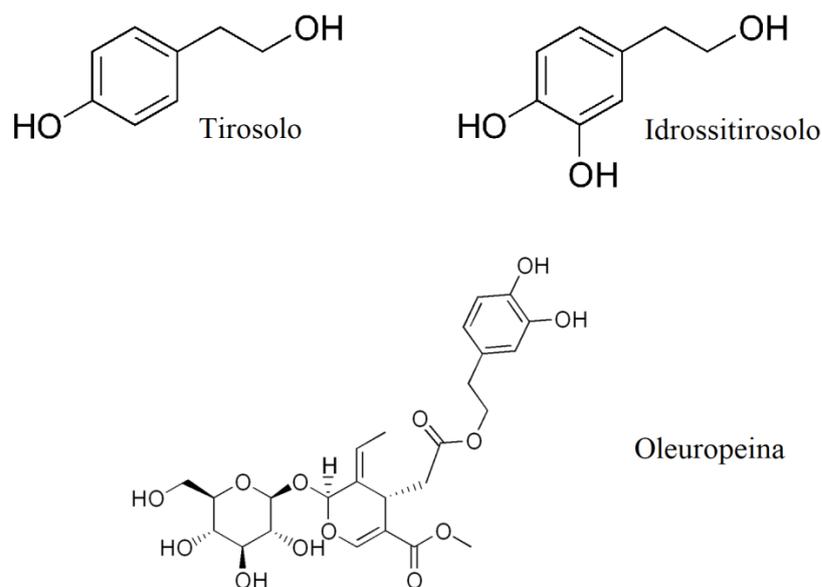


Figura 1 – Polifenoli maggiormente presenti nelle OMW

L'idrossitirosole in particolare, generalmente presente ad alte concentrazioni nelle OMW, ha un elevato potere antiossidante oltre ad avere proprietà antibatteriche ed antiinfiammatorie. Inoltre, come detto in precedenza, i polifenoli hanno un alto valore aggiunto e non è quindi da escludersi un loro recupero finalizzato alla vendita.

La tecnica più diffusa per il recupero dei composti polifenolici dalle acque di vegetazione è l'estrazione con solvente, in particolare etilacetato, ma sono state studiate anche tecniche come la separazione a membrana, la centrifugazione e l'uso di tecniche cromatografiche. Un'ulteriore alternativa, oggetto di questo progetto di tesi, è l'uso dell'adsorbimento su resina. Anche se il prodotto di desorbimento potrebbe necessitare di un ulteriore processo di purificazione, l'adsorbimento è una tecnica di separazione che possiede una relativa semplicità nella progettazione, nell'operatività e nello scale-up da una scala di laboratorio ad una di impianto.

1.4 Progetto *MadForWater*

Come detto in precedenza, le acque di vegetazione possono risultare problematiche, in quanto possedendo alti valori di COD e BOD sono difficilmente trattabili in impianti di depurazione, contribuendo quindi ad elevati costi di smaltimento e vi sono dei limiti per il loro utilizzo per la fertirrigazione; al tempo stesso risultano essere una preziosa fonte di polifenoli, che possono avere un uso nell'industria cosmetica o in quella farmaceutica.

Un'altra considerazione fatta in precedenza è l'elevata quantità di acque di vegetazione che vengono prodotte per ogni litro di olio d'oliva prodotto. I grandi quantitativi di acqua possono diventare un problema per tutti quei paesi, in special modo quelli del Nord Africa, che hanno problemi nell'approvvigionamento di acqua ad uso irriguo e industriale, oltre che civile; basti pensare che entro il 2035 è previsto un incremento del 47% nella domanda di acqua nei paesi nordafricani ed in questi paesi il consumo di acqua in agricoltura rappresenta una quota compresa tra l'80 e l'85%⁸.



Figura 2 – Logo MadForWater

A questo proposito l'Unione Europea, nell'ambito di *Horizon 2020*, ha finanziato il progetto *MadForWater* (Figura 2), rivolto a tre paesi dell'Africa mediterranea (Egitto,

Tunisia e Marocco), col fine di sviluppare soluzioni tecnologiche per il trattamento delle acque reflue ed il loro conseguente riutilizzo in agricoltura. Il progetto, a cui aderiscono 18 diversi soggetti tra università, centri di ricerca ed industrie, è coordinato dall'Università di Bologna; che ha focalizzato il suo ambito di ricerca nella valorizzazione e nel trattamento delle acque di vegetazione tunisine derivanti dalla produzione di olio d'oliva. Al momento il trattamento che questi effluenti subiscono in Tunisia si basa principalmente sull'evaporazione in grandi vasche all'aperto dove al tempo stesso subiscono un naturale processo di degradazione biologica⁹.

1.5 Processo integrato

In questo lavoro di tesi si è voluto indagare la fattibilità di un processo integrato che possa valorizzare il contenuto di polifenoli nelle acque di vegetazione ed ottenere delle acque che possano essere reimpiegate in campo agricolo per l'irrigazione, valorizzando un bene come l'acqua e sopperendo quindi alla sua scarsità nei paesi dell'Africa mediterranea.

Il processo integrato proposto si compone di diverse parti, riassunte anche in figura (Figura 3):

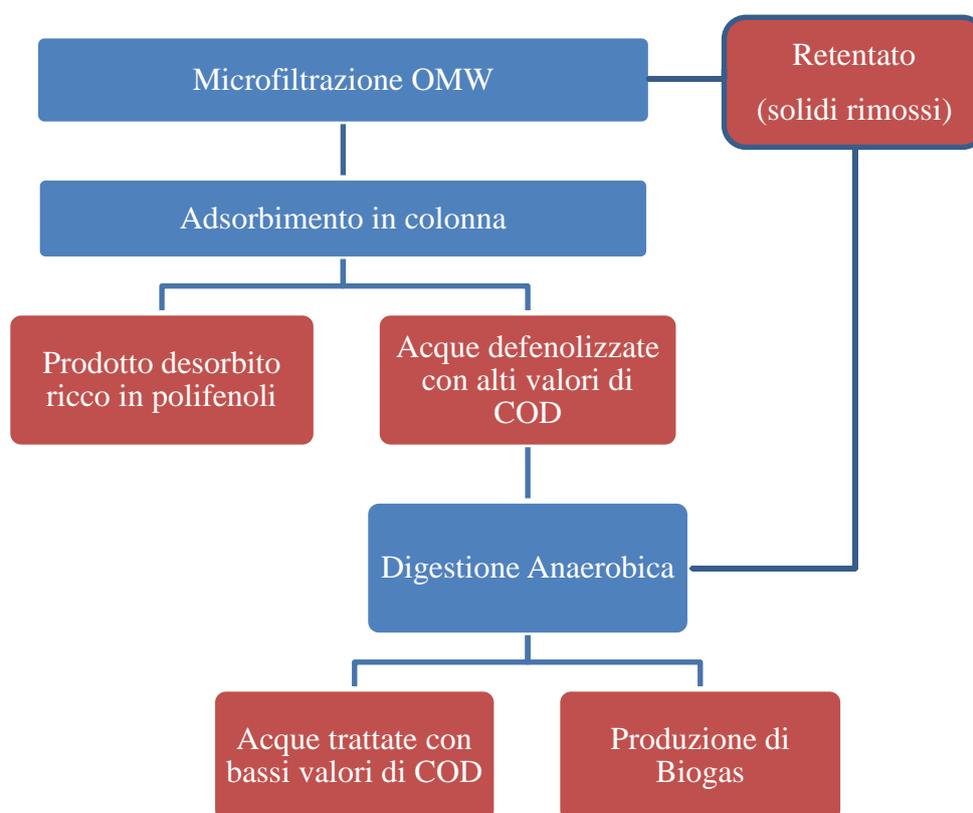


Figura 3 – Schema del processo integrato proposto

- Microfiltrazione delle acque di vegetazione: si rende necessario in quanto la presenza di solidi all'interno delle OMW andrebbe ad inficiare il processo di adsorbimento;
- Adsorbimento in colonna: processo con resina per recuperare i polifenoli, ottenendo al tempo stesso un'acqua trattata defenolizzata;
- Digestione anaerobica: l'acqua trattata in uscita dall'impianto di adsorbimento, visto il suo alto valore di COD, può essere impiegata in una digestione anaerobica per la produzione di biogas, eventualmente sfruttata come fonte di energia per il processo di adsorbimento/desorbimento.

Il processo quindi da una parte consente il recupero dei polifenoli tramite una fase di adsorbimento su resina, mentre dall'altro consente il trattamento delle acque con conseguente abbattimento dei valori di COD, e conseguentemente di BOD₅, grazie ad una fase di digestione anaerobica. Secondo la norma ISO 16075-2, vi sono diverse categorie di qualità per le acque trattate: si va da un'acqua trattata di ottima qualità, il cui uso irriguo è libero e deve garantire un BOD₅ massimo di 10 mg O₂/L, ad un'acqua trattata di media qualità, con un BOD₅ massimo di 100 mg O₂/L, il cui uso irriguo è limitato ed in alcuni casi necessita di ulteriori accorgimenti per poter essere impiegata.

2 SCOPO

Le grandi quantità di acque di vegetazione prodotte, come effluente di scarto della produzione di olio d'oliva, necessitano, vista la loro elevata carica inquinante di un trattamento. In un'ottica di sostenibilità ambientale e di ottimizzazione nell'uso delle risorse idriche in paesi caratterizzati da scarsità di acqua, sarebbe ottimale poterle riutilizzare per uso irriguo. Inoltre, la presenza di molecole ad alto valore aggiunto, come i polifenoli, in questi effluenti potrebbe giustificare un loro recupero ed una loro conseguente valorizzazione.

Il presente lavoro di tesi ha avuto quindi lo scopo di proporre un'alternativa ai trattamenti attuali di questi effluenti che possa essere competitiva sia sul piano ambientale che su quello economico. Questa alternativa si è concretizzata in uno step di microfiltrazione, seguito dal recupero dei polifenoli tramite un processo semi-continuo di adsorbimento in colonna su resina ed infine da una digestione anaerobica in batch degli effluenti defenolizzati in uscita dalla colonna, addizionati del solido ottenuto dalla microfiltrazione.

I principali obiettivi del progetto svolto in questa tesi sono:

- 1) Una prima parte dedicata allo sviluppo del processo di adsorbimento, che è stata preceduta da una prima fase di screening di diverse resine di adsorbimento effettuata in lavori di tesi precedenti e che ha portato alla selezione di una coppia di resine interessanti da un punto di vista economico per l'applicazione industriale; sulla base dei risultati è stata condotta la seconda fase di sviluppo, oggetto del presente lavoro di tesi, caratterizzata dallo studio delle isoterme di adsorbimento di due resine, una neutra ed una a scambio ionico, in condizioni ottimizzate, e le relative prove di breakthrough in colonna in condizioni non ottimizzate.
- 2) Una seconda parte sperimentale in cui il prodotto di desorbimento, ossia un estratto ricco in polifenoli ed altre sostanze organiche, è studiato come potenziale antiossidante e come inibitore batteriostatico da utilizzarsi in ambito cosmetico. Dal momento che si ottiene un estratto diverso per ognuna delle due resine, è necessario effettuare un confronto tra i due prodotti desorbiti.
- 3) Una terza parte sperimentale in cui le acque di vegetazione defenolizzate sono sottoposte a digestione anaerobica, al fine di valutare i potenziali metanogenici di

acque defenolizzate con differenti resine e di verificare inoltre l'abbattimento del loro carico organico, al fine di stabilire se sia possibile l'utilizzo in ambito agricolo delle acque così processate.

- 4) Infine si è valutata la sostenibilità economico-ambientale del processo, tramite un'analisi costi-benefici ed una valutazione del ciclo di vita del processo, per ora limitata al solo impianto di recupero di polifenoli, al fine di arrivare ad una ottimizzazione economico-ambientale del processo

3 MATERIALI E METODI

3.1 Filtrazione delle acque di vegetazione

Le acque di vegetazione tunisine (OMW) prima di essere impiegate nelle prove di adsorbimento sono state microfiltrate grazie ad un impianto *Juclas*, dotato di una pompa a membrana, di un filtro ceramico circolare avente diametro 40 cm e pori di 0,2 μm e di un sistema di ricircolo del retentato. In tabella 1 sono riportati i dati di caratterizzazione prima e dopo la microfiltrazione.

		OMW tal quali	OMW Microfiltrate
ST (Solidi totali)	g/L	41 \pm 0,1	37 \pm 0,3
SV (Solidi volatili)	g/L	26 \pm 0,2	24 \pm 0,4
SS (Solidi sospesi)	g/L	3,5 \pm 0,08	5 \pm 0,14
SD (Solidi disciolti)	g/L	41 \pm 0,6	32 \pm 0,05
PC (hplc)	g Acido Gallico _{eq} /L	1,41 \pm 0,08	1,28 \pm 0,07
PC (folin)	g Acido Gallico _{eq} /L	4,4 \pm 0,5	3,98 \pm 0,25
Potere Antioss. Spec. HPLC	g Acido Ascorbico _{eq} /gPC _{HPLC}	5,5 \pm 0,3	5,3 \pm 0,7
COD	g O ₂ /L	70 \pm 5	65 \pm 1,7
COD (FelsiLab)	g O ₂ /L	60	48
BOD ₅ (FelsiLab)	g O ₂ /L	26	19
Proteine	mg BSA/L	150,3 \pm 4,7	214,5 \pm 9,7
Zuccheri riducenti	g glucosio/L	3,45 \pm 0,26	5,16 \pm 0,06

Tabella 1 - Caratterizzazione OMW tal quali e microfiltrate

3.2 Isotherme di adsorbimento di composti fenolici (PC) e COD

Le isoterme sono state studiate in termini di adsorbimento di composti fenolici (PC) e di sostanza organica e inorganiche (COD) attraverso la miscelazione di differenti quantità di resina secca con 30 mL di OMW microfiltrata in vial da 120 mL: il range di rapporto tra resina secca e OMW filtrata testato è compreso tra 2 e 450 g_{resina secca}/L. Le vial sono poi state messe in un incubatore termostato a 22°C ed in agitazione a 120 rpm per 2 ore. I materiali adsorbenti impiegati sono la resina Amberlite XAD16 per una prova e la resina a scambio ionico Amberlite IRA958 in forma OH⁻ per l'altra prova. Per attivare le resine, così come per convertire la resina IRA958 da Cl⁻ a OH⁻, è stato seguito quanto indicato da Frascari et al.¹⁰. I test sono stati effettuati aggiustando il pH delle acque al valore

consigliato per ciascuna resina: la resina XAD16 è scarsamente influenzata dunque è stato usato il pH naturale delle AV (pH 4,2), la IRA958 invece è stata testata al pH ottimale (pH 9). La concentrazione di PC e COD nel liquido all'equilibrio dopo 2 ore è stata determinata tramite il metodo HPLC per il primo ed il kit per COD per il secondo, mentre quella adsorbita è stata determinata con la seguente equazione:

$$C_{S,eq,i} = \frac{C_{L,0,i} \cdot V_{OMW,0} - C_{L,eq,i} \cdot V_{L,f}}{m_S}$$

Dove $C_{L,eq,i}$ e $C_{L,0,i}$ sono la concentrazione finale e iniziale di PC o COD nel liquido, m_S è la massa di resina secca, $V_{OMW,0}$ il volume di OMW usato nella prova e $V_{L,f}$ il volume risultante dalla somma del volume di OMW impiegata e quello dell'acqua contenuta nella resina attivata. Le isoterme sperimentali di PC e COD ottenute sono state interpolate tramite due modelli di adsorbimento:

(1) Isoterma di Langmuir:
$$C_{S,eq,i} = \frac{C_{S,i}^{\infty} \cdot C_{L,eq,i}}{\frac{1}{K_{eq,i}} + C_{L,eq,i}}$$

dove $C_{S,eq,i}$ indica la quantità adsorbita in grammi di PC o COD per massa di resina secca, $C_{L,eq,i}$ la concentrazione di PC o COD in fase liquida all'equilibrio, $C_{S,i}^{\infty}$ la quantità massima adsorbita per massa di resina secca (corrispondente ad un adsorbimento monostrato) e $K_{eq,i}$ la costante legata all'affinità dei siti di legame con PC o COD.

(2) Isoterma di Freundlich:
$$C_{S,eq,i} = K_{F,i} \cdot C_{L,eq,i}^{\frac{1}{n_i}}$$

dove $C_{S,eq,i}$ indica la quantità adsorbita in grammi di PC o COD per massa di resina secca, $C_{L,eq,i}$ la concentrazione di PC o COD in fase liquida all'equilibrio, $K_{F,i}$ è la capacità di adsorbimento e $\frac{1}{n_i}$ è l'intensità di adsorbimento.

I parametri sono stati stimati attraverso regressione non lineare dei minimi quadrati tra la concentrazione calcolata col modello e la concentrazione sperimentale: per ognuna delle resine testate e della sostanza adsorbita (PC o COD) è stato scelto il modello che risultava più corrispondente sulla base del coefficiente di correlazione R^2 ottenuto. I risultati derivanti dalle isoterme di adsorbimento sono serviti a verificare la forma dell'isoterma (favorevole/sfavorevole), la purezza in PC del prodotto adsorbito e la concentrazione di PC adsorbita in equilibrio con la concentrazione media di PC nelle acque microfiltrate.

A seguito dei test di adsorbimento, sono stati eseguiti dei test di desorbimento: è stata rimossa dalle vial l'OMW in equilibrio con la resina testata con una siringa e sono stati messi 30 mL di solvente di desorbimento; le vial sono poi state messe in un incubatore termostato a 22°C ed in agitazione a 120 rpm per 2 ore, misurando al termine la concentrazione dei PC in fase liquida. È stata ottenuta quindi la performance di desorbimento per ogni combinazione di resina e solvente, quantificata come resa di desorbimento di PC, ossia come rapporto tra la massa di PC desorbita e quella adsorbita. I risultati derivanti sono serviti a selezionare il miglior solvente di desorbimento e il relativo pH ottimale.

3.3 Allestimento prove di adsorbimento in semi-continuo

3.3.1 Impaccamento colonne e caratterizzazione fluidodinamica

Prima di procedere alle prove di breakthrough, è stato necessario impaccare le colonne con la resina scelta e procedere ad un test fluidodinamico. I test di breakthrough sono stati condotti a 22°C, tramite l'uso di un bagnetto termostato, in due colonne in serie da 0,61 m ognuna (diametro interno 0,027 m). In fondo ad ogni colonna è stato posto uno strato di 55 mm di sabbia di quarzo sul quale è stata poi impaccata la resina scelta impiegando la tecnica di compressione dinamica assiale^{3,11}; in cima alla resina impaccata è stato poi posto un ulteriore strato di 55 mm di sabbia di quarzo. La lunghezza totale del letto di resina è risultata quindi essere di 1,00 m. È stato un test fluido dinamico flussando, tramite una pompa peristaltica *Masterflex L7S 0,1 HP 1-100 rpm*, una soluzione di NaCl 0,05 M per la resina XAD16 e una soluzione di NaOH 0,05 M per la resina a scambio ionico IRA958 in forma OH⁻, vista la sua alta affinità con gli ioni cloruro; è seguita poi una seconda prova flussando acqua demineralizzata. La conduttività elettrica è stata misurata all'uscita della colonna tramite un conduttimetro *EUTECH Instruments 2700 series*. Questo test ha permesso di stimare l'effettiva porosità e quindi valutare la velocità interstiziale e il tempo di permanenza idraulico (HRT). La porosità effettiva è stata valutata dalla curva di distribuzione del tempo di permanenza idraulico, come nella procedura proposta da Levenspiel¹².

3.3.2 Prove di breakthrough con una singola resina

Il test di adsorbimento è stato condotto flussando OMW microfiltrate, aggiustandone il pH al valore consigliato per ciascuna resina (pH 4,2 per la resina XAD16 e pH 9 per la resina IRA958), nell'impianto di adsorbimento, monitorando perdite di carico e portata

ogni ora. Ogni ora è stato campionato il liquido in uscita dalla colonna ed ogni 3 ore quello in entrata, al fine di normalizzare i valori di concentrazione di PC e COD in uscita. Le OMW sono state flussate in colonna ed il liquido in uscita è stato campionato fino a che la concentrazione di PC in uscita non è risultata essere il 92-95% di quella in entrata. Le acque trattate in uscita dall'impianto fino al raggiungimento del valore di breakpoint, pari ad una concentrazione di PC in uscita pari al 20% di quella in entrata, sono state impiegate come acque defenolizzate per le prove di digestione anaerobica.

Il test di desorbimento, per recuperare il prodotto adsorbito, è stato condotto flussando, in controcorrente rispetto all'adsorbimento, il solvente per il desorbimento: inizialmente ad una portata uguale a quella di assorbimento, successivamente è stato calato il flusso per mantenere una pressione inferiore a 2 bar. Il desorbimento è stato interrotto al raggiungimento di una concentrazione di PC pari all'1% della media entrata durante la prova di adsorbimento. Per la prova di desorbimento sono stati flussati 5 *bed volumes* (BV - volume di colonna occupato dalla resina) di etanolo acidificato con 0,5% v/v di HCl 0,1 N (pH 3,3) seguiti da 10 BV di una miscela 50/50 di etanolo acidificato (pH 3,3) e acqua demineralizzata per la resina XAD16, mentre per la resina IRA958 in forma OH⁻ sono stati flussati 7 BV di una miscela 50/50 di acqua ed etanolo acidificato con HCl fino ad una concentrazione 2 M.

3.3.3 Prove di breakthrough con resina mista

Il test è stato condotto su 4 colonne in serie da 0,62 m ognuna (diametro interno 0,0272 m). In fondo ad ogni colonna è stato posto uno strato di 60 mm di sabbia di quarzo sul quale è stata poi impaccata la resina scelta impiegando la tecnica di compressione dinamica assiale^{3,11}; in cima alla resina impaccata è stato poi posto un ulteriore strato di 60 mm di sabbia di quarzo. La lunghezza totale del letto di resina è risultata quindi essere di 2,00 m: il primo metro letto era costituito da IRA958 in forma OH⁻, mentre il secondo da XAD16. Il test fluidodinamico è stato eseguito come indicato al punto 3.3.1, in maniera separata per l'IRA958 e per la XAD16. Il test di adsorbimento è stato quindi condotto flussando OMW microfiltrate, dopo averle corrette a pH 6,5 (ottimale secondo precedenti test effettuati), nell'impianto di adsorbimento termostato a 21°C, monitorando perdite di carico e portata ogni ora. Ogni ora è stato campionato il liquido intermedio in uscita dalle prime due colonne e quello in uscita dall'impianto ed ogni 2-3 ore quello in entrata, al fine di normalizzare i valori di concentrazione di PC e COD intermedi e in uscita. Le OMW sono state flussate in colonna ed il liquido in uscita è stato

campionato fino a che la concentrazione di PC in uscita non è risultata essere il 92-95% di quella in entrata.

Il test di desorbimento, per recuperare il prodotto adsorbito, è stato condotto flussando, in controcorrente rispetto all'adsorbimento, il solvente per il desorbimento: inizialmente ad una portata uguale a quella di assorbimento, successivamente è stato calato il flusso per mantenere una pressione inferiore a 2 bar. Il desorbimento è stato interrotto quando si è raggiunta una concentrazione di PC pari all'1% della media entrata durante la prova di adsorbimento. Per la prova di desorbimento sono stati flussati 5 *bed volumes* (BV - volume di colonna occupato dalla resina) di etanolo acidificato con 0,5% v/v di HCl 0,1 N seguiti da altri 5 BV di una miscela 50/50 di etanolo e acqua demineralizzata con 0,5% v/v di HCl 0,1 N per la resina XAD16, mentre per la resina IRA958 in forma OH⁻ sono stati flussati 5 BV di una miscela 50/50 di acqua ed etanolo acidificato con HCl fino ad una concentrazione 1 M.

3.4 Analisi costi-benefici (CBA) e valutazione del ciclo di vita (Lyfe cycle assessment - LCA) di un processo di recupero di polifenoli

Per un'analisi costi-benefici e LCA di un processo di recupero di polifenoli (PC), è stato eseguito un dimensionamento preliminare su scala industriale (scale-up) del processo di adsorbimento/desorbimento, partendo dai dati ottenuti in precedenza dal gruppo di ricerca con prove di breakthrough di un letto impaccato di 1,8 m con resina XAD16, in quanto come resina era risultata essere quella avente le migliori prestazioni in termini di adsorbimento e desorbimento.

È stata eseguita la valutazione del ciclo di vita seguendo la procedura definita dallo standard ISO 14040¹³, che prevede:

- la definizione degli obiettivi e del campo d'applicazione, nella quale di definiscono in maniera unica lo scopo ed i confini del sistema;
- l'analisi di inventario del ciclo di vita, in cui vengono quantificati i flussi in ingresso ed in uscita dai confini del sistema definiti nella precedente fase;
- la valutazione degli impatti del ciclo di vita, in cui i dati della tabella di inventario vengono riferiti ad un numero ridotto di categorie di impatto;
- l'interpretazione dei dati, nella quale si utilizza una procedura sistematica di identificazione e controllo delle conclusioni tratte dall'analisi dell'inventario e della valutazione degli impatti;

utilizzando il software SimaPro 8.4.0 ed il database Ecoinvent 3.3. Sono stati impiegati e confrontati 4 metodi LCA (ILCD 2011 Midpoint+ V1.10, IPCC 2013 GWP 20a V1.03, Ecological Scarcity 2013 V1.05, Cumulative Energy Demand V1.09), utilizzando come unità funzionale il trattamento di 1 m³ di OMW.

L'analisi costi-benefici (CBA) è stata eseguita secondo le linee guida UE per la valutazione dei prodotti di investimento¹⁴. È stato assunto inizialmente che un'implementazione commerciale di successo della tecnologia proposta per il recupero dei PC richiede una prospettiva finanziaria positiva per il produttore di OMW. L'obiettivo della CBA è di determinare il prezzo minimo di mercato al quale i PC recuperati devono essere venduti, al fine di generare un ritorno positivo per il produttore di OMW: in particolare, il costo medio ponderato del capitale (WACC), rappresentato da media ponderata tra il tasso dei prestiti e il guadagno atteso dagli investitori, è stato selezionato come soglia chiave al fine di determinare una decisione di investimento positiva. Infatti, il produttore di OMW (l'investitore) deve ottenere del capitale per finanziare l'implementazione e il funzionamento dell'impianto di recupero di PC. Ciò significa che il costo del capitale - oltre alla potenziale sostenibilità finanziaria del progetto - determinerà la volontà dell'utente finale di investire nel progetto. Il costo del capitale di una società può essere determinato dal suo debito e dal suo patrimonio netto. Poiché il WACC dipende dalla struttura finanziaria della singola società, è difficile stabilire un WACC generalizzato che possa portare a una decisione di investimento positiva: il WACC richiesto è stato quindi definito al 6%, sulla base di esperienze pregresse del gruppo di ricerca nell'ambito di valutazione di decisioni di investimento positive per società agricole. LA CBA è riferita ad un periodo di 20 anni, assumendo un tasso di sconto al 4%. Il costo dell'attrezzatura dell'impianto (CAPEX) è stato determinato tramite il software SuperPro Designer, mentre i costi operazionali e di manutenzione (OPEX) sono stati determinati sulla base dell'inventario di processo e impiegando i costi standard per i reagenti, l'energia ed il lavoro in Europa sulla base del database Eurostat e dalle quotazioni per il prezzo dei reagenti chimici ottenuti dai due maggiori rivenditori. Il prezzo industriale della resina XAD16 è stato fissato dal venditore (DOW Chemicals). È stata applicata un'inflazione del 2% sui prezzi rispetto all'anno di riferimento. Non è stato considerato il costo relativo al trattamento dell'OMW defenolizzata in quanto si è considerato uguale a quello dell'OMW tal quale e pertanto risulterebbe in ogni caso un costo da sostenere per il produttore di OMW: tuttavia questa è un'assunzione cautelativa,

dal momento che è plausibile supporre che il prezzo di smaltimento sia minore per acque defenolizzate, visto che i polifenoli creano complicazioni durante trattamento biologico in impianto di depurazione ed i gestori devono sostenere delle spese per lo stoccaggio delle acque.

3.5 Allestimento prove di digestione anaerobica di acque defenolizzate

Le acque defenolizzate risultate dalle prove di adsorbimento su singola resina (IRA958 e XAD16) sono state caratterizzate ed impiegate per prove di digestione anaerobica: le prove sono state monitorate nel tempo sia nella loro componente liquida che nella componente gassosa. L'inoculo impiegato era *Pollina* e l'allestimento delle prove è stato fatto in modo da garantire che i solidi volatili derivanti dall'inoculo fossero pari a 20 g/L.

3.5.1 Acque defenolizzate con resina XAD16

In tre bottiglie Pyrex da 1 L sono stati aliquotati 253 mL di acque defenolizzate con XAD16 e 147 mL di inoculo, aggiungendo Na₂CO₃ solido fino a pH 8. Le bottiglie sono state poi flussate con azoto per rimuovere l'ossigeno e sono state successivamente chiuse con un tappo dotato di raccorderia per campionamento gas/liquido e porta GC. Le bottiglie sono state poi messe in incubatore termostato a 37°C ed in agitazione a 150 rpm.

3.5.2 Acque defenolizzate con resina IRA958

In tre bottiglie Pyrex da 1 L sono stati aliquotati 190 mL di acque defenolizzate con IRA958 e 110 mL di inoculo, aggiungendo HCl 5 M fino a pH 8. Le bottiglie sono state poi flussate con azoto per rimuovere l'ossigeno e sono state successivamente chiuse con un tappo dotato di raccorderia per campionamento gas/liquido e porta GC. Le bottiglie sono state poi messe in incubatore termostato a 37°C ed in agitazione a 150 rpm.

3.5.3 Bianchi

Per ognuna delle due prove, sono stati preparati tre microcosmi da 120 mL per il bianco, costituiti da 25 mL di acqua demineralizzata e 15 mL di inoculo, correggendo il pH e portandolo a neutralità. I microcosmi sono stati poi flussati in azoto per rimuovere l'ossigeno e chiusi con un tappo di gomma sormontato da una ghiera metallica. I microcosmi sono stati poi messi in incubatore termostato a 37°C ed in agitazione a 150 rpm.

3.6 Caratterizzazione prodotti ed allestimento prove potere batteriostatico

I desorbiti derivanti dalle prove di breakthrough delle resine singole e della resina mista sono stati caratterizzati; quelli relativi alle prove delle singole resine sono stati testati come potenziali inibitori batteriostatici.

Lo studio delle curve di crescita e del potere batteriostatico sono stati effettuati impiegando due ceppi batterici: *S. epidermidis* ATCC14990 (Gram+) e *E. coli* DH10B (Gram-) acquistati dalla DSMZ.

3.6.1 Risospensione acquosa del prodotto desorbito

Per poter impiegare il prodotto desorbito, sia da XAD16 che da IRA958, nelle prove di potere batteriostatico, è stato necessario procedere ad una risospensione acquosa del prodotto. Sono stati quindi rotavaporati 500 mL di desorbito, allontanando più etanolo possibile. Sono stati quindi aggiunti 250 mL di acqua demineralizzata ed è stato corretto il valore di pH fino a raggiungere la neutralità. I prodotti così ottenuti sono stati poi filtrati, sotto cappa sterile, con un filtro *VacuCap 90 Filter Unit 0,2 nm Supor Membrane* fornito dalla ditta Pall.

3.6.2 Preparazione brodo di coltura e piastre Petri

Il brodo di coltura impiegato per le curve di crescita e per le prove di potere batteriostatico era costituito da *Mueller-Hinton Broth* (MHB) 21g/L. Per la preparazione delle piastre Petri, è stato aggiunto, al brodo di coltura, Agar-Agar fino ad avere una concentrazione pari a 17 g/L. Sia il brodo che la soluzione per le piastre Petri sono state sterilizzate in autoclave per 20 minuti a 120°C. Sotto cappa sterile sono stati posti 30-40 mL di soluzione in ogni Petri lasciandole poi raffreddare.

3.6.3 Curve di crescita

Sotto cappa sterile, sono stati aliquotati in una beuta 50 mL di MHB 21 g/L e, con un'ansa sterile, sono state prelevate diverse colonie singole di *E. coli* dallo striscio su piastra e sono state quindi risospese nel liquido. È stata infine la beuta, chiusa con l'apposito tappo di garza/cotone, in un incubatore agitato a 150rpm e termostatato a 37°C. Ogni ora è stata trasferita sotto cappa sterile la beuta con la cultura liquida e ne è stato prelevato 1 mL trasferendolo in una cuvetta per spettrofotometro, andando poi a leggere la densità ottica (OD) a 600 nm impiegando uno spettrofotometro a doppio raggio *Shimadzu UV-Vis UV-1601*. Come bianco è stato utilizzato MHB 21g/L sterile non inoculato. Un aumento drastico e repentino dell'OD significa che la coltura è entrata in

fase esponenziale di crescita e quindi ogni ora, oltre alla misura dell'OD, è stato effettuato anche un prelievo di coltura liquida per la preparazione di diverse diluizioni e la piastratura per la conta delle unità formanti colonia (CFU); sopra un'assorbanza di 0,4 è stata effettuata un'opportuna diluizione ed è stato riportato l'OD tenendo conto della diluizione effettuata.

Per ogni campionamento di liquido da piastrare sono state preparate 8 diluizioni in maniera seriale da 10^{-1} a 10^{-8} . Successivamente sono stati depositati 100 μ L delle 5 diluizioni da 10^{-4} a 10^{-8} in altrettante piastre Petri con il terreno di crescita ed utilizzando una spatola sterile sono stati dispersi e diffusi su tutta la piastra in modo più omogeneo possibile. Per ogni diluizione piastrata è stato effettuato un triplicato. Asciugato il liquido sulla piastra, questa è stata spostata la piastra in un incubatore a 37°C. Questa procedura è stata ripetuta per almeno 4-5 punti nel corso della crescita. Dopo 24-48 ore di crescita su piastre Petri è stata effettuata la conta delle CFU. La procedura sopra descritta è stata impiegata in maniera analoga per la crescita e la conta di *S. epidermidis*.

3.6.4 Prove per potere batteriostatico e determinazione del MIC

Per la prova di potere batteriostatico è stato adattato un protocollo per la determinazione della Concentrazione inibitoria minima (*MIC – Minimal inhibitory concentration*) per sostanze antimicrobiche¹⁵. È stata preparata una soluzione concentrata di MHB e Agar-Agar rispettivamente 35 g/L e 28 g/L ed è stata sterilizzata in autoclave per 20 minuti a 120°C. Dopo il ciclo in autoclave la soluzione è lasciata raffreddare, avendo cura di evitare la gelificazione, e in diverse falcon da 50 mL, lavorando sotto cappa sterile, sono stati miscelati 24 mL della soluzione concentrata di MHB e Agar-Agar con 16 mL di una soluzione opportunamente diluita del prodotto desorbito risospeso in acqua da XAD16 e IRA958, così da avere una concentrazione finale di MHB e Agar-Agar rispettivamente di 21 g/L e 17 g/L. Sono stati testati i seguenti range di concentrazioni finali su piastra di polifenoli da Test Folin: 4,18- 0,50 g/L per il prodotto da XAD16 e 1,46-0,10 g/L per il prodotto da IRA958. Sono state inoltre preparate alcune piastre Petri miscelando 24 mL della soluzione concentrata di MHB e Agar-Agar con 16 mL di una soluzione opportunamente diluita di Imidazolidinil urea, un prodotto già in uso nella cosmetica. Le concentrazioni finali su piastra di Imidazolidinil urea testate erano comprese in un range 2,50-1,00 g/L.

Sotto cappa sterile, sono stati aliquotati in due beute 20 mL di MHB 21 g/L ciascuna e,

con un'ansa sterile, sono state prelevate 3-4 colonie singole di *E. coli* dallo striscio su piastra che sono state risospese nella prima beuta; analogamente è stato fatto con la seconda beuta con 3-4 colonie di *S. epidermidis*. Le beute si sono infine poste, chiuse con un apposito tappo di garza/cotone, in un incubatore agitato a 150rpm e termostato a 37°C. Dopo 8 ore di crescita sono state trasferite sotto cappa sterile le beute con le culture liquide e se ne sono prelevate, per ognuna, un'aliquota. Questa è stata opportunamente diluita con MHB 21 g/L sterile non inoculato e trasferita in una cuvetta per spettrofotometro, andando a leggere la densità ottica (OD) a 625 nm impiegando uno spettrofotometro a doppio raggio *Shimadzu UV-Vis UV-1601*, affinché l'assorbanza letta fosse attorno a 0,08-0,13 per *E. coli* e 0,13-0,20 per *S. epidermidis*: questo è indice di una concentrazione microbica in soluzione pari a $1 \cdot 10^8$ CFU/mL. Come bianco è stato utilizzato MHB 21g/L sterile non inoculato. Le due culture diluite sono poi state diluite ulteriormente 100 volte. La diluizione 1 a 100 è stata impiegata per fare 3 spot da 10 µL, per ognuna dei due ceppi, sulle piastre Petri preparate con i prodotti desorbiti ed il batteriostatico cosmetico: ogni spot ha quindi una concentrazione microbica pari a $1 \cdot 10^4$ CFU/mL. Per verificare la concentrazione degli *spot*, sono state preparate per ognuno dei ceppi, partendo dalla soluzione corretta rispetto all'assorbanza, 8 diluizioni in maniera seriale da 10^{-1} a 10^{-8} . Successivamente sono stati depositati 100 µL delle 5 diluizioni da 10^{-4} a 10^{-8} in altrettante piastre Petri con il terreno di crescita ed utilizzando una spatola sterile sono stati dispersi e diffusi su tutta la piastra in modo più omogeneo possibile. Per ogni diluizione piastrata è stato effettuato un triplicato. Asciugato il liquido sulla piastra, questa è stata spostata la piastra in un incubatore a 37°C. Dopo 24 ore sono state verificate le piastre per la determinazione del MIC e quelle per la conta microbica di controllo.

3.7 Reagenti e resine

Tutti i reagenti impiegati, tranne dove diversamente indicato, sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich. La resina XAD16 e la resina IRA958 sono state fornite da Dow Chemicals. La resina XAD16 è una resina neutra con una matrice macroporosa di copolimero stirene-divinilbenzene, mentre la resina IRA958 è un polimero acrilico reticolato con gruppi ammonio quaternari.

4 DESCRIZIONE TECNICHE ANALITICHE

4.1 Determinazione dei solidi volatili e solidi totali

I solidi volatili e totali sono stati determinati attraverso la seguente tecnica: il campione è stato posto all'interno di un crogiuolo, annotando preventivamente la tara, ed è stato pesato. Il crogiuolo è poi posto in stufa a 105°C per una notte e pesato la mattina seguente, ottenendo il dato dei solidi totali (ST). Il crogiuolo è stato poi posto in muffola a 600°C per un'ora e le ceneri rimaste vengono nuovamente pesate. La differenza tra il peso dei solidi totali e quello delle ceneri ha restituito il dato dei solidi volatili (SV).

4.2 Misura della produzione di biogas

La misura del biogas è stata effettuata in due modi differenti: per la misura della produzione dei bianchi è stata impiegata una semplice siringa per gas e si è effettuata la misura forando il tappo del microcosmo e lasciando che il gas riempisse la siringa annotando il volume occupato; per la misura della produzione delle digestioni è invece stato impiegato il Sistema Mariotte (Figura 4). In questo caso il dato sul volume di biogas prodotto è pari al volume di acqua spostato nel cilindro.

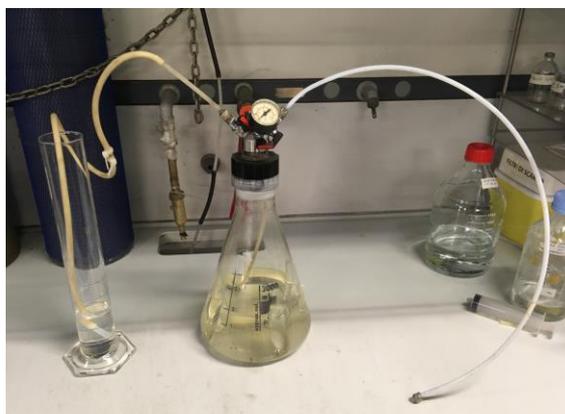


Figura 4 – Sistema Mariotte

4.3 Analisi della composizione del biogas

Il biogas prodotto è stato analizzato mediante gascromatografia (GC). I campionamenti sono stati effettuati con una siringa in vetro “Hamilton-bonaduz.schweiz-GASTIGHT@#1750” da 500 µl con ago “side port” della “SUPELCO”, iniettando nel gascromatografo “Agilent Technologies 5890 SERIES II Plus” 200 µl di gas prelevati dallo spazio di testa del bioreattore. Il GC era equipaggiato con la colonna capillare a setacci molecolari di carbonio “1010 plot carboxen” avente una lunghezza di 30 m ed un diametro di 0,53 mm e mantenuta ad una temperatura di 150°C. La fase mobile impiegata

era composta da azoto molecolare ed il detector era un rivelatore a conducibilità termica (TCD). I componenti analizzati, in ordine di tempi di ritenzione crescenti, sono stati H₂, O₂, CH₄ e CO₂.

4.4 Pretrattamento campioni liquidi

I campioni liquidi, prima di essere impiegati per analisi colorimetriche o strumentali, sono stati preventivamente centrifugati a 14000 rpm per 10 minuti nella centrifuga “*ThermoScientific SL16R*”. I surnatanti sono stati recuperati ed impiegati per le opportune diluizioni in acqua demineralizzata. I campioni diluiti sono stati poi filtrati con filtri “*Millex - Millipore® - GV*” in PVDF, aventi una porosità di 0,22 µm.

4.5 Misura della concentrazione dei polifenoli

La concentrazione di polifenoli è stata determinata sia mediante HPLC che mediante il metodo colorimetrico di Folin-Ciocalteu (FC).

Metodo HPLC

In una vial per HPLC sono stati posti 350 µL di campione, opportunamente diluito e filtrato in precedenza. Lo strumento impiegato per le analisi era un “*Agilent 1260 Infinity*” con rivelatore UV-Vis (*Jasco 875 UV-VIS*) su cui è stata montata una colonna bifenilica *Kinetex 2.6 µm 100A Phenomenex*. La fase mobile era composta da una fase A (Soluzione all’1% di Acido ortofosforico) e da una fase B (Acetonitrile). Il flusso della fase mobile è stato fissato a 1mL/min e nel tempo è stata variata la composizione della fase mobile come indicato in figura (Figura 5). La rivelazione è stata effettuata a 264 nm. Lo standard di riferimento era l’Acido gallico.

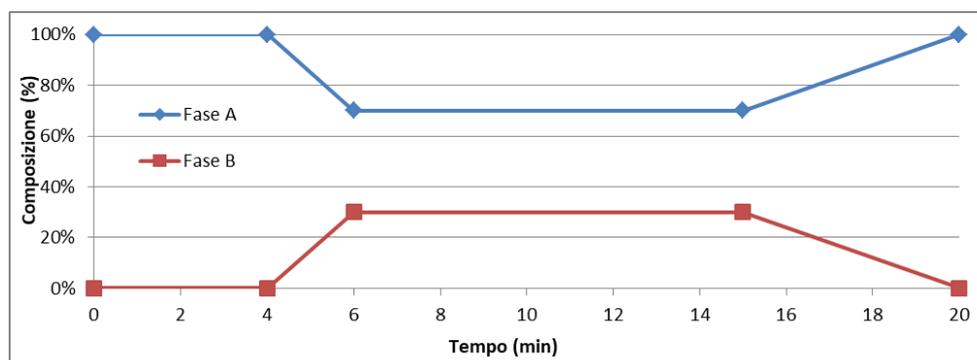


Figura 5 – Programmata composizione fase del metodo HPLC per polifenoli

Metodo di Folin-Ciocalteu

In una eppendorf da 2 mL sono stati aliquotati 912 μL di acqua demineralizzata e 20 μL di campione, opportunamente diluito e filtrato in precedenza. Sono stati poi addizionati 100 μL di Reattivo di Folin-Ciocalteu e l'eppendorf è stata vortexata adeguatamente. Passati 5 minuti e sono stati addizionati 300 μL di carbonato di sodio al 20% w/v, vortexando nuovamente. Dopo due ore di incubazione al buio a 35°C, è stata condotta una lettura spettrofotometrica a 765 nm tramite lo spettrofotometro a doppio raggio *Shimadzu UV-Vis UV-1601*. Il bianco è stato preparato analogamente ai campioni, impiegando però 20 μL di acqua demineralizzata. Lo standard di riferimento era l'Acido gallico.

4.5 Misura della concentrazione degli Acidi Grassi Volatili (VFA)

La concentrazione degli Acidi Grassi Volatili (VFA) è stata determinata mediante HPLC. Sono stati aliquotati 350 μL di campione, opportunamente diluito e filtrato in precedenza, in una vial per HPLC. Lo strumento impiegato per le analisi era uno “*Shimadzu*” con rivelatore ad indice di rifrazione su cui è stata montata una colonna “*COREGEL 87H3*” della “*TRANSGENOMIC*” che permette di separare acidi organici in funzione del rapporto massa/carica. La fase mobile era una soluzione acquosa di Acido Solforico 0,012 N. Il flusso della fase mobile è stato fissato a 0,6 mL/min ed esso è stato variato nel corso dell'analisi secondo la programmata mostrata in figura (Figura 6).

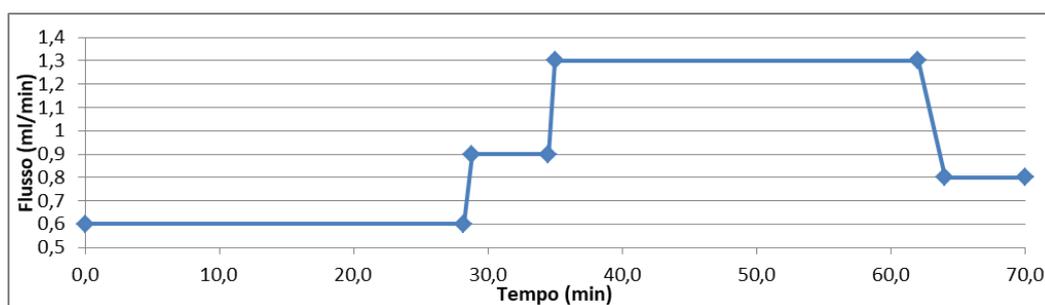


Figura 6 – Programmata del flusso del metodo HPLC per VFA

Il volume iniettato in colonna è stato pari a 10 μL e la colonna era tenuta termostata a 40°C. I composti calibrati erano, in ordine di ritenzione crescente, Acido Acetico, Acido Propionico, Acido Isobutirrico, Acido Butirrico, Acido Isovalerico, Acido Valerico, Acido Isocaproico, Acido Caproico ed Acido Eptanoico. Lo standard di riferimento era una miscela di Acido Acetico e Propionico. Ai fini del lavoro di tesi è stata considerata la concentrazione complessiva degli acidi grassi volatili.

4.6 Misura del potere antiossidante

La capacità antiossidante è stata determinata tramite il saggio di decolorazione dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS) impiegando uno spettrofotometro a doppio raggio *Shimadzu UV-Vis UV-1601*. La soluzione madre di ABTS 7 mM è stata preparata dissolvendo l'ABTS in $K_2S_2O_7$ 2mM e lasciando la soluzione a temperatura ambiente al buio per una notte. Il medesimo giorno del test è stata preparata la soluzione di lavoro di ABTS, diluendolo con acqua demineralizzata fino ad un valore di assorbanza di $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. In una eppendorf sono stati aliquotati 1 mL di soluzione di lavoro di ABTS e 10 μ L di campione opportunamente filtrato e diluito, lasciando reagire per 30 minuti a 30°C al buio. L'assorbanza del campione è stata letta a 734 nm contro un bianco costituito da acqua demineralizzata. Lo standard di riferimento era l'acido ascorbico e la relativa retta di taratura viene impiegata per trasformare il valore di assorbanza del campione in microgrammi di acido ascorbico equivalente. Per calcolare il potere antiossidante del campione, espresso in microgrammi di acido ascorbico equivalente su microlitri di campione, è stata usata la seguente espressione:

$$\text{Potere Antiossidante} \left(\frac{\mu\text{g eq. ac. ascorbico}}{\mu\text{L campione}} \right) \\ = \frac{\mu\text{g eq. Acido ascorbico del campione} \times \text{fattore di diluizione campione}}{\text{Volume di campione diluito aggiunto a 1mL di ABTS WS} (\mu\text{L campione})}$$

Il potere antiossidante può poi essere espresso sia in funzione dei solidi volatili ($\frac{g_{Ac.Asorbico eq.}}{g_{SV}}$) che in termini di capacità antiossidante specifica riferita alla massa dei polifenoli ($\frac{g_{Ac.Asorbico eq.}}{g_{PC}}$).

4.7 Misura della concentrazione proteica

La misura delle proteine totali è stata eseguita tramite il metodo colorimetrico di Bradford. Sono stati aliquotati in un'eppendorf 2 mL di reattivo di Bradford e 67 μ L di campione opportunamente diluito e filtrato. Dopo 10 minuti di reazione al buio a 4°C, è stata successivamente letta l'assorbanza a 595 nm impiegando uno spettrofotometro a doppio raggio *Shimadzu UV-Vis UV-1601*. Il bianco è stato preparato analogamente ai campioni, impiegando però 67 μ L di acqua demineralizzata. Lo standard di riferimento era la proteina BSA (Albumina di Siero Bovino).

4.8 Misura della Domanda Chimica di Ossigeno

La determinazione della Domanda Chimica di Ossigeno (COD) è stata effettuata mediante il kit *Hach LCI 400*. Sono stati aliquotati 2 mL del campione diluito e filtrato nella vial del kit, dove è avvenuta la reazione con il dicromato di potassio, in soluzione di acido solforico, con solfato di argento quale catalizzatore e solfato di mercurio come agente mascherante per i cloruri. La vial infine è stata riposta per 120 minuti a 150°C nel termoreattore preriscaldato *Eco16 Velp Scientifica*. Il bianco è stato preparato analogamente ai campioni, impiegando però 2 mL di acqua demineralizzata. Dopo un certo tempo, necessario per il raffreddamento dei campioni ad almeno 60°C, il valore di assorbanza e concentrazione è stato letto allo spettrofotometro UV-Vis *Hach Lange DR2800*. Lo standard di riferimento era una soluzione di glucosio.

4.9 Misura dell'Azoto-Ammoniacale

La quantificazione dell'Azoto-Ammoniacale (N-NH₄) è stata determinata tramite il kit *Hach LCK 305*. Sono stati aliquotati 0,5 mL del campione diluito e filtrato nella vial del kit, dove gli ioni ammonio reagiscono, a pH 12,6, con ioni ipoclorito e salicilato dando il blu indofenolo, in presenza di nitroprussiato sodico come catalizzatore. Dopo 15 minuti dall'inizio della reazione è stato letto il valore di assorbanza e concentrazione allo spettrofotometro UV-Vis *Hach Lange DR2800*.

4.10 Misura degli zuccheri riducenti

Gli zuccheri riducenti sono stati determinati tramite metodo colorimetrico: sono stati aliquotati 100 µL di campione diluito e filtrato in un'epENDORF e sono stati aggiunti 100 µL di acqua demineralizzata e 100 µL di acido 3,5-dinitrosalicilico (ADNS). Sono poi stati messi a bollire per 15 minuti a cui è seguito raffreddamento in bagno di acqua e ghiaccio fino a temperatura ambiente. Sono stati aggiunti quindi 900 µL di acqua demineralizzata e è stato letto il valore di assorbanza a 540 nm, tramite lo spettrofotometro a doppio raggio *Shimadzu UV-Vis UV-1601*. Il bianco è stato preparato analogamente ai campioni, impiegando però 100 µL di acqua demineralizzata. Lo standard di riferimento era il glucosio. La soluzione di ADNS è stata preparata miscelando 20 mL di una soluzione acquosa di ADNS 96 mM con 8 mL di una soluzione di sodio potassio tartrato 5,3 M in NaOH 2 M, portando poi a volume in un matraccio da 40 mL.

4.11 Misura della Domanda Biochimica di Ossigeno

La determinazione della Domanda Biochimica di Ossigeno (BOD_5) è stata effettuata da un laboratorio esterno (Felsilab) con il metodo respirometrico, impiegando il sistema commerciale OxiTop IS 6 della ditta WTW.

5 RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Isotherme di adsorbimento

La costruzione e l'andamento delle isoterme di adsorbimento rappresenta una fase preliminare necessaria prima di arrivare al processo in colonna, in quanto è possibile avere una prima stima sulla capacità e la resa di adsorbimento di una resina. Questa fase è stata preceduta, in precedenti lavori¹⁰, da una selezione del pH ottimale a cui condurre la prova della resina neutra XAD16 e della resina a scambio ionico IRA958 in forma OH⁻ (Figura 7).

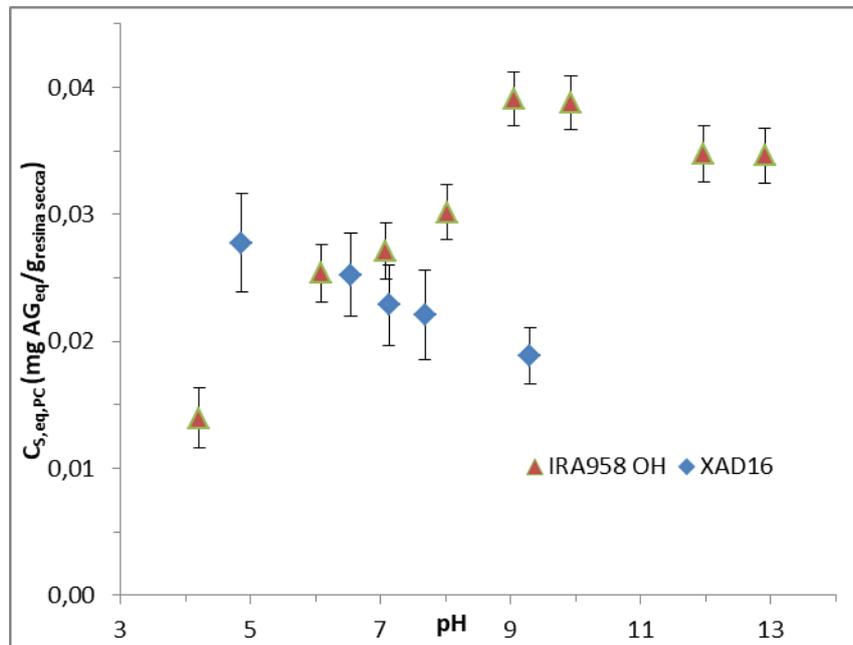


Figura 7 – Variazione concentrazione di PC adsorbiti sulla resina in funzione del pH, per la resina XAD16 e la resina IRA958

Le isoterme di adsorbimento, effettuate a 22°C, sono state studiate per la resina neutra XAD16 (Figura 8) e per la resina a scambio ionico IRA958 in forma OH⁻ (Figura 9) e sono state valutate in termini di polifenoli (PC, espresso in milligrammi di acido gallico equivalente per litro) e di domanda chimica di ossigeno (COD, espresso in grammi di ossigeno per litro).

Resina XAD16

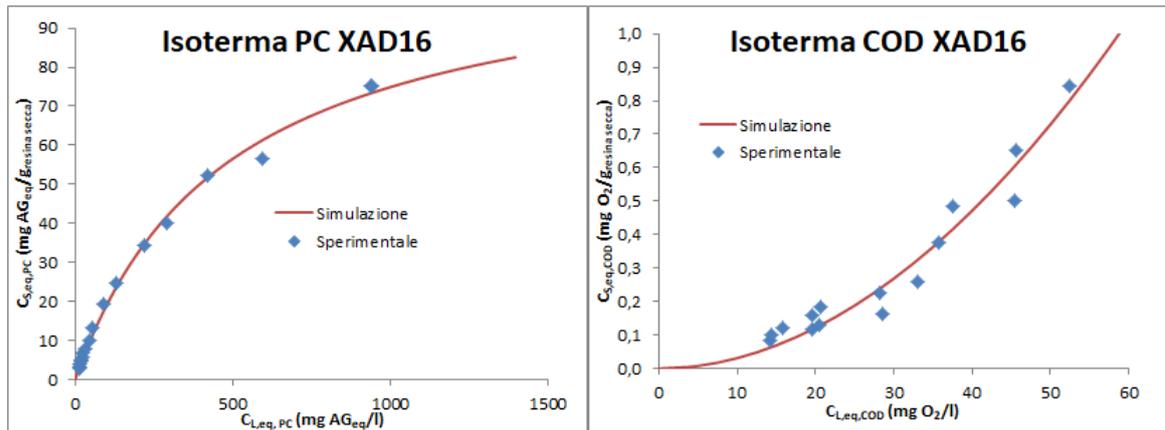


Figura 8 – Isotherme di adsorbimento sperimentali per la resina XAD16 e relative simulazioni (a sinistra in termini di PC, a destra in termini di COD)

Il dato sperimentale per l'adsorbimento di PC (Figura 8 a sinistra) per la resina XAD16 è risultata essere un'isoterma favorevole che normalmente è descritta dal modello di Langmuir, equivalente ad un ricoprimento monostrato (*monolayer*) della superficie. La relativa simulazione presente, descritta dall'equazione $C_{S,eq,PC} = \frac{111 \cdot C_{L,eq,PC}}{\frac{1}{0,0021} + C_{L,eq,PC}}$, dove i parametri simulati 111 e 0,0021 sono rispettivamente $C_{S,PC}^{\infty}$, ossia la quantità massima di PC adsorbiti per massa di resina secca, e $K_{eq,PC}$, ossia la costante legata all'affinità dei siti di legame con i PC, se confrontata con i dati sperimentali risulta avere un coefficiente di correlazione R^2 pari a 0,996.

Il dato sperimentale per l'adsorbimento di COD (Figura 8 a destra) per la resina XAD16 è risultata essere un'isoterma sfavorevole descritta dal modello di Freundlich. In questo caso Langmuir non è applicabile perché ha la curvatura verso l'alto. La relativa simulazione presente, descritta dall'equazione $C_{S,eq,COD} = 3,5 \cdot 10^{-4} \cdot C_{L,eq,COD}^{\frac{1}{0,51}}$, dove i parametri simulati $3,5 \cdot 10^{-4}$ e $\frac{1}{0,51}$ sono rispettivamente $K_{F,COD}$, ossia la capacità di

adsorbimento, e $\frac{1}{n_{COD}}$, ossia l'intensità di adsorbimento, se confrontata con i dati sperimentali risulta avere un coefficiente di correlazione R^2 pari a 0,940.

Resina IRA958

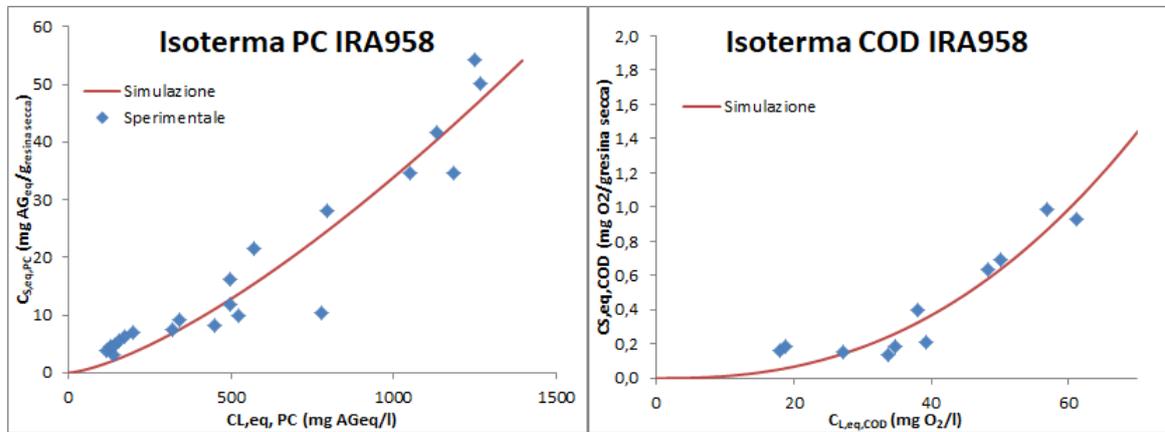


Figura 9 - Isotherme di adsorbimento sperimentali per la resina IRA958 e relative simulazioni (a sinistra in termini di PC, a destra in termini di COD)

Il dato sperimentale per l'adsorbimento di PC (Figura 9 a sinistra) per la resina IRA958 è risultata essere un'isoterma leggermente sfavorevole, quasi lineare, descritta dal modello di Freundlich. La relativa simulazione presente, descritta dall'equazione $C_{S,eq,PC} = 2,1 \cdot 10^{-3} \cdot C_{L,eq,PC}^{\frac{1}{0,71}}$, dove i parametri simulati $2,1 \cdot 10^{-3}$ e $\frac{1}{0,71}$ sono rispettivamente $K_{F,PC}$, ossia la capacità di adsorbimento, e $\frac{1}{n_{PC}}$, ossia l'intensità di adsorbimento, se confrontata con i dati sperimentali risulta avere un coefficiente di correlazione R^2 pari a 0,902.

Il dato sperimentale per l'adsorbimento di COD (Figura 9 a destra) per la resina IRA958 è risultata essere un'isoterma sfavorevole descritta dal modello di Freundlich. La relativa simulazione presente, descritta dall'equazione $C_{S,eq,COD} = 4,6 \cdot 10^{-5} \cdot C_{L,eq,COD}^{\frac{1}{0,41}}$, dove i parametri simulati $4,6 \cdot 10^{-5}$ e $\frac{1}{0,41}$ sono rispettivamente $K_{F,COD}$, ossia la capacità di adsorbimento, e $\frac{1}{n_{COD}}$, ossia l'intensità di adsorbimento, se confrontata con i dati sperimentali risulta avere un coefficiente di correlazione R^2 pari a 0,908.

Ottenute le isoterme è stato quindi possibile stimare le concentrazioni adsorbite in termini di polifenoli e COD e la purezza del prodotto adsorbito (Tabella 2) e confrontare l'andamento delle isoterme (Figura 10).

Resina	Costo	Concentrazioni adsorbite in equilibrio con l'OMW		Purezza del prodotto adsorbito	
	€/L	PC	COD	g_{PC}/g_{COD}	g_{PC}/g_{SV}
		$mg_{PC}/g_{resina\ secca}$	$g_{O_2}/g_{resina\ secca}$		
XAD16	31	81 ± 7	$1,2 \pm 1,7$	$0,07 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,16$
IRA958OH	8	48 ± 15	$1,2 \pm 0,4$	$0,04 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,05$

Tabella 2 - Dati ottenuti dalle isoterme di adsorbimento e costo delle resine

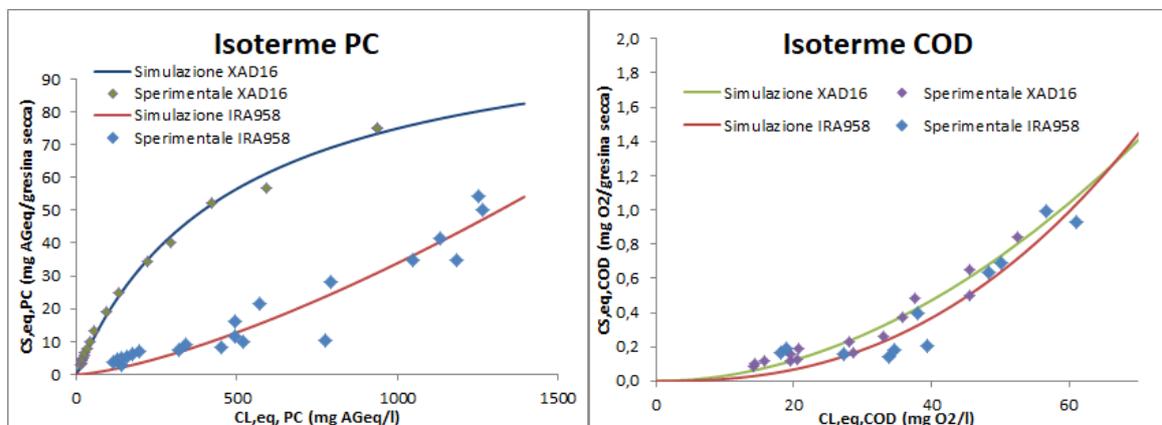


Figura 10 – Confronto tra le isoterme di adsorbimento e relative simulazioni delle resine IRA958 e XAD16 (a destra in termini di PC, a sinistra in termini di COD)

Le isoterme di adsorbimento ottenute hanno permesso un raffronto tra le diverse resine. Sia dai dati (Tabella 2) che dalle isoterme (Figura 10) la resina XAD16 rispetto all'IRA958 risulta sicuramente più performante come capacità di adsorbimento dei polifenoli, mentre a livello di contenuto in COD sono molto simili. Tuttavia, se si va a verificare la purezza del prodotto adsorbito, si può constatare come la differenza sia minima ed anche se la resina IRA958 risulta essere leggermente inferiore, va tenuta in considerazione in quanto ha un prezzo di vendita nettamente inferiore a quello della XAD16 di circa quattro volte.

5.2 Prove di adsorbimento in semi-continuo

La valutazione di un processo di adsorbimento è legata al risultato della curva di breakthrough, definita come l'andamento in funzione del tempo del rapporto tra la concentrazione del liquido in uscita da una colonna di adsorbimento e quella in entrata. In un sistema ideale (flusso a pistone), questa dovrebbe presentare un gradino in

corrispondenza della saturazione della colonna, passando da una concentrazione in uscita nulla ad una pari a quella dell'alimentazione. Questo effetto di "rallentamento" del fronte del soluto (Figura 11) si può quantificare come un *fattore di ritardo* che dipende dalla forza dell'adsorbimento, ovvero dalla costante di equilibrio locale dell'adsorbimento ($K_{eq} = C_S/C_L$).

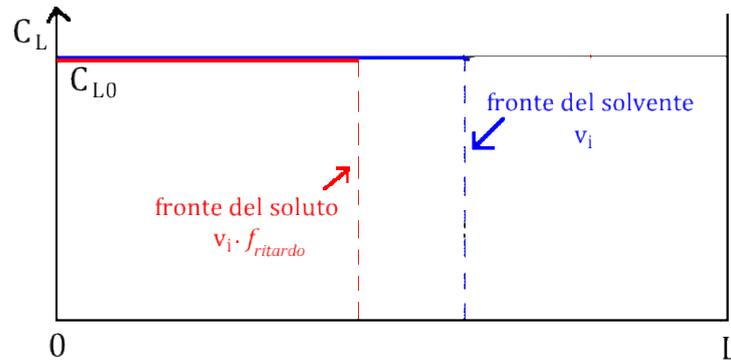


Figura 11 - Profili del fronte del solvente e del profilo del fronte ideale del soluto

Tramite un bilancio di materia integrale (nel volume e nel tempo) è possibile calcolare il tempo che impiegherebbe il fronte del soluto, così ritardato rispetto al fronte del solvente, per arrivare in fondo al letto adsorbente, arrivando dopo una serie di passaggi ad una stima del fattore di ritardo:

$$f_{ritardo} = 1 + K_{eq} \cdot \frac{\rho_{bulk}}{\varepsilon}$$

con $\rho_{bulk} = W/V_{letto}$ (densità di bulk), $\varepsilon = V_L/V_{letto}$ (porosità del letto).

Infine, si può utilizzare il fattore di ritardo per esprimere la dipendenza del comportamento del soluto rispetto a quello del solvente ovvero:

$$\frac{t^*}{\tau} = \frac{v_{solvente}}{v_{soluto}} = f_{ritardo} \cong K_{eq} \cdot \frac{\rho_{bulk}}{\varepsilon}$$

dove $\tau = V_L/Q$ (tempo di permanenza del solvente).

In un sistema reale questo si traduce in un fronte del liquido non a gradino ma "inclinato" (forma sigmoideale, vedi figura 12 a sinistra) a causa delle non idealità del sistema e dove pertanto possono esserci fenomeni di miscelamento e di trasporto di materia (*Mass transfer zone* – MTZ). Ciò poi si ripercuote sull'andamento della concentrazione in uscita rispetto al tempo (figura 12 a destra).¹⁶

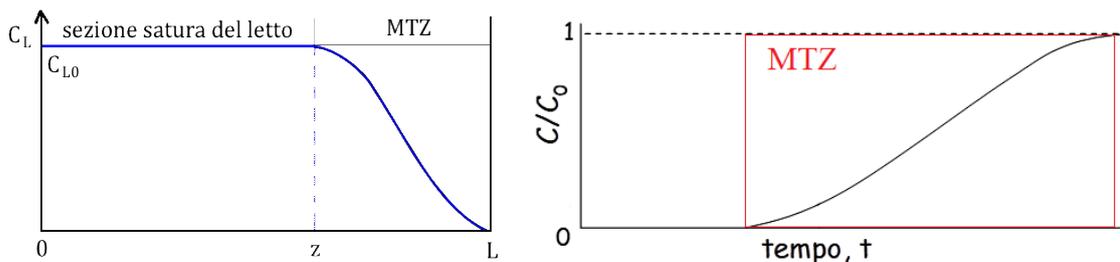


Figura 12 – Andamento MTZ lungo il letto di resina (a sinistra) e nel tempo (a destra) in funzione della concentrazione nel liquido

5.2.1 Prove di breakthrough su singole resine

Le seguenti prove di breakthrough, anche se condotte in condizioni non ottimizzate, sono servite per:

1. ottenere acque defenolizzate su cui condurre le digestioni anaerobiche;
2. ottenere prodotti desorbiti ricchi in polifenoli e caratterizzarli,
3. testare e standardizzare le procedure di adsorbimento/desorbimento, per applicarle poi allo studio di LCA-CBA (valutazione dell’impatto del ciclo di vita ed analisi costi-benefici),
4. ottenere dati preliminari per una simulazione mediante un modello fluidodinamico con trasporto di materia ed un’applicazione del modello per prevedere il comportamento di una colonna di adsorbimento con resina mista (vedi 5.2.2) e la relativa ottimizzazione in simulazione.

In figura (Figura 13) è riportata la curva di breakthrough effettuata con la resina XAD16

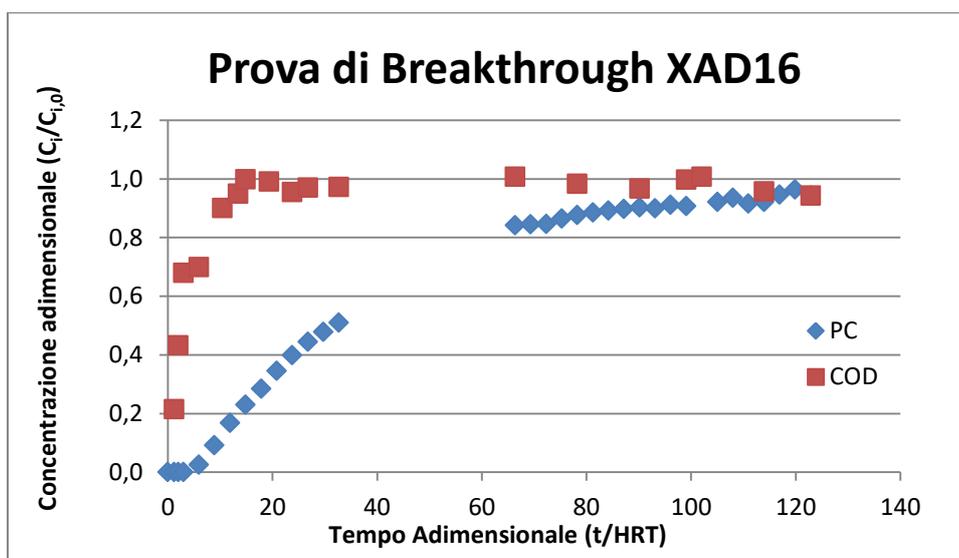


Figura 13 – Curva di breakthrough della resina XAD16

$H_{colonna} = 1.00$ m; HRT (tempo di permanenza idraulica) = 0,34 h; vs (velocità superficiale) = 2,30 m/h

In tabella 3 sono riportati i dati relativi alle prove di adsorbimento e desorbimento in colonna delle singole resine e della prova a resina mista.

		Resina singola		Resina Mista		
		XAD16	IRA958OH	IRA958OH	XAD16	IRA+XAD
Efficienza uso resina al Breakpoint ($C_{PC,out}=20\%C_{PC,in}$) η	adim	0,30±0,02	0,10±0,01	0,30±0,02	0,19±0,02	0,23±0,03
Efficienza uso resina al Breakpoint intermedio ($C_{PC,out IRA958}=20\%C_{PC,in}$) η_{int}	adim	-	-	0,08±0,01	-	-
Resa adsorbimento PC al breakpoint ($Y_{ads,PC}$)	adim	0,93±0,08	0,96±0,08	0,47±0,04	0,19±0,02	0,92±0,02
Resa adsorbimento PC al breakpoint intermedio ($Y_{ads,PC int}$)	adim	-	-	0,89±0,07	-	-
Resa desorbimento PC ($Y_{des,PC}$)	adim	0,87±0,05	0,95±0,05	0,98±0,06	0,95±0,04	-

Tabella 3 - Dati di prestazione delle prove di adsorbimento e desorbimento delle prove con singola resina e della prova a resina mista

In figura (Figura 14) è riportata la prova di desorbimento della resina XAD16.

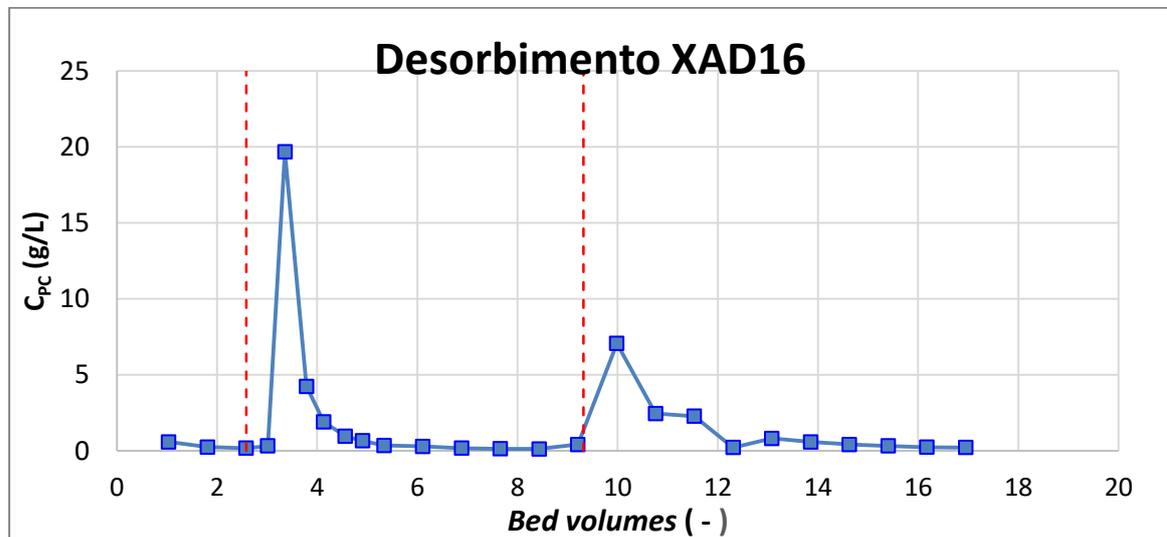


Figura 14 – Desorbimento della resina XAD16: concentrazione di PC desorbiti in funzione dei *bed volumes* flussati

La prova di desorbimento (Figura 14) è stata condotta con 2 diversi solventi, messi a punto in attività precedenti. Sono stati flussati circa 3 *bed volumes* di acqua demineralizzata (BV - volume di colonna occupato dalla resina). Successivamente si sono flussati 5 *bed volumes* di etanolo acidificato con 0,5% v/v di HCl 0,1 N (pH 3,3) seguiti

da 10 BV di una miscela 50/50 di etanolo acidificato (pH 3,3) e acqua demineralizzata. La resa di desorbimento dei composti fenolici è risultata essere dell'87% (Tabella 3).

In figura (Figura 15) è riportata la curva di breakthrough effettuata con la resina IRA958

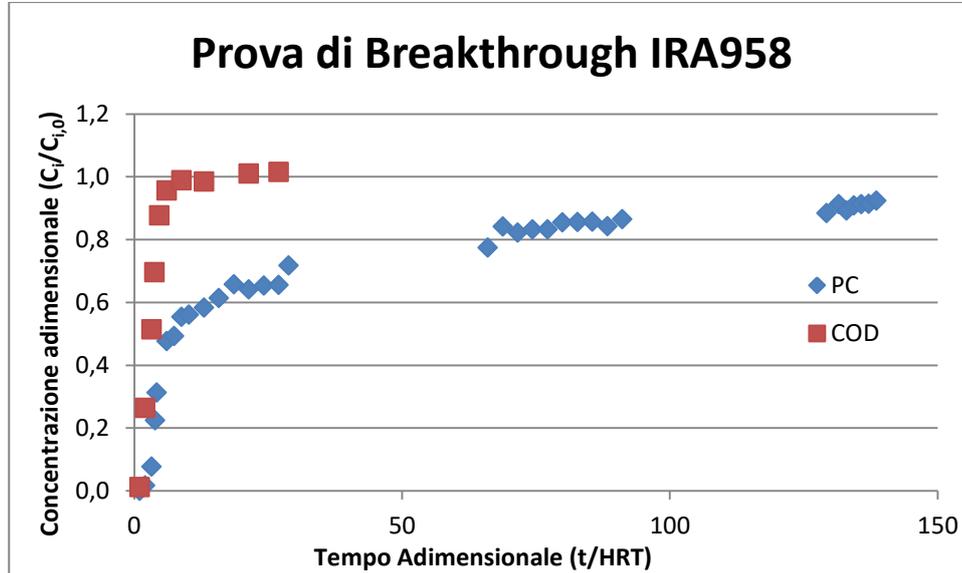


Figura 15 – Curva di breakthrough della resina IRA958OH
 $H_{colonna} = 1,00$ m; HRT (tempo di permanenza idraulica) = 0,36 h; vs (velocità superficiale) = 1,47 m/h

In figura (Figura 16) è riportata la prova di desorbimento della resina IRA958

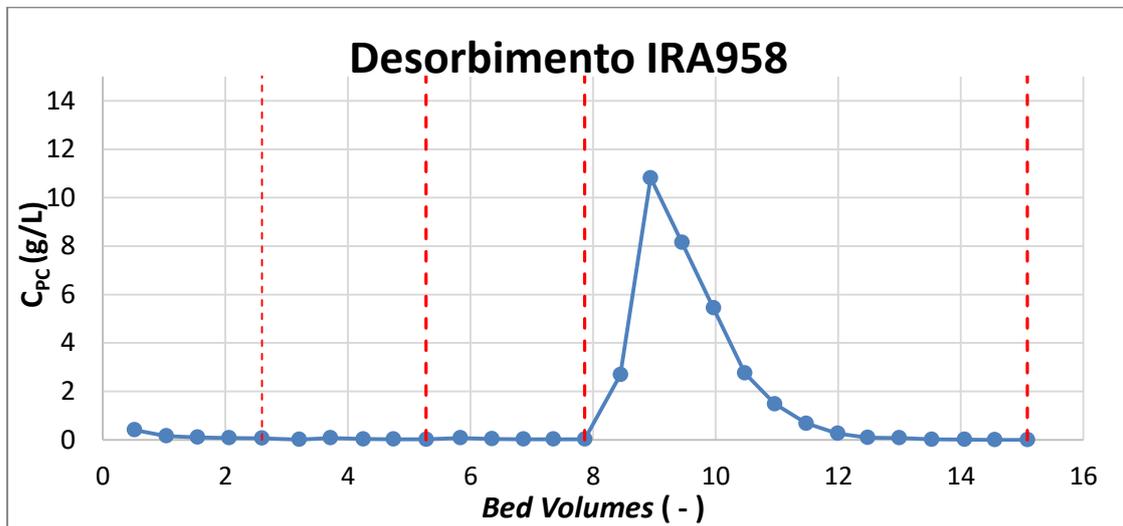


Figura 16 - Desorbimento della resina IRA958: concentrazione di PC desorbiti in funzione dei bed volumes flussati

La prova di desorbimento (Figura 16) è stata condotta con diversi solventi per verificare se fosse possibile ottenere un desorbimento frazionato dei fenoli e del resto della sostanza organica co-adsorbita. Per il desorbimento prima sono stati flussati circa 3 bed volumes

(BV) di acqua demineralizzata, poi 2 BV di etanolo e 2 BV di acqua a pH 9. Infine sono stati flussati 7 BV di una miscela 50/50 di acqua ed etanolo acidificato con HCl fino ad una concentrazione 2 M. Quest'ultima soluzione, che era stata identificata come solvente di eluizione in attività sperimentali precedenti, si è confermata l'unica soluzione in grado di desorbire i fenoli e il resto della sostanza organica. La resa di desorbimento dei polifenoli è risultata essere dell'95% (Tabella 3).

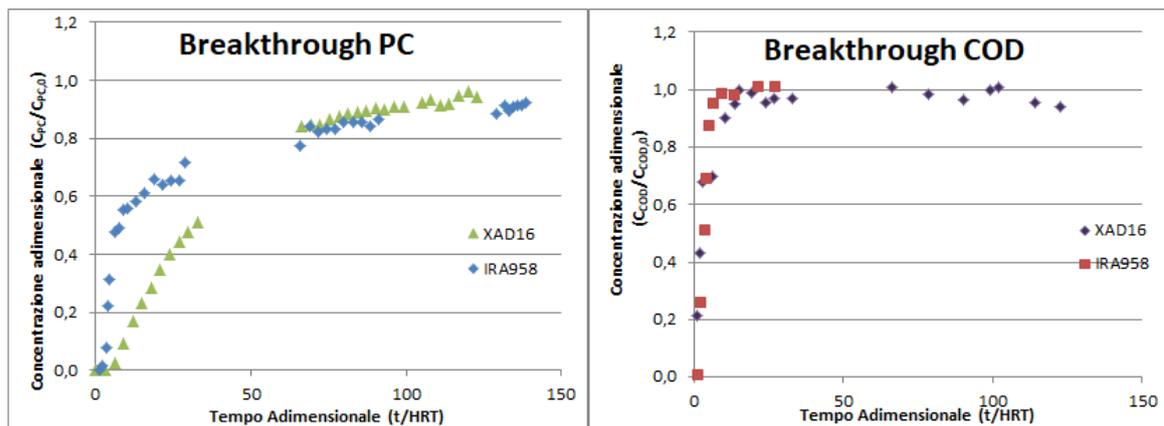


Figura 17 – Confronto prove di adsorbimento con resine singole

In figura 17 è riportato un confronto tra le curve di breakthrough in termini di polifenoli (a sinistra) ed in termini di COD (a destra). Come atteso in base ai risultati di prove precedenti e dalle isoterme non favorevoli, l'IRA958 ha raggiunto il breakpoint in maniera più rapida, con un'efficienza di utilizzo del letto del 10% (Tabella 3). Al contrario la resina XAD16, avendo un'isoterma favorevole, ha raggiunto il breakpoint più avanti nel tempo con un'efficienza di letto pari al 30% (Tabella 3). Le rese di adsorbimento al breakpoint e di desorbimento (Tabella 3) sono risultate invece tra loro comparabili.

5.2.2 Prova di breakthrough su resine miste

Visti i risultati ottenuti dalla precedente prova con le resine singole, è stato deciso di valutare anche il comportamento di una colonna a resina mista. Come già accennato, l'IRA958 ha un'isoterma non favorevole, che si traduce in un'efficienza del letto minore, quindi uno scarso utilizzo della resina, al contrario della XAD16. L'idea è stata quella di avere una prima parte della colonna con la resina IRA958, in modo da saturarla; essa ha una capacità inferiore rispetto alla resina XAD16, ma un costo notevolmente minore (si veda tabella 2), ed una seconda parte della colonna con la resina XAD16, il cui profilo a sigmoide della MTZ trasla, per effetto dell'isoterma favorevole tende a "raddrizzare" il

profilo a sigmoide ed a ridurre l'ampiezza della MTZ larga tipica dell'IRA958. In questo modo, rispetto ad un'analogia lunghezza di letto di sola resina XAD16, si potrebbe cercare di ottenere una quantità di fenoli assorbiti leggermente minore, con un breakpoint solo in parte accelerato, ma con un decisamente minore costo di acquisto della resina.

La prova non è stata condotta in condizioni ottimizzate, perché voleva essere un dato sperimentale su cui costruire un modello su cui lavorare successivamente in un'ottica di ottimizzazione del processo; altri importanti parametri da ottimizzare sono: la lunghezza totale del letto, la proporzione tra la porzione di letto IRA958 e quella XAD16 e una velocità superficiale ed un pH della soluzione di compromesso rispetto alle diverse esigenze delle due resine. Di conseguenza i parametri scelti non erano quelli ottimali, a partire dalla lunghezza del letto di resina (1m IRA958 + 1m XAD16), ma sono stati frutto di un compromesso: è stato scelto un pH (pH 6,5 vedi figura 7) ed un tempo di permanenza idraulico (HRT=0,35 m/h) intermedi: quest'ultimo dato ha determinato una velocità superficiale pari a 3,90 m/h, che non è ottimale per nessuna delle due resine, specie per l'IRA958.

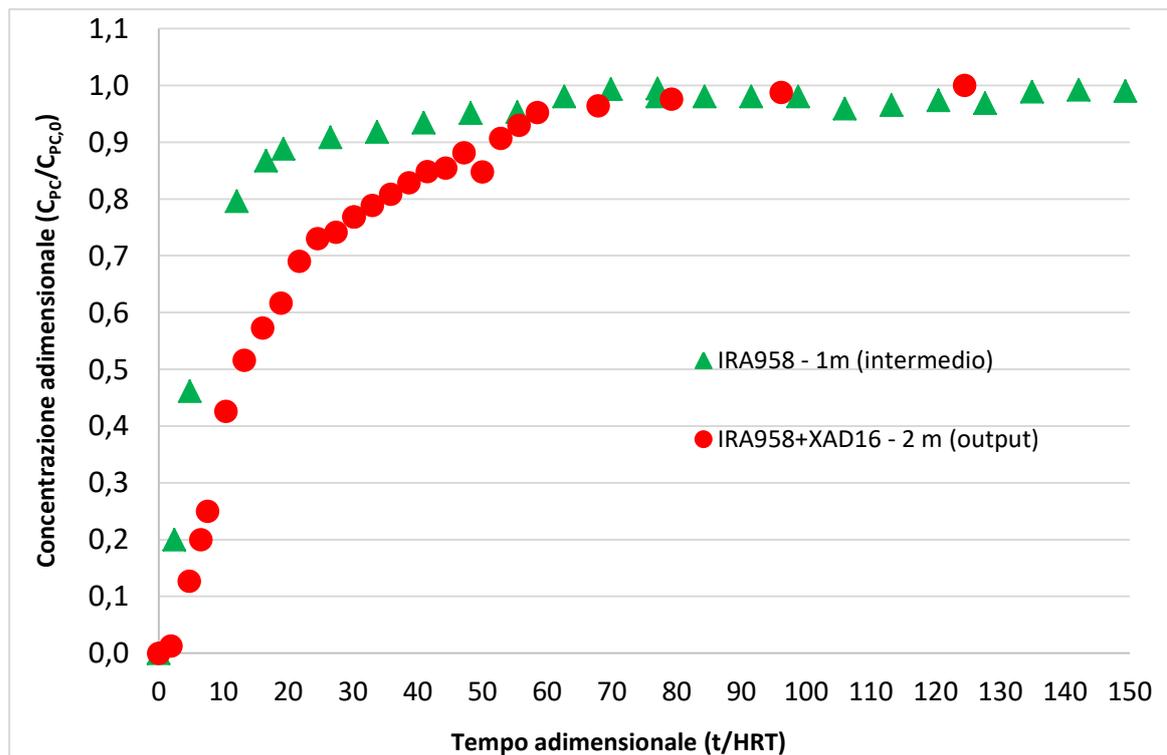


Figura 18 - Curva di breakthrough della colonna a letto misto (in rosso) confrontata con la curva di breakthrough della porzione iniziale con resina IRA958

Dalla figura 18 si può vedere che l'IRA958 ha raggiunto presto il breakpoint, con un tempo analogo a quello misurato nella prova con la resina singola. Però, continuando

l'adsorbimento fino al breakpoint di tutta la colonna (IRA958+XAD16 2 m), è possibile notare come vi sia un incremento notevole dell'efficienza di letto della resina IRA958, rispetto ad un modesto calo della XAD16 (vedi tabella 3). I dati ottenuti sono risultati utili per una simulazione, attualmente in corso, per verificare se i dati ottenuti con le resine singole possono prevedere il comportamento di un letto misto e, se il modello dovesse funzionare si potrebbe arrivare ad una sua ottimizzazione seguita da prove sperimentali di verifica nelle condizioni ottimizzate.

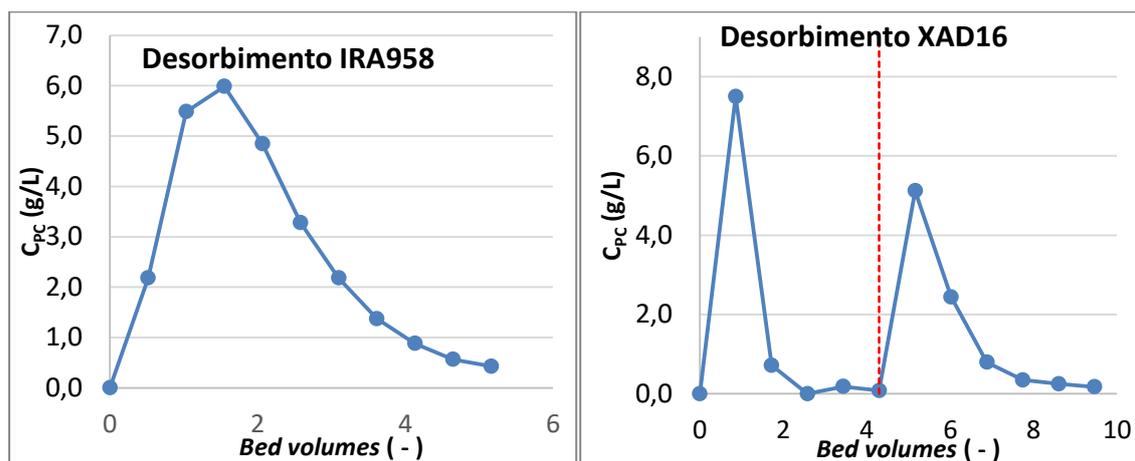


Figura 19 - Desorbimento prova a letto misto (a sinistra IRA958, a destra XAD16): andamento concentrazione PC in funzione dei *bed volumes* flussati

Il desorbimento (Figura 19) è stato condotto in maniera separata per le due porzioni di letto, al fine di desorbire le colonne con il loro solvente ottimale ed avere un termine di confronto con la prova a resina singola. Sono stati flussati 5 *bed volumes* (BV - volume di colonna occupato dalla resina) di etanolo acidificato con 0,5% v/v di HCl 0,1 N seguiti da altri 5 BV di una miscela 50/50 di etanolo e acqua demineralizzata con 0,5% v/v di HCl 0,1 N per la resina XAD16, mentre per la resina IRA958 in forma OH⁻ sono stati flussati 5 BV di una miscela 50/50 di acqua ed etanolo acidificato con HCl fino ad una concentrazione 1 M. La resa di desorbimento dei polifenoli è risultata essere del 98% per l'IRA958 e dell'87% per la XAD16, comparabile con i dati ottenuti dalle prove con le resine singole (vedi tabella 3).

5.3 Caratterizzazione prodotto e potere batteriostatico

Il prodotto ottenuto dalle prove di adsorbimento/desorbimento è stato caratterizzato: in tabella 4 sono riportati i dati ottenuti dalle prove con le singole resine ed i dati ottenuti dalla prova con la resina mista.

Parametro	OMW Microfiltrate	Desorbito XAD16	Desorbito IRA958 OH	Prova mista: IRA958OH + XAD16	
				Desorbito IRA958OH	Desorbito XAD16
Purezza prodotto $\frac{g_{PC(HPLC)}}{g_{SV}}$	0,060 ± 0,004	0,210 ± 0,013	0,190 ± 0,012	0,190 ± 0,010	0,410 ± 0,008
Purezza prodotto $\frac{g_{PC(Folin)}}{g_{SV}}$	0,18 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,34 ± 0,02	0,38 ± 0,03
Potere antiossidante specifico $\frac{g_{A.Ascorbicoeq}}{g_{PC(HPLC)}}$	5,3 ± 0,4	4,9 ± 0,4	4,6 ± 0,3	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,4
Zuccheri riducenti $\frac{g_{zuccheri}}{g_{SV}}$	0,23 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,42 ± 0,02	0,26 ± 0,03
Contenuto proteico $\frac{g_{BSA}}{g_{SV}}$	0,010 ± 0,001	0,040 ± 0,005	0,090 ± 0,010	0,040 ± 0,003	0,020 ± 0,002
Contenuto di solidi volatili $\frac{g_{SV}}{g_{ST}}$	0,59 ± 0,02	0,99 ± 0,04	0,92 ± 0,03	0,89 ± 0,02	0,97 ± 0,03

Tabella 4 - Caratterizzazione prodotti desorbiti

Il potere antiossidante specifico dei desorbiti risulta confrontabile, a parte le prove condotte con resina mista che, non essendo ottimizzate, probabilmente non hanno portato al risultato migliore. Il dato di potere antiossidante specifico ottenuto è stato confrontato con quelli di polifenoli puri, come l'acido caffeico e l'idrossitirosolo. Ogni desorbite ottenuto restituisce un valore di potere antiossidante specifico superiore rispetto al primo (1,7 g A.Ascorbicoeq/g PC(HPLC)) e molto inferiore rispetto al secondo (9,1 g A.Ascorbicoeq/g PC(HPLC)), uno dei polifenoli con più alta capacità antiossidante.

I prodotti desorbiti ottenuti dalle prove di adsorbimento/desorbimento con singole resine sono inoltre stati impiegati per il test di determinazione della Concentrazione minima inibitoria (MIC), al fine di valutare il loro potere batteriostatico da confrontarsi con quello di un batteriostatico commerciale, l'Imidazolidinil urea (Preservante A15).

Prima di procedere al test di determinazione del MIC, si è proceduto ad uno studio di crescita dei due ceppi batterici scelti: *S. epidermidis* ATCC14990 (Gram+) e *E. coli* DH10B (Gram-). Lo studio è stato effettuato sia in termini di logaritmo(CFU)/mL che in termini di OD (densità ottica) per entrambi i ceppi (Figura 20 e figura 21).

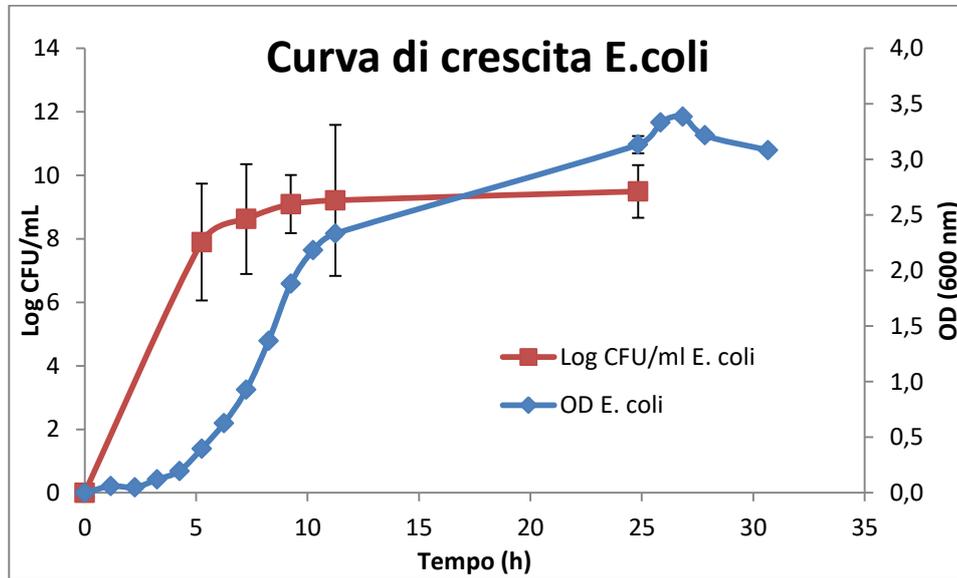


Figura 20 – Curva di crescita di *E. coli*

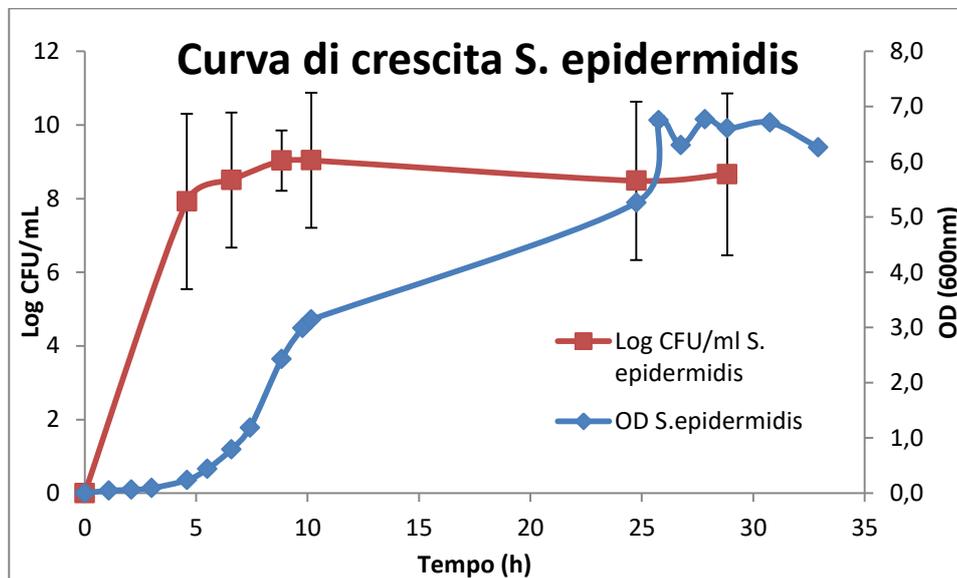


Figura 21 – Curva di crescita di *S. epidermidis*

La costruzione delle curve di crescita è servita per riuscire a determinare quando effettuare il prelievo di coltura liquida per il test del potere batteriostatico, al fine di evitare l'utilizzo di microrganismi metabolicamente in *lag phase* o in piena fase

stazionaria, selezionando quindi un tempo massimo di incubazione compreso tra la fine della *log phase* e l'inizio della fase stazionaria.

I dati ottenuti dalle prove di potere batteriostatico hanno restituito i seguenti risultati:

- Il batteriostatico commerciale (Imidazolidinil urea), testato in un range compreso tra 1,00 e 2,50 g/L, ha restituito un valore di MIC di 1,75 g/L per *E. coli* e di 1,50 g/L per *S. epidermidis*;
- L'estratto ottenuto con la resina XAD16, testato in un range compreso tra 0,50 e 4,18 g_{PC(Folin)}/L, ha restituito un valore di MIC di 1,00 g/L per entrambi i ceppi;
- L'estratto ottenuto con la resina IRA958, testato in un range compreso tra 0,10 e 1,46 g_{PC(Folin)}/L, ha restituito un valore di MIC di 0,50 g/L per *E. coli*, mentre *S. epidermidis* non ha subito inibizione batteriostatica.

I prodotti delle due resine sono simili nonostante la purezza sia abbastanza diversa, in quanto i PC che recuperiamo sono gli stessi, quindi si potrebbe valutare di usare la resina più economica, ovvero l'IRA958, specie se si vuole impiegare il prodotto per sostituire qualche attuale agente antiossidante.

Per quanto concerne il potere batteriostatico, il desorbimento da resina XAD16 risulta sicuramente migliore rispetto al desorbimento da resina IRA958, in quanto inibisce entrambi i ceppi e potrebbe risultare competitivo anche nei confronti del batteriostatico commerciale testato.

Questi prodotti quindi risultano essere promettenti, oltre alle loro buone proprietà, anche per le possibili e differenti applicazioni che potrebbero avere.

5.4 Digestione anaerobica di acque defenolizzate

Le prove di digestione anaerobica delle acque defenolizzate sono state effettuate per studiare la resa netta di produzione di metano, l'abbattimento del COD/BOD₅ e quindi la compatibilità con l'uso irriguo. Si doveva inoltre valutare la differenza tra digestioni condotte con acque defenolizzate derivate da processi di adsorbimento con resine differenti. I dati ottenuti da queste prove erano necessari per condurre una LCA-CBA (valutazione dell'impatto del ciclo di vita ed un'analisi costi-benefici) dell'intero processo integrato (filtrazione, adsorbimento/desorbimento e digestione anaerobica), al momento ancora in fase di elaborazione da parte del gruppo di ricerca.

Oltre alla produzione di biogas e metano ed alla caratterizzazione in termini di PC e

COD, è stata anche misurata la concentrazione degli acidi grassi volatili (VFA) nel tempo, in quanto la presenza di VFA è strettamente legata alla produzione di metano. Infatti nella digestione anaerobica possono essere distinte 4 fasi sequenziali:

- Fase idrolitica: scomposizione dei nutrienti complessi in molecole più semplici, come zuccheri semplici, amminoacidi ed acidi grassi;
- Fase acidogenica: trasformazione delle molecole più semplici in acidi grassi volatili;
- Fase acetogenica: trasformazione degli acidi organici in acido acetico e idrogeno;
- Fase metanogenica: produzione di metano a partire dall'acido acetico (produzione principale, da *Archea* acetoclasti) ed a partire da idrogeno e anidride carbonica (produzione minoritaria, da *Archea* idrogenotrofi).

In tabella 5 sono indicati i dati di caratterizzazione delle OMW filtrate, delle OMW defenolizzate con la relativa resina e dei digestati finali delle OMW defenolizzate.

Parametro	OMW Microfiltrate	OMW Defenolizzata XAD16	Digestato finale XAD16	OMW Defenolizzata IRA958	Digestato finale IRA958
Solidi totali (g/L)	37 ± 0,3	30 ± 0,1	29±0,7	23 ± 0,2	25,4±1,0
Solidi volatili (g/L)	24 ± 0,4	16 ± 0,1	6,8±0,2	6 ± 0,1	4,4±0,3
PC _(hplc) (g Acido Gallico _{eq} /L)	1,28 ± 0,07	0,103±0,011	0,166±0,005	0,074±0,007	0,144±0,010
PC (folin) (g Acido Gallico _{eq} /L)	3,98 ± 0,25	1,57±0,15	0,657±0,106	0,11±0,09	0,217±0,014
COD (g O ₂ /L)	65 ± 1,7	45±1,2	12,21±0,3	45±1,5	8,7±0,5
BOD ₅ (FelsiLab) (g O ₂ /L)	19	12	1,05	2,3	0,53

Tabella 5 - Confronto OMW microfiltrate, OMW defenolizzate e digestati finali

5.4.1 Digestione di acque defenolizzate con XAD16

Nelle seguenti figure sono riportati i triplicati delle prove di acque defenolizzate con XAD16 in termini di andamenti nel tempo del volume di biogas prodotto lordo (Figura 22), del volume di metano prodotto lordo (Figura 23), della concentrazione di VFA (Figura 24), COD (Figura 25) e di polifenoli (Figura 26).

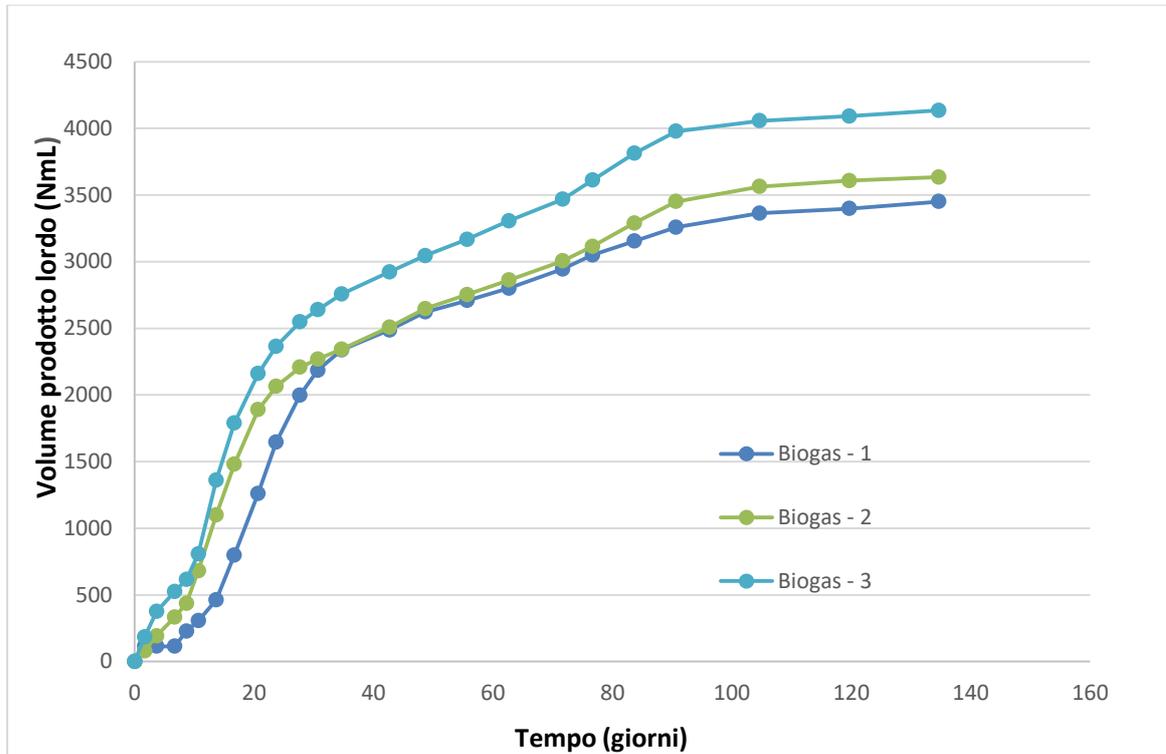


Figura 22 – Andamento del triplicato in termini di produzione di biogas lorda da OMW defenolizzate con XAD16

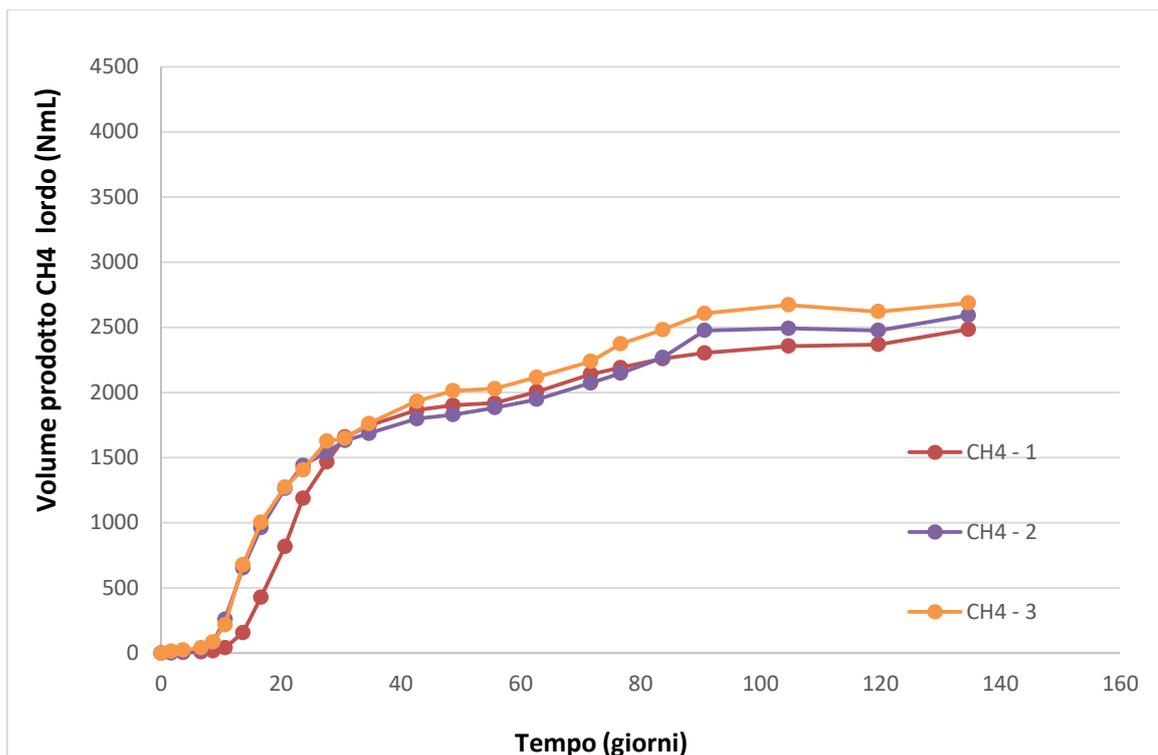


Figura 23 - Andamento del triplicato in termini di produzione di metano lorda da OMW defenolizzate con XAD16

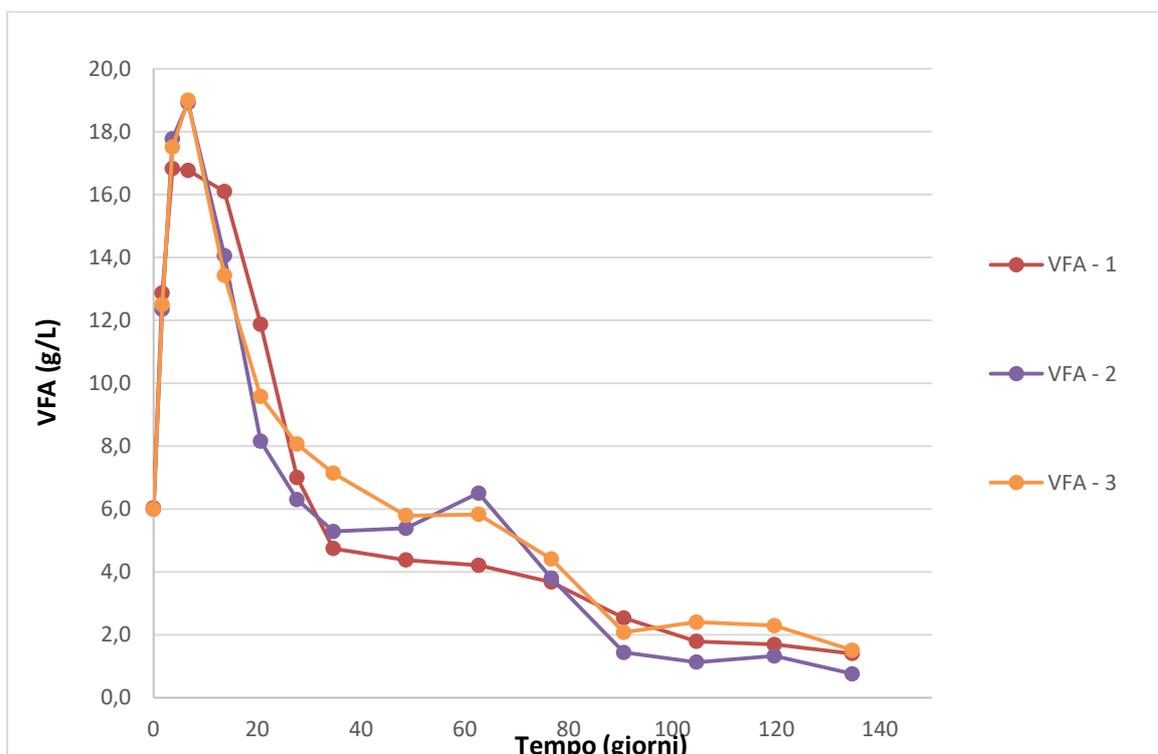


Figura 24 - Andamento del triplicato in termini di concentrazione di VFA da OMW defenolizzate con XAD16

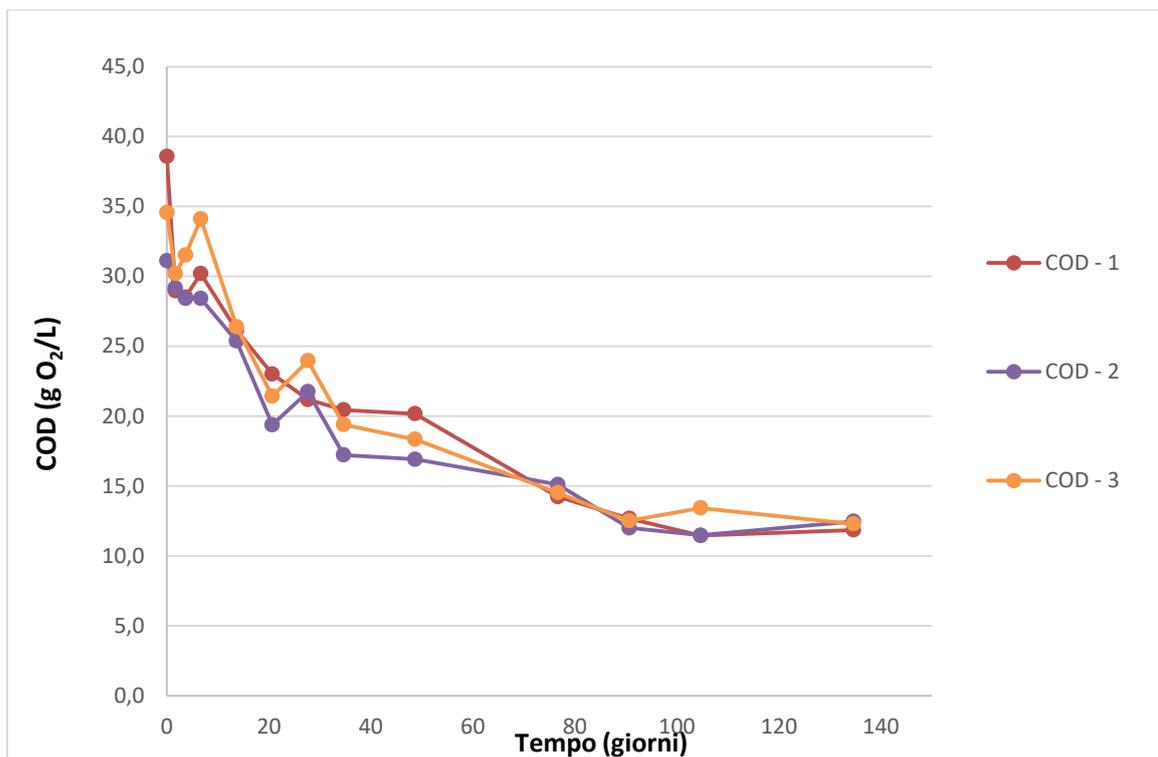


Figura 25 - Andamento del triplicato in termini di COD da OMW defenolizzate con XAD16

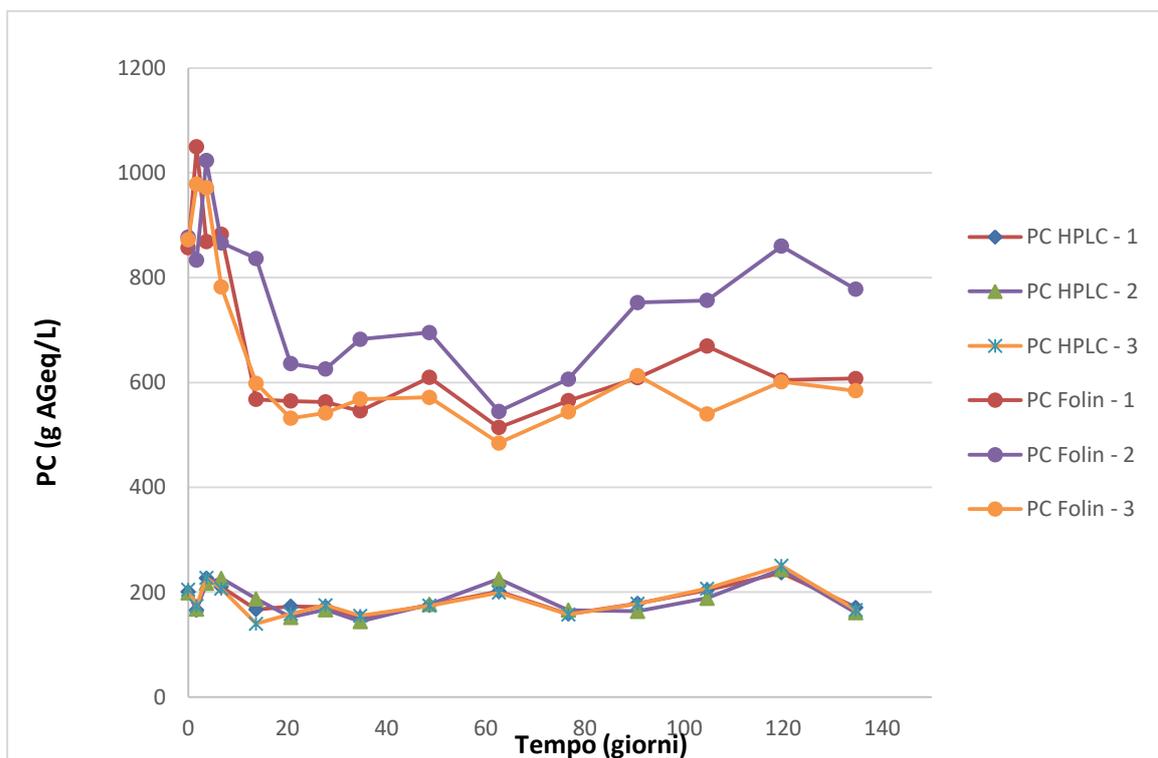


Figura 26 - Andamento del triplicato in termini di concentrazione di PC (sia HPLC che Folin) da OMW defenolizzate con XAD16

Nelle seguenti figure sono riportati i triplicati delle prove del bianco della prova in termini di andamenti nel tempo di volume di biogas prodotto lordo (Figura 27) e di volume di metano prodotto lordo (Figura 28).

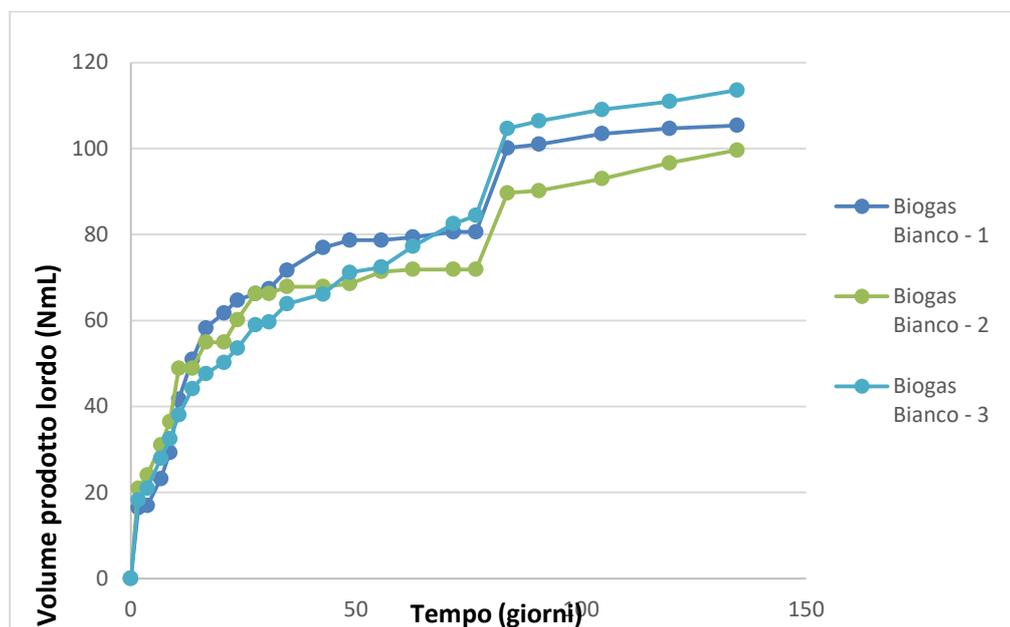


Figura 27 - Andamento del triplicato del bianco in termini di produzione di biogas lorda

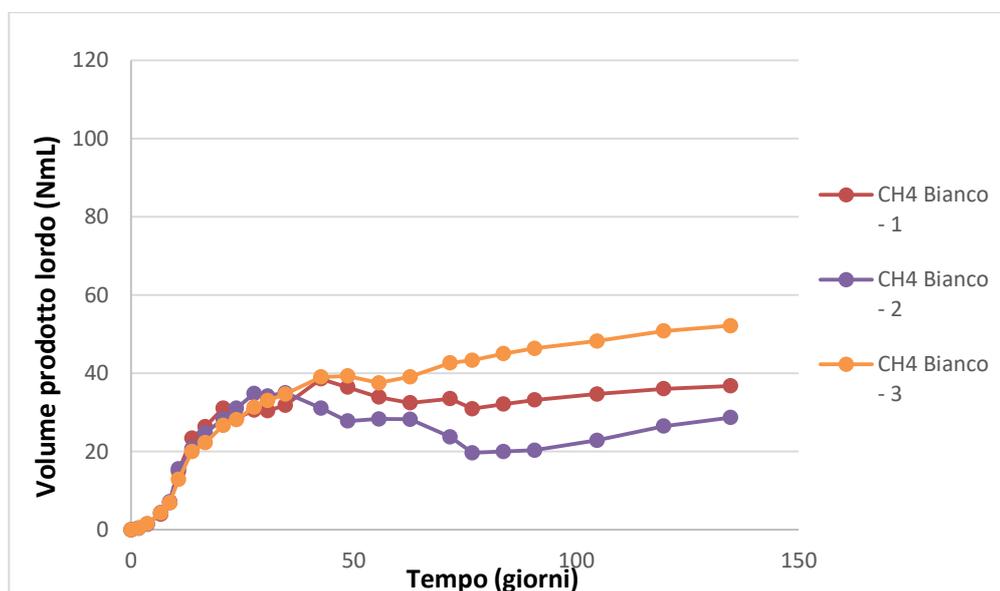


Figura 28 - Andamento del triplicato del bianco in termini di produzione di metano lorda

Nelle seguenti figure sono riportati i dati medi della digestione anaerobica di acque defenolizzate con XAD16 in termini di andamenti nel tempo del volume di biogas e metano prodotto lordo (Figura 29), del volume di biogas e metano prodotto lordo dai bianchi (Figura 30), della concentrazione di VFA e COD (Figura 31) e di polifenoli (Figura 32).

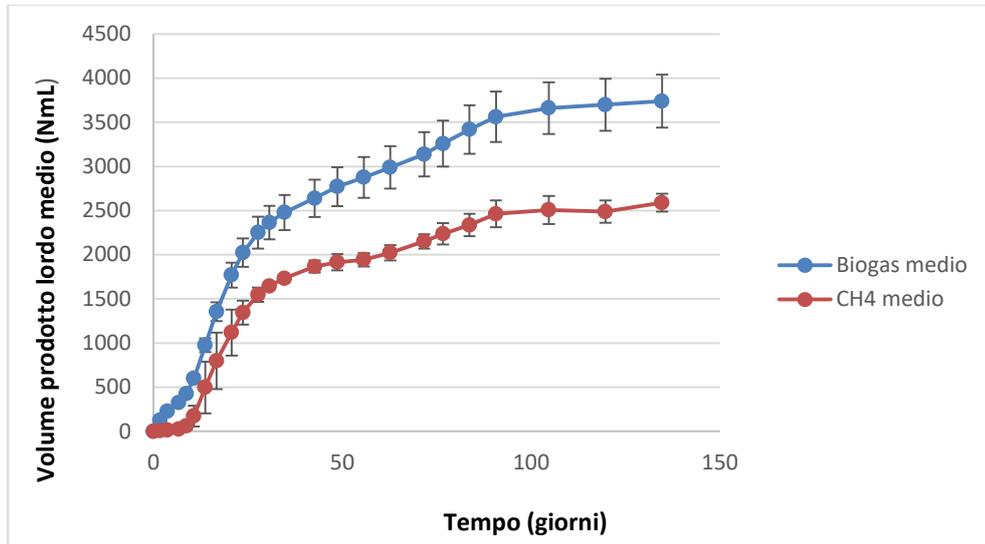


Figura 29 - Andamento medio della produzione lorda di biogas e metano con acque defenolizzate con XAD16

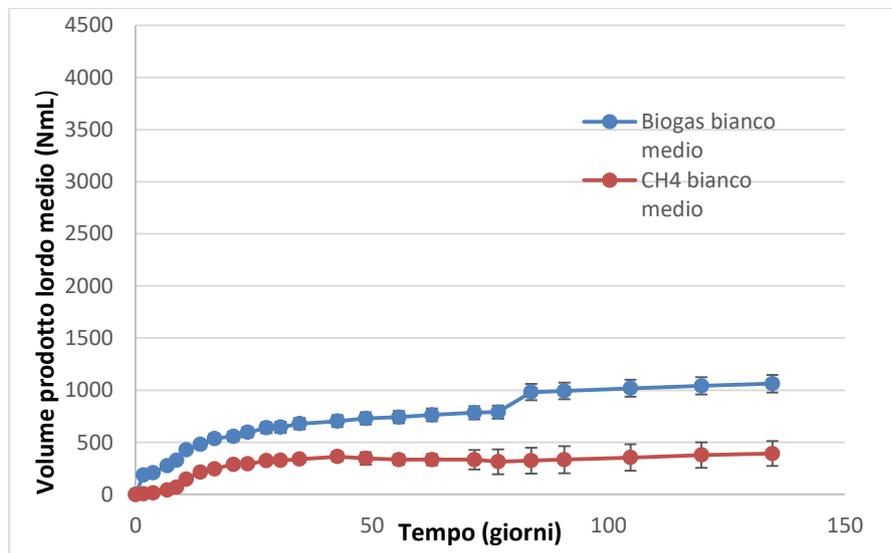


Figura 30 - Andamento medio della produzione lorda di biogas e metano dei bianchi

Dai risultati medi sulla fase gas si può già valutare come l'andamento nella produzione di biogas e metano sia normale, a parte una certo periodo di *lag phase* iniziale.

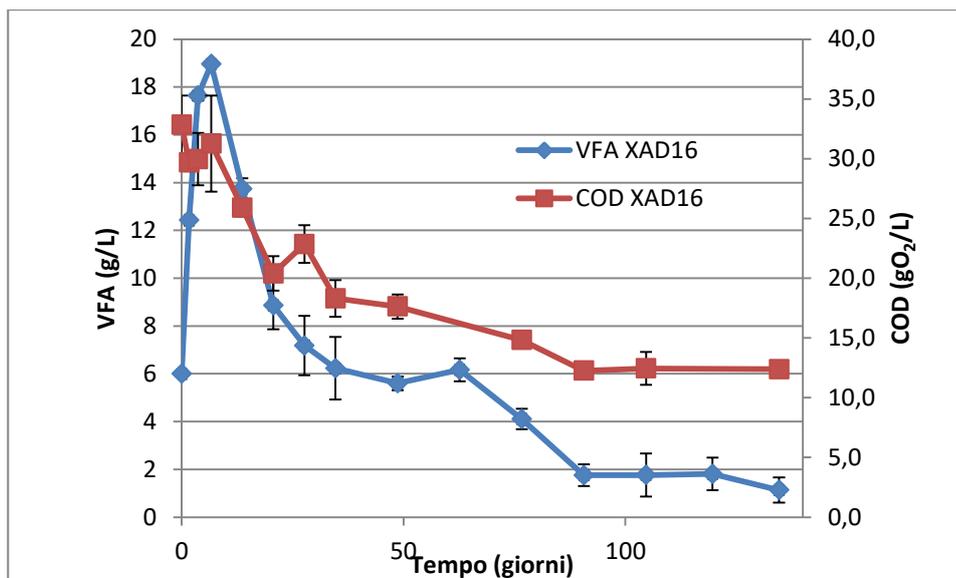


Figura 31 - Andamento medio in termini di VFA e COD da OMW defenolizzate con XAD16

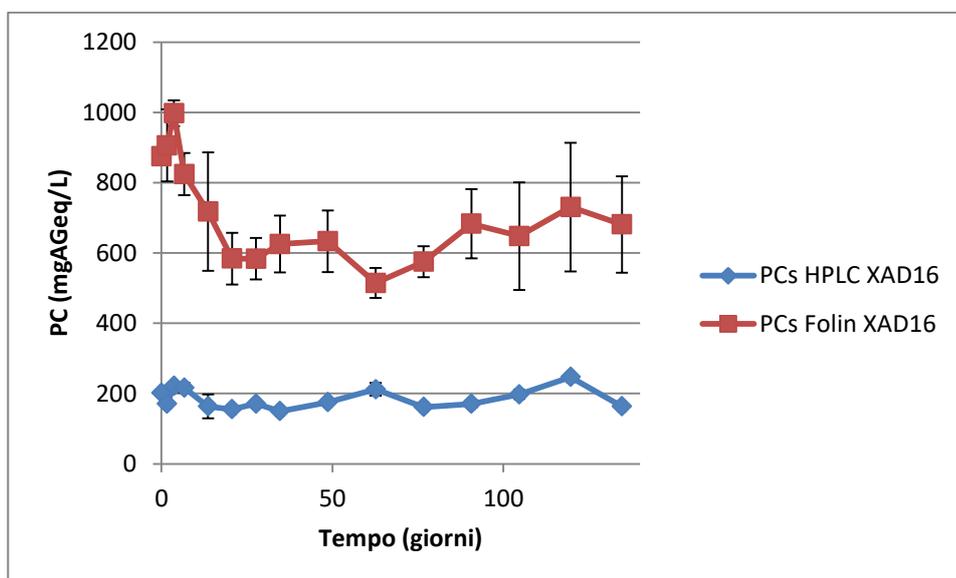


Figura 32 - Andamento medio in termini di PC (sia Folin che HPLC) da OMW defenolizzate con XAD16

Dai risultati ottenuti dalle analisi della fase liquida, risulta che i polifenoli si possono considerare stabili nel tempo, anche hanno un andamento un po' diverso se confrontati tra quelli analizzati col Folin e quelli con l'HPLC. Il controllo dei VFA medi ci restituisce un andamento normale, anche se ha presentato un picco molto alto, quasi 20 g/L, che avrebbe potuto inibire la produzione di metano da parte degli *Archea*; nel caso in cui si volessero tentare prove in continuo questo è un dato importante per evitare che il processo

venga inibito. L'andamento del COD medio è quello che ci si può aspettare da una digestione, tuttavia a fine digestione è risultato essere ancora superiore a 10 g O₂/L.

5.4.2 Digestione di acque defenolizzate con IRA958

Nelle seguenti figure i triplicati delle prove di acque defenolizzate con IRA958 in termini di andamenti nel tempo del volume di biogas prodotto lordo (Figura 33), del volume di metano prodotto lordo (Figura 34), della concentrazione di VFA (Figura 35), COD (Figura 36) e di polifenoli (Figura 37).

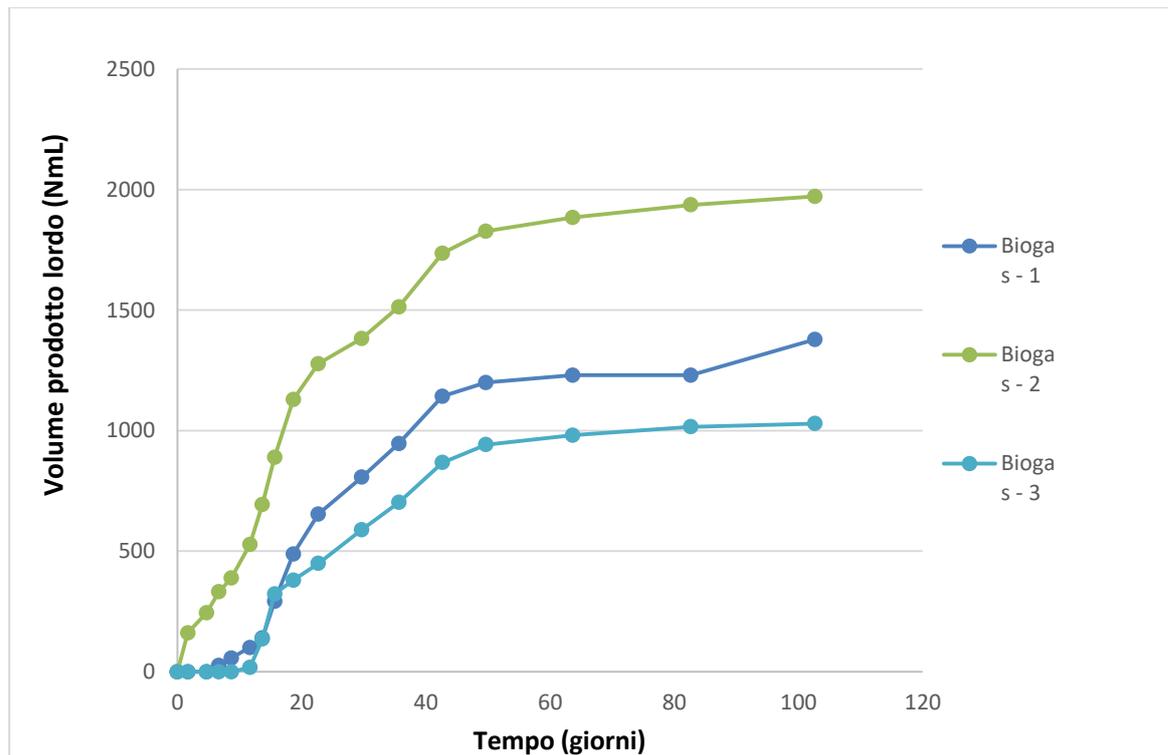


Figura 33 - Andamento del triplicato in termini di produzione di biogas lorda da OMW defenolizzate con IRA958

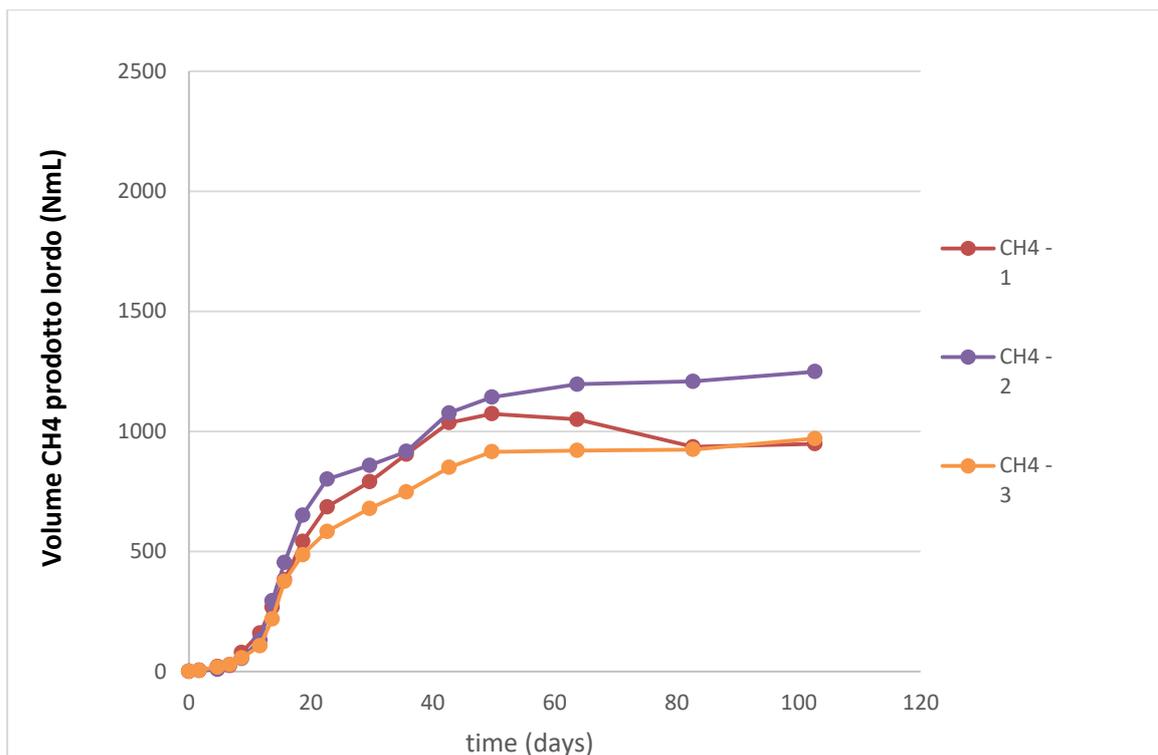


Figura 34 - Andamento del triplicato in termini di produzione di metano lorda da OMW defenolizzate con IRA958

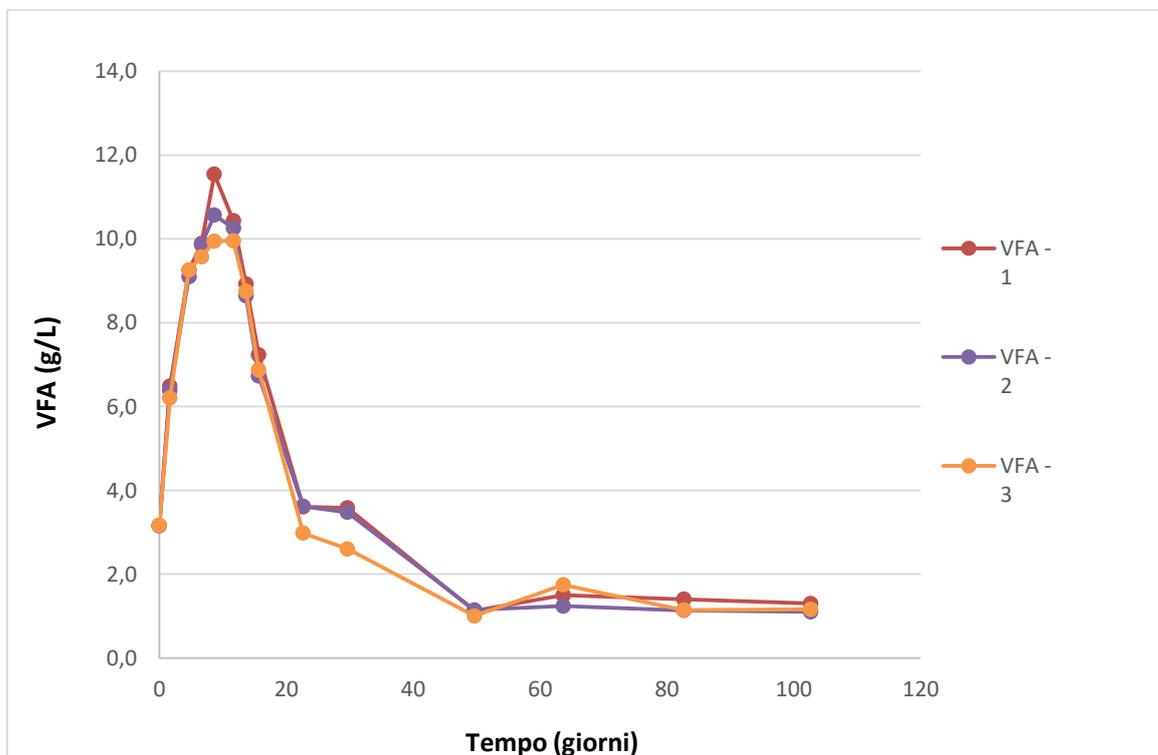


Figura 35 - Andamento del triplicato in termini di concentrazione di VFA da OMW defenolizzate con IRA958

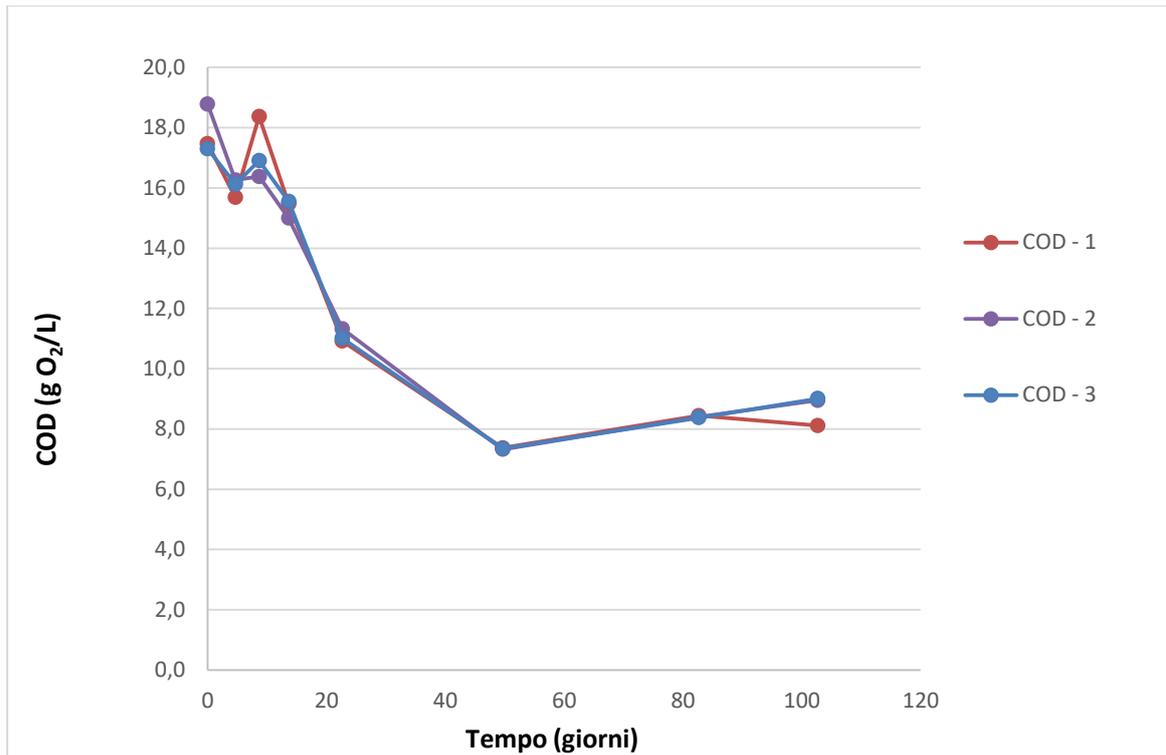


Figura 36 - Andamento del triplicato in termini di COD da OMW defenolizzate con IRA958

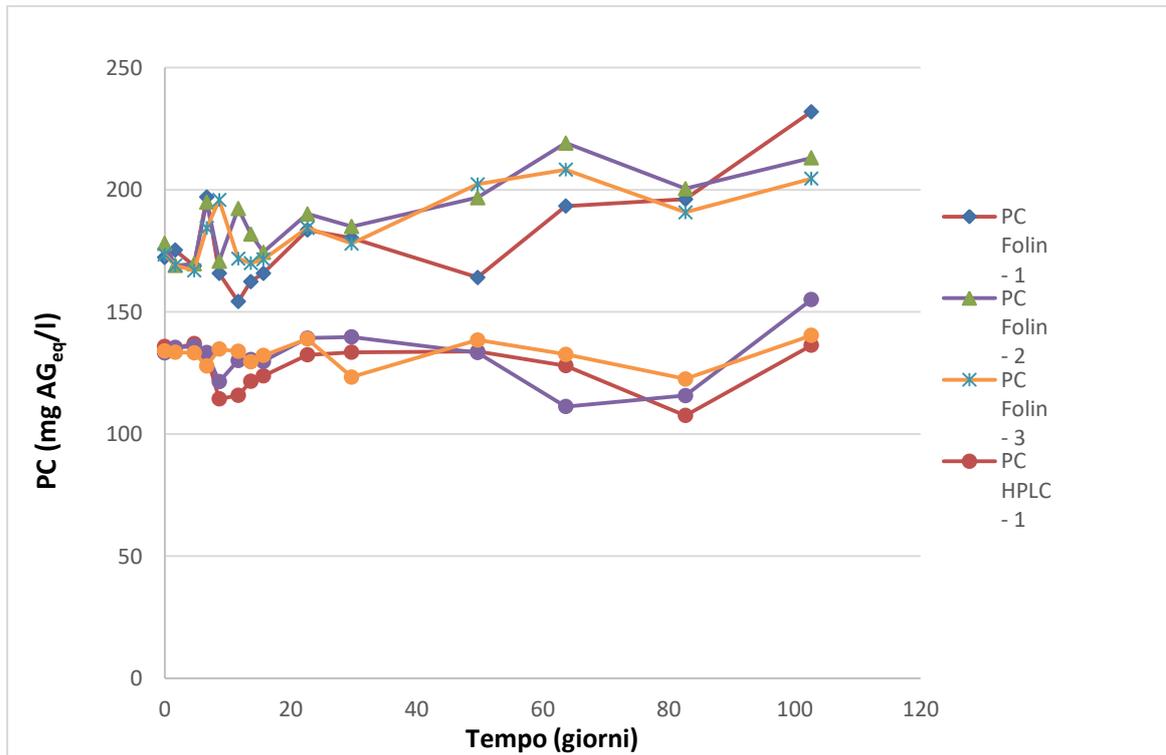


Figura 37 - Andamento del triplicato in termini di concentrazione di PC da OMW defenolizzate con IRA958

Nelle seguenti figure sono riportati i triplicati delle prove del bianco della prova in termini di andamenti nel tempo di volume di biogas prodotto lordo (Figura 38) e di volume di metano prodotto lordo (Figura 39).

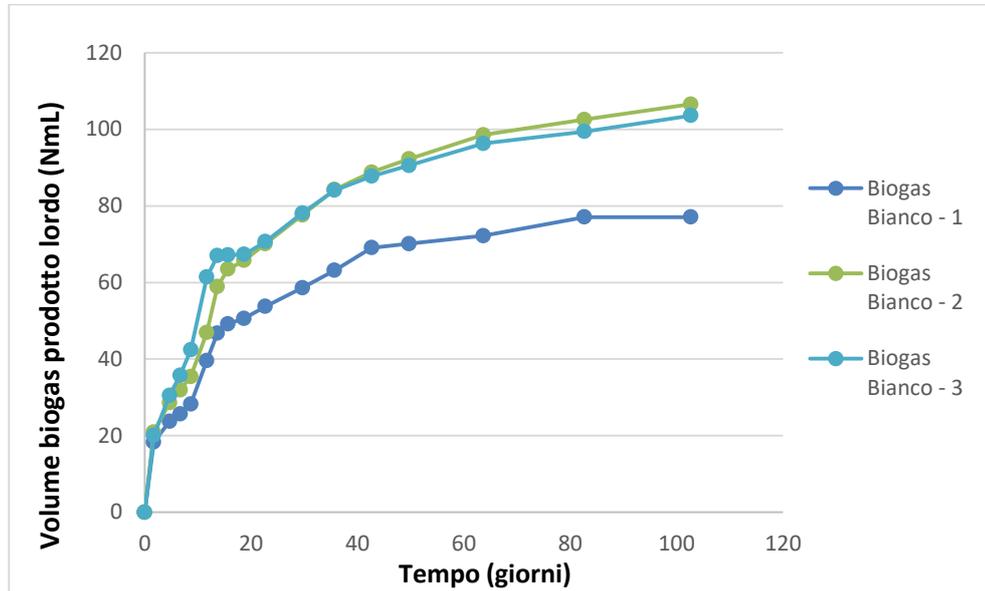


Figura 38 - Andamento del triplicato del bianco in termini di produzione di biogas lorda

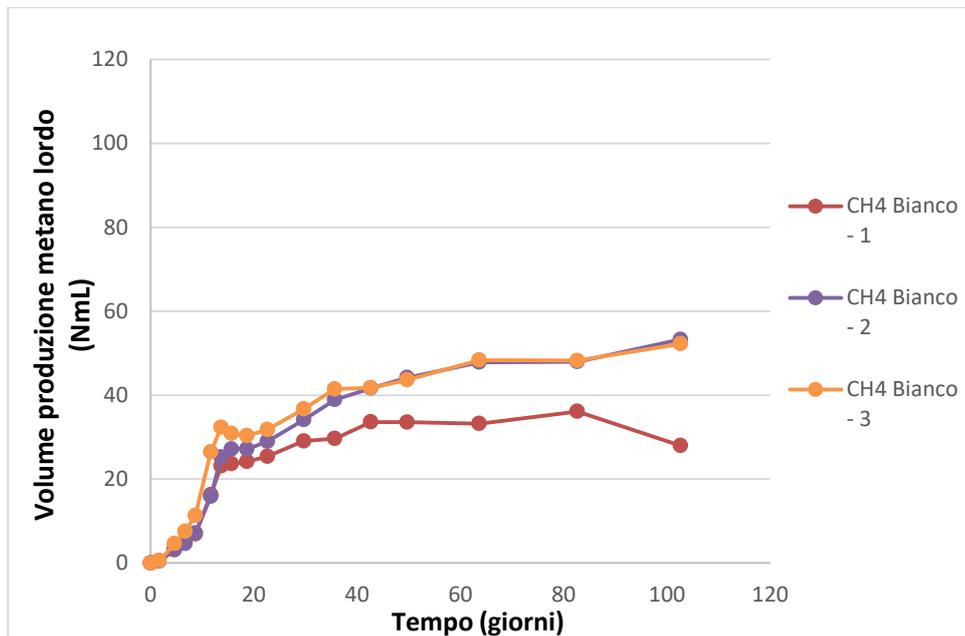


Figura 39 - Andamento del triplicato del bianco in termini di produzione di metano lorda

Nelle seguenti figure sono riportati i dati medi della digestione anaerobica di acque defenolizzate con IRA958 in termini di andamenti nel tempo di volume di biogas e metano prodotto lordo (Figura 40), di volume di biogas e metano prodotto lordo dai bianchi (Figura 41), concentrazione di VFA e COD (Figura 42) e di polifenoli (Figura

43).

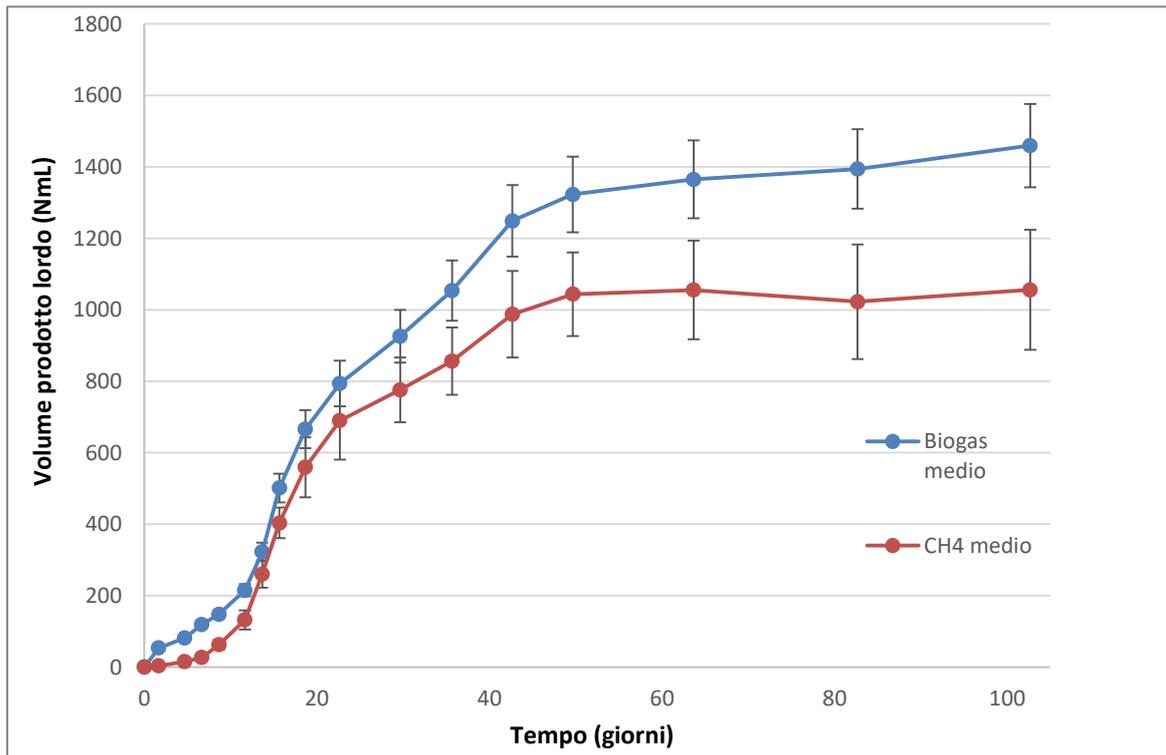


Figura 40 - Andamento medio della produzione lorda di biogas e metano con acque defenolizzate con IRA958

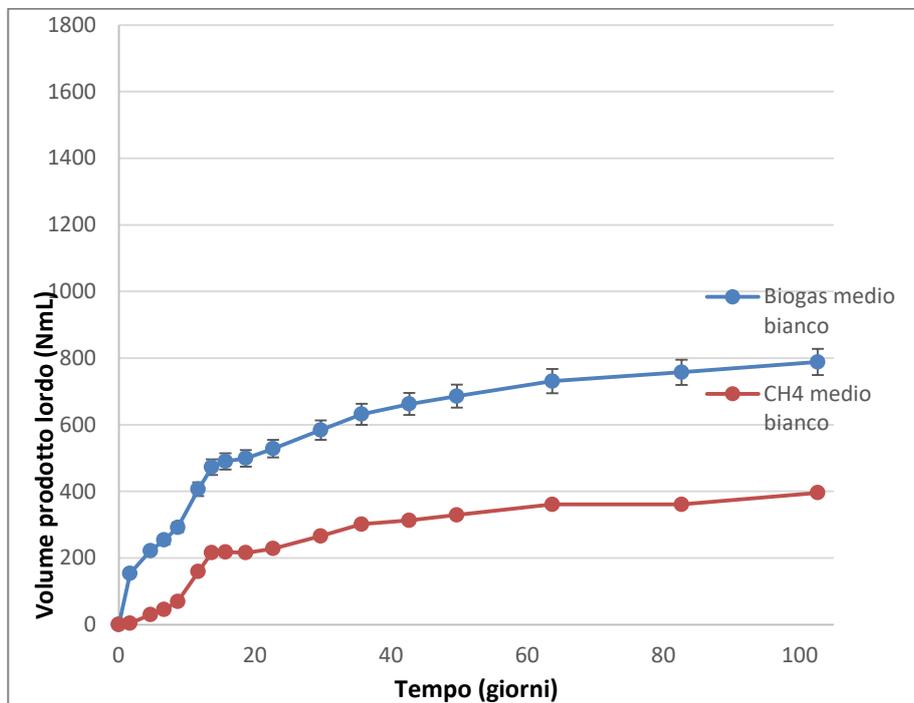


Figura 41 - Andamento medio della produzione lorda di biogas e metano dei bianchi

Nei dati medi della produzione di biogas e metano dei bianchi è stato escluso il bianco 1 in quanto *outlier*.

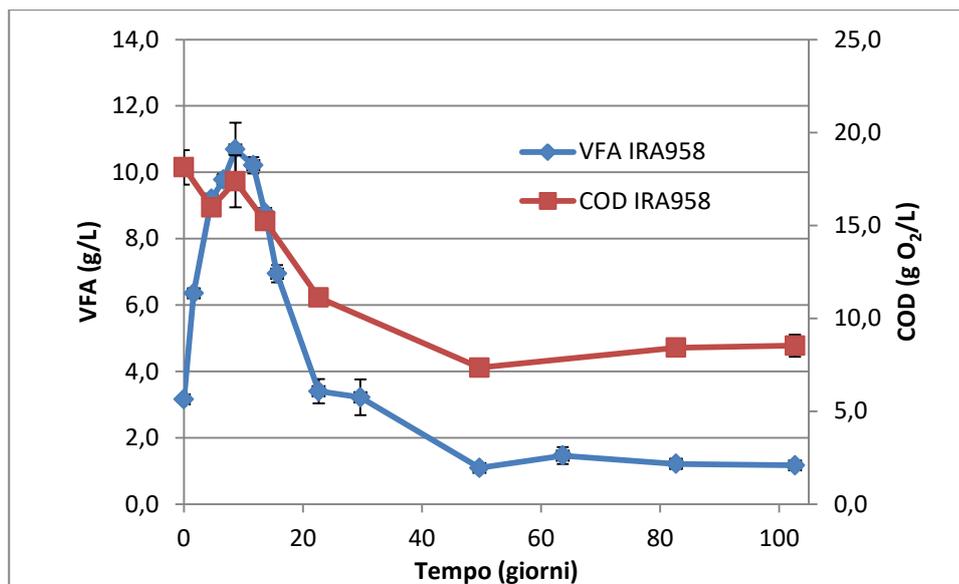


Figura 42 - Andamento medio in termini di VFA e COD da OMW defenolizzate con IRA958

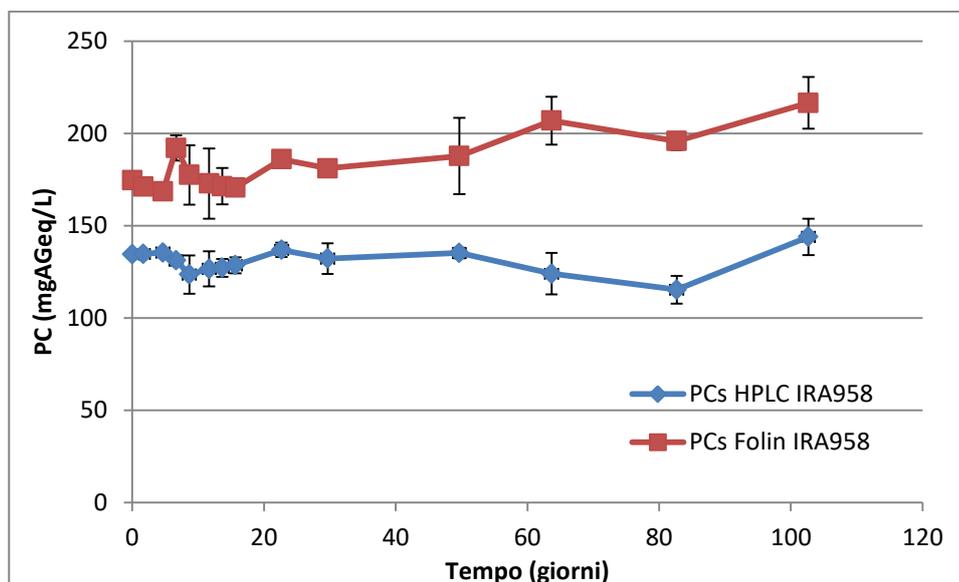


Figura 43 - Andamento medio in termini di PC (sia Folin che HPLC) da OMW defenolizzate con IRA958

Anche in questo caso i risultati ottenuti dalle analisi della fase liquida mostrano come i polifenoli non vengano degradati durante la digestione anaerobica, seppure abbiano un andamento un po' diverso se confrontati tra quelli analizzati col Folin e quelli con l'HPLC. Il controllo dei VFA medi ci restituisce un andamento normale, in questo caso il valore massimo ottenuto, circa 10 g/L, non dovrebbe presentare problemi di inibizione della produzione di metano da parte degli *Archea*. L'andamento del COD medio è quello che ci si può aspettare da una digestione, tuttavia a fine digestione è risultato ancora alto, in questo caso di poco inferiore a 10 g O₂/L.

In tabella 5 sono riportati i dati di caratterizzazione delle OMW filtrate, defenolizzate e del liquido di fine digestione. Sicuramente entrambe le resine sono riuscite ad abbattere i valori di COD e BOD₅ con un'ottima produzione di metano, tuttavia i valori residui al termine della digestione sono ancora molto lontani dai 10 mg O₂/L previsti dalla norma ISO 16075 per l'uso irriguo libero in agricoltura (categoria A). È stata quindi valutata la concentrazione di azoto ammoniacale nei liquidi di fine digestione ed è risultato un valore pari a 0,34±0,01 g/L per il digestato di OMW defenolizzate con XAD16 e 0,39±0,02 g/L per il digestato di OMW defenolizzate con IRA958. È quindi probabile che il rapporto C/N (carbonio/azoto) fosse troppo basso fin dall'inizio in entrambe le prove e, di conseguenza, la digestione non è arrivata fino alla fine per mancanza di nutrienti azoto-ammoniacali. Saranno necessarie ulteriori prove a sostegno di questa supposizione, condotte con OMW defenolizzate arricchite in composti azotati oppure condotte come co-digestioni; in alternativa si potrebbe proporre un trattamento terziario di biodegradazione aerobica con fanghi attivi.

In figura 44 è presente un confronto tra le rese in metano delle prove effettuate con OMW defenolizzata con IRA958, OMW defenolizzata con XAD16 e con OMW microfiltrate (dati ottenuti in un precedente lavoro di tesi⁷).

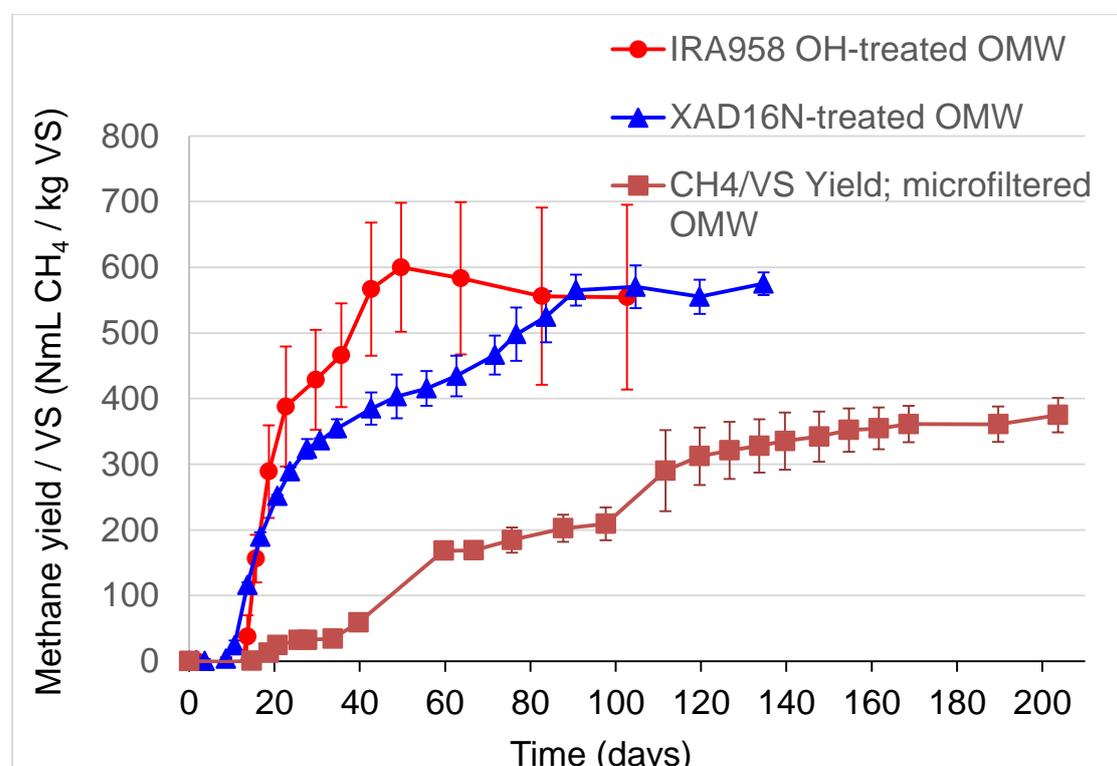


Figura 44 - Confronto dell'andamento tra rese nette in metano tra OMW defenolizzate con IRA958, XAD16 e OMW microfiltrate non defenolizzate¹⁷

I dati mostrati in figura mostrano come la resa di metano tra acque defenolizzate con XAD16 o IRA958 risulta confrontabile, ma nettamente migliore rispetto a quella di OMW microfiltrate. Si nota inoltre che la velocità iniziale di produzione di metano, un po' maggiore nel caso delle acque defenolizzate con IRA, è notevolmente superiore a quella misurata nella OMW non trattate (sola microfiltrazione, nessuna rimozione di polifenoli).

Questi dati confermano alcune osservazioni preliminari in esperimenti precedenti, in cui si mostrava come la defenolizzazione delle OMW determinano un incremento del 33% nella resa di produzione di metano ed un aumento del 40% della sua velocità di produzione, con un conseguente incremento nella produzione di energia ed una diminuzione dei costi legati al volume del bioreattore che risulta molto inferiore poiché basta un tempo di residenza notevolmente inferiore. Vedendo i dati da un altro punto di vista, se si dovesse applicare un tempo di permanenza simile e ragionevole nel caso delle OMW defenolizzate tale da portare allo sviluppo pressoché completo del metano (situazioni simile a quella ottenuta in condizioni batch a tempo pari a 100 giorni) la quantità di metano prodotta con OMW non trattate sarebbe meno della metà di quella ottenuta con acque defenolizzate.

I dati preliminari sulla digestione di OMW ottenuti in questo lavoro saranno impiegati per lo studio, in programma, di una valutazione economico-ambientale (LCA-CBA) del processo integrato (defenolizzazione+digestione anaerobica).

5.5 Analisi costi-benefici e valutazione del ciclo di vita

L'analisi costi-benefici e la valutazione del ciclo di vita, a cui si è contribuito solo in parte con la fornitura dei dati¹⁸, è riferita ad una stagione di produzione di olio d'oliva e quindi di OMW, generalmente compresa tra ottobre e gennaio, e si è fissato a 10000 m³ il totale di OMW da trattare (valore tipico di un frantoio di grandi dimensioni). Le valutazioni sono condotte ipotizzando l'uso di una sola colonna, rendendo quindi discontinuo il processo. Il flusso di OMW da trattare è fissato a 4,17 m³/h, così da garantire un tempo di trattamento delle OMW comparabile a quello della loro produzione ed evitare i costi di stoccaggio di un grande quantitativo di acque. Si sono impiegati per la valutazione dello scale-up la velocità superficiale media (2,78 m/h) ed il tempo di permanenza idraulico (HRT = 0,56 h) dei test in scala di laboratorio in condizioni ottimali; assumendo inoltre la stessa porosità della resina (0,857), risultano uguali anche la velocità interstiziale (3,24

m/h) e la lunghezza del letto (1,82 m). Per poter trattare un flusso maggiore di OMW, rispetto all'impianto in scala di laboratorio, si è reso necessario aumentare il diametro della colonna fino a 1,38 m. Sulla base delle scelte di scale-up, si è assunto che il valore di breakpoint (20%) sia raggiunto dopo 10,9 h e che la massa di resina secca XAD16 necessaria a caricare l'impianto sia pari a 700 kg, corrispondenti a 975 L di resina commerciale (densità dichiarata del venditore 0,72 kg/L). Ogni ciclo di recupero di PC prevede uno step di adsorbimento, uno di desorbimento (a portata volumetrica dimezzata di etanolo rispetto all'adsorbimento) ed uno di lavaggio con acqua (a portata uguale all'adsorbimento), stimando una durata complessiva pari a 14,7 h ed un tempo, per trattare 10000 m³, pari a 4,5 mesi; la resina inoltre è garantita dal venditore per 500 cicli che, considerando la durata di 14,7 h del ciclo, garantisce un suo utilizzo per circa 300 giorni, ossia circa due stagioni di produzione di olio d'oliva, sostituendo ogni stagione il 50% della resina in colonna (bisogna verificare che siano effettivamente 500 cicli). La massa di PC desorbiti durante l'intera stagione produttiva è determinata come prodotto del volume di OMW trattata, la concentrazione di PC nelle OMW e la resa complessiva del processo (65%).

Oltre al processo di adsorbimento/desorbimento, la valutazione costi-benefici e del ciclo di vita deve tenere conto di: un impianto di microfiltrazione per la rimozione dei solidi sospesi (circa 3 kg/m³) e la risultante massa di solidi da smaltire pari a 30 t/stagione tramite digestione anaerobica; un essiccatore rotativo per l'evaporazione dell'etanolo dal prodotto desorbito, stimando in 990500 MJ/stagione il calore da fornire; un bruciatore da 85 kW per fornire calore al processo di evaporazione; un condensatore per il recupero dell'etanolo evaporato; una torre di raffreddamento per portare a 30°C l'acqua in uscita dal condensatore e 405 m³/stagione di acqua da reintegrare in quanto evaporata. Si rende poi necessario un reintegro di etanolo pari a 4,5 m³/stagione in quanto si assume che nel prodotto solido sia rimasto uno 0,5% w/w di etanolo (0,12 m³/stagione) mentre 4,40 m³/stagione sono persi nello spurgo del condensatore. È necessario considerare anche la massa di HCl da acquistare pari a 27 kg a stagione e valutata come $(0,0182 \text{ kg}_{\text{HCl}}/\text{m}^3_{\text{etanolo}}) \cdot (\text{Volume di etanolo evaporato})$ ed infine il consumo di elettricità, valutata sulla base di una perdita di carico di 0,4 bar in adsorbimento e di 0,65 bar in desorbimento, 0,75 kWh/m³ di OMW per la microfiltrazione e 0,40 kWh/m³ per altre pompe dell'impianto, risultata essere pari a 12000 kWh/stagione.

5.5.1 Valutazione del ciclo di vita

In tabella 6 è riportato il risultato della LCA condotta coi quattro diversi metodi, con l'impatto percentuale in termini di infrastrutture, ovvero la costruzione dell'impianto, di fase operativa, ovvero l'uso ed il consumo di *utilities*, *chemicals* e resina, e di fine vita (End of life – EOL), quindi smaltimento dell'impianto e dei rifiuti da esso prodotti nell'arco della sua vita.

	ILCD Midpoint + v1.10	Ecological Scarcity 2013	IPCC 2013, GWP 20a	Cumulative Energy Demand V1.09
Impatto totale per stagione	46 Pt	87 MPt	88 t CO ₂ equivalente	1.09·10 ⁶ MJ
Impatto totale per m ³	4.6 mPt/m ³	8.7 kPt/m ³	8.8 kg CO ₂ equivalente/m ³	109 MJ/m ³
Infrastrutture	20%	6%	3%	4%
Fase operativa	22%	40%	61%	85%
Fine vita (EOL)	58%	54%	36%	11%

Tabella 6 - Risultati di LCA ottenuti dai 4 metodi selezionati

Secondo la *Cumulative energy demand* (CED) la fase operativa, caratterizzata da consumo di elettricità e calore per pompe e evaporazione del solvente, è quella che influenza maggiormente l'impatto totale; risultato simile si ottiene secondo il metodo *IPCC Global warming potential*. Gli altri due metodi restituiscono non solo una quantificazione dell'impatto ambientale del ciclo di vita dell'impianto, ma anche un'indicazione di quanto ogni fase e comparto del ciclo di vita influisca sui diversi compartimenti ed aspetti ambientali presi in considerazione: in entrambi i casi il trattamento delle acque reflue ha il maggiore impatto (44-52%), seguito dalle infrastrutture per il metodo ILCD (20%) e dal calore per l'evaporazione dell'etanolo per il metodo *Ecological Scarcity* (26%).

In figura 45 è riportata una comparazione grafica più dettagliata dei 4 metodi impiegati.

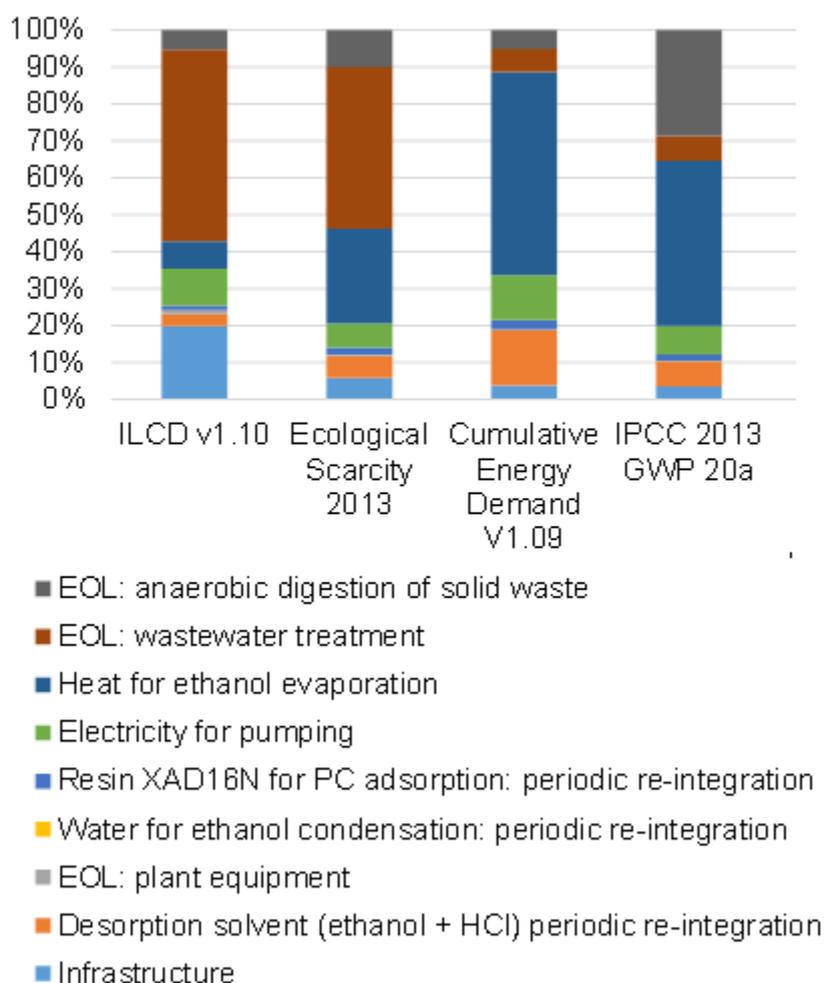


Figura 45 – Comparazione grafica dei risultati di LCA ottenuti dai 4 metodi selezionati

Essendo il metodo ILCD largamente riconosciuto ed armonizzato a livello europeo, è stato scelto per una analisi più dettagliate dei risultati: come indicato in tabella 6, l'impatto totale in questo caso è stimato in 4,6 mPt/m³.

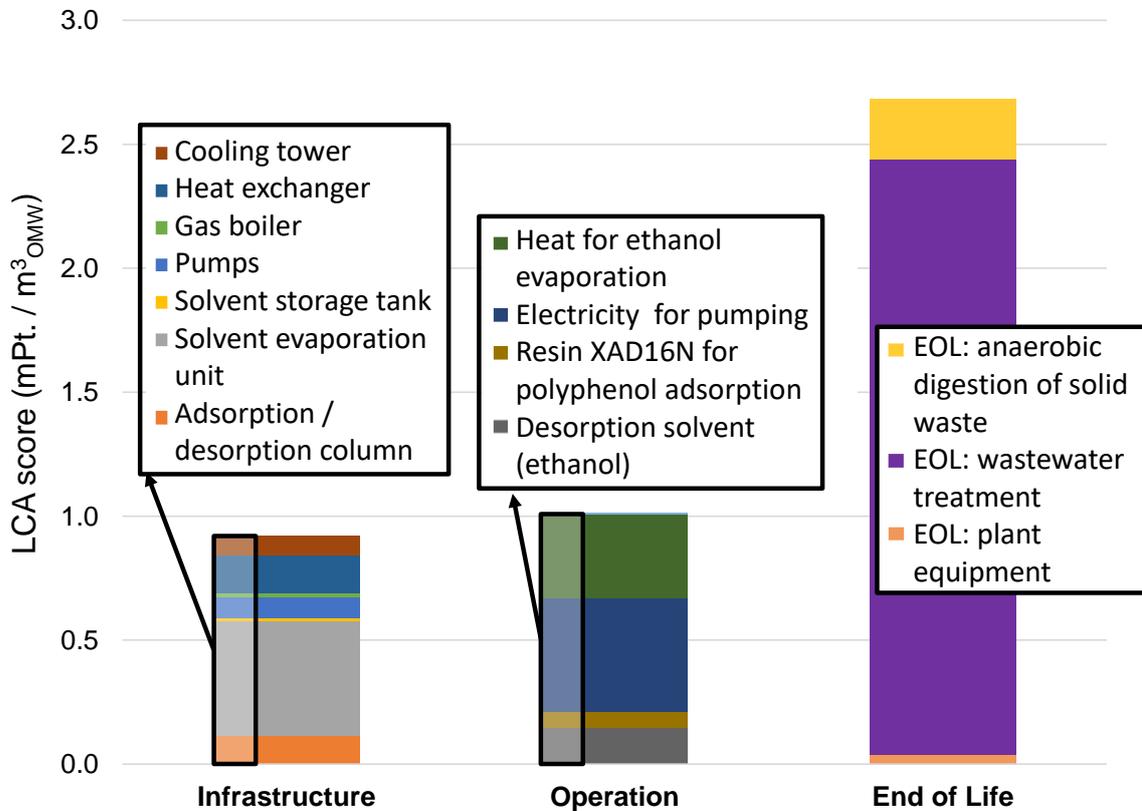


Figura 46 - Contributi dei singoli impatti nella valutazione ILCD

Dalla figura 46 si può notare come il contributo maggiore è dato dal trattamento delle acque reflue (2,4 mPt/m³), seguito dalle infrastrutture (0,9 mPt/m³), l'elettricità per le pompe (0,5 mPt/m³), il calore per l'evaporazione dell'etanolo (0,3 mPt/m³) e la gestione anaerobica dei solidi sospesi (0,2 mPt/m³). L'impatto del trattamento delle acque è riferito al trattamento di acque reflue in Europa, visto che il processo di defenolizzazione restituisce delle acque che possono essere trattate in un impianto di depurazione municipale. Questi risultati indicano che c'è un grande potenziale per migliorare le performance ambientali aggiungendo un ulteriore trattamento, come la digestione anaerobica, per rendere le OMW riutilizzabili per l'irrigazione invece di smaltire in un depuratore. Inoltre la digestione anaerobica produrrebbe l'energia necessaria a coprire la domanda energetica e i solidi derivati dalla microfiltrazione potrebbero essere integrati nella digestione anaerobica per produrre un digestato utile come fertilizzante, producendo un minore impatto dovuto al trattamento di acque reflue.

5.5.2 Analisi costi-benefici

Il costo totale del processo di recupero di PC riferito ad un periodo di 20 anni è risultato essere pari a 531 950 €, di cui il 48% è rappresentato dal CAPEX (costi di investimento) ed il 52% dall'OPEX (costi operativi). I ricavi totali richiesti sono stati determinati assumendo un tasso di rendimento interno minimo richiesto pari alla soglia WACC selezionata, ossia il 6%. In tabella 7 sono riportati i contributi dei singoli elementi sul costo totale.

	CAPEX or OPEX element	% contribution to the total cost
CAPEX	Adsorption / desorption column, storage tanks, pumps	16.4%
	Rotary dryer with gas boiler for desorption solvent evaporation	15.8%
	Condenser for ethanol recovery, with cooling tower	11.3%
	Microfiltration unit	4.5%
OPEX	Resin XAD16N periodic disposal and re-integration	25.1%
	Labour costs (plant control + periodic maintenance)	13.3%
	Desorption solvent periodic re-integration (ethanol + HCl)	4.3%
	Electricity for pumping	4.2%
	Solid waste treatment (solids from microfiltration)	1.9%
	Heat for ethanol evaporation	1.6%
	Water periodic re-integration	1.5%

Tabella 7 - Contributi dei costi di costruzione e di quelli operativi sul costo totale

Il prezzo di mercato di PC dipende dalla quantità di PC prodotta all'anno. Per sviluppare un CBA applicabile a diversi tipi di OMW, e non solo alle acque usate in questo lavoro, si è ipotizzato che la concentrazione di PC nell'OMW sia compresa in un intervallo di valori tipici nelle acque di vegetazione, ovvero 0,5-4 g/L. Di conseguenza, la massa di PC desorbiti prodotti ogni anno varia nell'intervallo 3,3-26 tPC/anno. Il prezzo di mercato di PC risultante per generare un ritorno positivo varia nell'intervallo 1,7-13,5 €/kg, a seconda del contenuto di PC nelle acque da trattare (vedi figura 47).

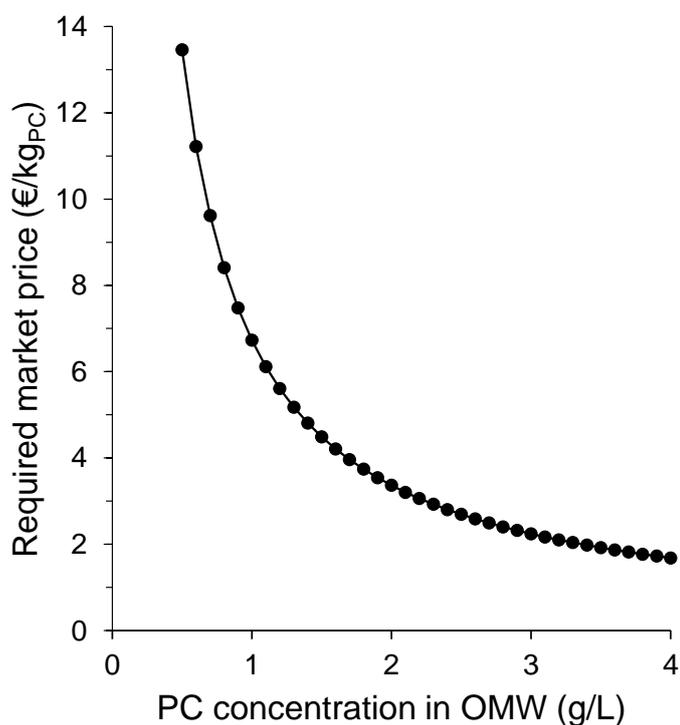


Figura 47 - Prezzo di mercato richiesto per il PC in funzione della concentrazione di PC nell'OMW

Tenendo conto del fatto che il prezzo di mercato di prodotti ricchi in PC varia tra i 250 ed i 2500 €/kg_{PC}, anche se fosse necessario una fase di purificazione del prodotto, il range risultante di prezzo è realisticamente in grado di generare un ritorno positivo.

6 CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi si è contribuito a sviluppare un processo integrato per il trattamento e la valorizzazione delle acque di vegetazione derivanti dalla produzione di olio d'oliva. È stato innanzitutto confermata la possibilità di recuperare polifenoli attraverso un processo di adsorbimento in semi-continuo ed il relativo prodotto desorbito, ossia un estratto ricco in polifenoli, ha dato buoni risultati sia come capacità antiossidante che come potenziale inibitore batteriostatico, se confrontato con prodotti simili attualmente impiegati.

La valutazione ambientale sul processo di adsorbimento ha evidenziato come gli impatti maggiori derivino dal trattamento convenzionale in impianto di depurazione delle acque defenolizzate, dal calore necessario per recuperare il solvente di desorbimento e dal periodico reintegro dello stesso. Questo impatto potrebbe essere ulteriormente ridotto dal momento che le acque di vegetazione impoverite di polifenoli sono risultate essere buoni substrati su cui condurre digestioni anaerobiche, anche se l'obiettivo di abbattere il contenuto di COD e BOD₅ al fine di poterle riutilizzare in agricoltura non è stato raggiunto. Saranno necessari per questo ulteriori studi che valutino la possibilità di condurre una co-digestione o di implementare un trattamento terziario a fanghi attivi a valle della digestione anaerobica.

La valutazione economica del processo di adsorbimento ha però evidenziato come il prezzo di mercato dei polifenoli richiesto per generare un ritorno positivo all'investitore è ragionevole e di conseguenza, questo processo potrebbe essere implementato con successo nelle regioni mediterranee, dal momento che sono caratterizzate da una vasta produzione di acque di vegetazione.

Acknowledgements: This project has received funding from the EU Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 688320 (MADFORWATER project; www.madforwater.eu).

BIBLIOGRAFIA

- ¹ - https://www.corriere.it/ambiente/15_marzo_23/cosmetici-scarti-agricoli-riciclo-resveratrolo-6d58c6a2-d16e-11e4-8608-3dead25e131d.shtml (consultato il 26/02/2019)
- ² - http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures?lang=it_IT (consultato il 26/02/2019)
- ³ - D. Frascari, A. E. M. Bacca, F. Zama, L. Bertin, F. Fava, D. Pinelli, 2016, *Olive mill wastewater valorisation through phenolic compounds adsorption in a continuous flow column*, Chem. Eng. J., 283, 293-303
- ⁴ - M. Incelli, S. Cordiner, S. Tosti, F. Borgognoni, M. Sansovini, A. Santucci, 2016, Trattamento delle acque di vegetazione di oleifici: tecnologie a membrana e processi termochimici, La Chimica e l'Industria WEB, 3(4)
- ⁵ - <https://titano.sede.enea.it/Stampa/Files/Eventi/2007/WorkAcqueVegetazioneOlearie.pdf> (consultato il 28/02/2019)
- ⁶ <https://www.frantoionline.it/forum/viewtopic.php?t=584&start=10> (consultato il 28/02/2019)
- ⁷ - G. Tripodi, D. Pinelli, D. Frascari, A.A. 2016-2017, *Valorizzazione di acque di vegetazione tramite adsorbimento di composti fenolici e digestione anaerobica*, Elaborato finale in Impianti di trattamento degli effluenti inquinanti, Università di Bologna, Scuola di Ingegneria e Architettura, Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale e dei Materiali (DICAM), Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio
- ⁸ - <https://www.madforwater.eu/background/> (consultato il 28/02/2019)
- ⁹ - R. Jarboui, B. Hadrich, N. Gharsallah, E. Ammar, 2009, *Olive mill wastewater disposal in evaporation ponds in Sfax (Tunisia): Moisture content effect on microbiological and physical chemical parameters*, Biodegradation, 20, 845-58.
- ¹⁰ - D. Frascari, G. Rubertelli, F. Arous, A. Ragini, L. Bresciani, A. Arzu, D. Pinelli, 2019, *Valorisation of olive mill wastewater by phenolic compounds adsorption: Development and application of a procedure for adsorbent selection*, Chem. Eng. J., 360, 124-138 *IN PRESS*
- ¹¹ - D. Pinelli, A.E. Molina Bacca, A. Kaushik, S. Basu, M. Nocentini, L. Bertin, D. Frascari, 2016, *Batch and Continuous Flow Adsorption of Phenolic Compounds from Olive Mill Wastewater: A Comparison between Nonionic and Ion Exchange Resins*, Int. J. Chem. Eng. Vol. 2016, Article ID 9349627, 13 pages
- ¹² - O. Levenspiel, 1999, *Chemical Reaction Engineering*, John Wiley & Sons, New York
- ¹³ - ISO 14040, 2006, *Environmental Management - Life Cycle Assessment - Principles and Framework*, International Organisation for Standardisation (ISO), Geneve, Suisse.
- ¹⁴ - European Commission, 2014, *Guide to Cost-Benefit Analysis of Investment Projects, Economic appraisal tool for Cohesion Policy 2014-2020*, Publication Office of the European Union, Luxemburg
- ¹⁵ - I. Wiegand, K. Hilpert, R. E. W. Hancock., 2008, *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substance*, Nature protocols, 3, 163-75
- ¹⁶ - D. Pinelli, AA 2015-2016, *Adsorbimento*, Impianti Chimici-LT Chimica Industriale, Università di Bologna. Slides per le lezioni.
- ¹⁷ - Deliverable interni del progetto MadForWater
- ¹⁸ - D. Frascari, A. E. M. Bacca, T. Wardenaar, E. Oertlé, D. Pinelli, 2019, *Continuous flow adsorption of phenolic compounds from olive mill wastewater with resin XAD16N: life cycle assessment, cost-benefit analysis and process optimization*, J Chem Technol Biotechnol, *IN REVIEW*