

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

---

**SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA**

*DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CIVILE, CHIMICA, AMBIENTALE E DEI MATERIALI*

*CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA PER L'AMBIENTE E IL TERRITORIO*

**TESI DI LAUREA**

in

Microbiologia e biotecnologia per il disinquinamento M

**Produzione di miscele di acidi grassi volatili ad alto contenuto di acido  
caproico mediante fermentazione acidogenica di vinacce rosse**

CANDIDATA  
Giulia Capitani

RELATORE:  
Prof. Lorenzo Bertin

CORRELATORI  
Joana M.B. Domingos  
Gonzalo A. Martinez

Anno Accademico 2016/2017

Sessione II



# Sommario

1	Introduzione .....	1
1.1	Uno dei principali scarti agro-industriali della regione del Mediterraneo: la vinaccia ...	4
1.2	Normativa riguardante l'utilizzo dei sottoprodotti della vinificazione in Europa e Italia	5
1.3	La fermentazione anaerobica come strumento per valorizzare scarti agroindustriali....	7
1.3.1	Parametri di processo .....	8
1.3.2	Produzione di acidi grassi volatili .....	9
1.3.3	Tecnologie di produzione dei VFAs .....	11
2	Obiettivi.....	13
3	Materiali e metodi .....	15
3.1	Substrato e inoculo .....	15
3.2	Set-up sperimentale.....	15
3.2.1	Produzione di acido caproico da GP <sub>Fresh</sub> : <i>screening delle condizioni ottimali di pH e temperatura a scala di microcosmo</i> .....	15
3.2.2	Prove in batch utilizzando un fermentatore di banco .....	16
3.2.3	Studio della cinetica di produzione di acido caproico da GP <sub>Fresh</sub> .....	19
3.2.4	Produzione di acido caproico: <i>processo in continuo</i> .....	20
3.3	Procedure analitiche .....	20
3.3.1	Determinazione del contenuto di solidi totali e volatili .....	20
3.3.2	Determinazione della concentrazione di etanolo e di acidi organici .....	21
3.3.3	Determinazione della produzione di biogas .....	22
4	Risultati.....	23

4.1	Contenuto di solidi totali, volatili ed etanolo della GP <sub>Fresh</sub> .....	23
4.2	Produzione di acido caproico da GP <sub>Fresh</sub> : <i>screening delle condizioni ottimali di pH e temperatura a scala di microcosmo</i> .....	23
4.3	Prove in batch utilizzando un fermentatore di banco .....	26
4.4	Studio della cinetica di produzione di acido caproico da GP <sub>Fresh</sub> .....	34
4.5	Produzione di acido caproico: <i>processo in continuo</i> .....	38
5	Discussioni .....	41
5.1	Produzione di acido caproico da GP <sub>Fresh</sub> : <i>screening delle condizioni ottimali di pH e temperatura a scala di microcosmo</i> .....	41
5.2	Prove in batch utilizzando un fermentatore di banco .....	42
5.3	Studio della cinetica di produzione di acido caproico da GP <sub>Fresh</sub> .....	43
5.4	Produzione di acido caproico: <i>processo in continuo</i> .....	45
6	Conclusioni .....	47
7	Bibliografia .....	49

# Indice delle figure

<b>Figura 1</b> Coltivazioni maggiormente diffuse nel Sud Europa con riferimento all'anno 2014. Fonte: FAOSTAT.....	2
<b>Figura 2</b> Produzione di vino espressa in milioni di ettolitri suddivisa nei principali paesi produttori. Anno di riferimento 2017, ad esclusione della Cina (anno di riferimento 2016). Fonte: Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino. ....	2
<b>Figura 3</b> Diagramma a blocchi del processo di produzione del vino <sup>16</sup> . ....	3
<b>Figura 4</b> Quantità di vinaccia prodotta dal 2004 al 2016 in Italia, Francia e Spagna. ....	4
<b>Figura 5</b> Tipi di reattori utilizzati per la fermentazione anaerobica <sup>8</sup> . a) Reattore a letto impaccato; b) Reattore a letto fluidizzato; c) Reattore a letto fluidizzato con flusso ascendente (UASB); d) Reattore continuo perfettamente miscelato (CSTR). ....	11
<b>Figura 6</b> Da uno schema di bioraffineria tradizionale per il recupero di etanolo da GP (in grigio) a una strategia di valorizzazione della vinaccia (a colori). La fattibilità del recupero di polifenoli e acidi carbossilici a corta catena era stato dimostrato in precedenza (linee blu). Il progetto in questione propone di bypassare il processo di estrazione (linea rossa) per convertire l'etanolo in acidi carbossilici a media catena. ....	13
<b>Figura 7</b> Microcosmi per lo studio della condizione di pH ottimale. ....	16
<b>Figura 8</b> Set-up della prova in batch, costituita da A) fermentatore; B) agitatore magnetico; C) bagno termico; D) elettrodo per la misura del pH; E) controller del pH; F) pompa peristaltica e bottiglia contenente NaOH; G) valvola di non ritorno; H) valvola di sfiato; I) bottiglia Mariotte; L) cilindro graduato collegato al sistema Mariotte. ....	17
<b>Figura 9</b> Microcosmi per lo studio della cinetica, in ordine crescente di concentrazione di TS da sinistra verso destra. L'ultimo è la condizione di controllo. ....	19

<b>Figura 10</b> Trend di concentrazione dei metaboliti e biogas prodotto (accumulato) per le condizioni di temperatura e pH studiate: 37°C (indicati con 1 e 3), 50°C (indicati con 2 e 4), alle corrispondenti condizioni di pH 5 (a), 6 (b) e 7 (c).....	24
<b>Figura 11</b> Andamento del pH misurato nelle tre condizioni valutate a 37°C.....	25
<b>Figura 12</b> (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del 1° batch, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs). Le frecce blu tratteggiate indicano l'aggiunta di etanolo sintetico, le rosse l'aggiunta di GP <sub>Fresh</sub> . (B) Trend del pH misurato.....	26
<b>Figura 13</b> (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del 2° batch, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs). (B) Trend del pH misurato.....	28
<b>Figura 14</b> (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del 3° batch, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs). (B) Trend del pH misurato.....	29
<b>Figura 15</b> (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del 4° batch, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs).(B) Trend del pH misurato.....	30
<b>Figura 16</b> (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del 5° batch, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs). (B) Trend del pH misurato.....	32
<b>Figura 17</b> (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del 6° batch, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs). (B) Trend del pH misurato.....	33
<b>Figura 18</b> Trend di concentrazione dei metaboliti delle sei condizioni valutate per lo studio della cinetica.....	35

**Figura 19** (A) Trend di consumo dell’etanolo. (B) Trend di produzione dell’acido caproico. La freccia rossa indica l’andamento di produzione dell’acido caproico dalla condizione 25.6 g<sub>TS</sub>/L alla 153.8 g<sub>TS</sub>/L..... 36

**Figura 20** Velocità specifiche di produzione di acido caproico osservate per le diverse concentrazioni di GP<sub>Fresh</sub>..... 37

**Figura 21** (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del processo continuo, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs). (B) Trend del pH misurato..... 39

## Indice delle tabelle

<b>Tabella 1</b> Caratterizzazione di una vinaccia da uve rosse. DM=dry matter. ....	5
<b>Tabella 2</b> Condizioni valutate per lo studio della cinetica di fermentazione. ....	19

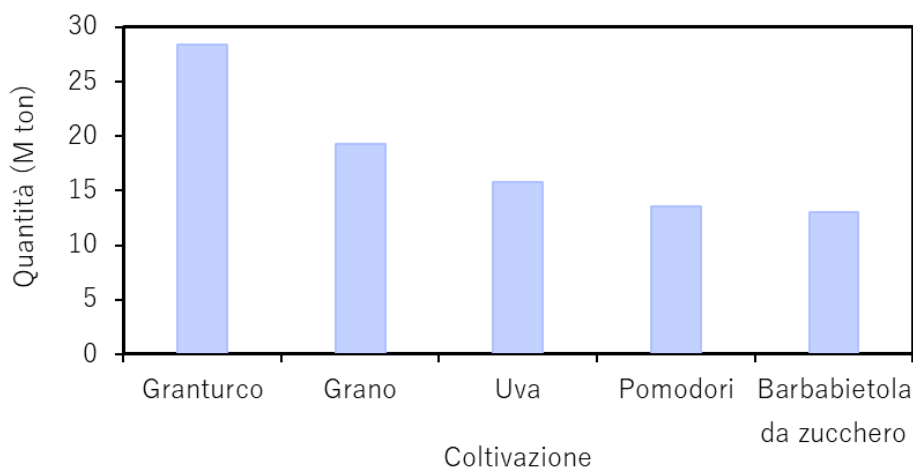


# 1 Introduzione

La rapida crescita della popolazione nel mondo e il conseguente incremento del consumo alimentare hanno portato negli ultimi anni ad un'ingente produzione di scarti di natura organica. Se immessi nell'ambiente senza trattamenti adeguati, questi scarti possono creare un danno all'ecosistema, per cui una corretta gestione degli stessi è un aspetto cruciale per minimizzare l'impatto ambientale che ne deriva. Inoltre, il massiccio impiego di risorse fossili non rinnovabili su cui si basa attualmente la produzione industriale di materiali ed energia desta sempre maggiori preoccupazioni.

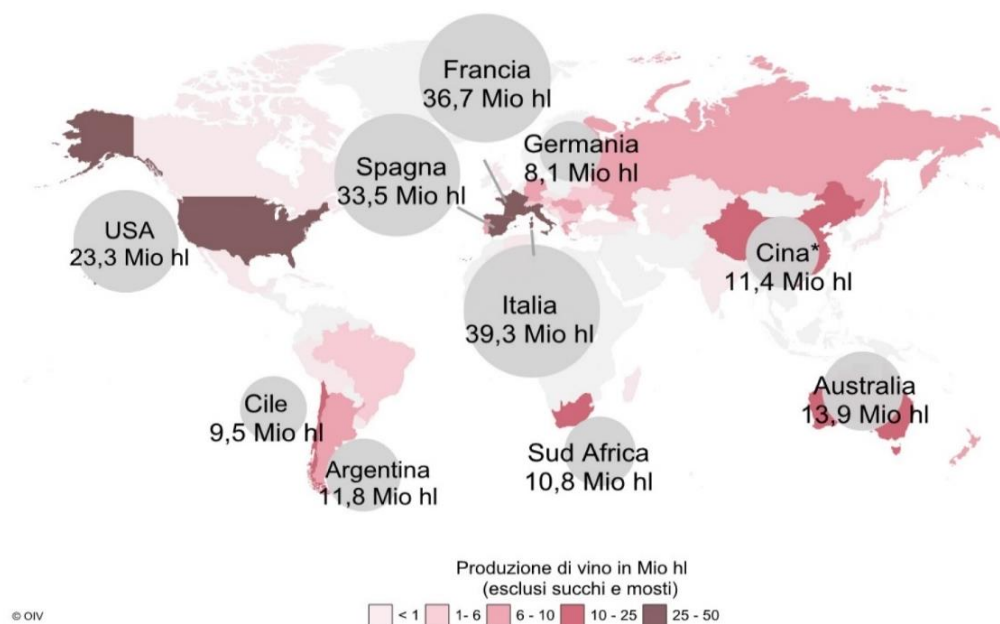
L'utilizzo di residui e sottoprodotti organici come materie prime alternative può limitare significativamente la domanda di risorse fossili; al contempo può consentire lo sfruttamento degli scarti stessi, aumentando la sostenibilità economica delle attività industriali da cui sono stati prodotti. Nel contesto dell'economia circolare l'approccio della valorizzazione degli scarti organici rappresenta dunque un'opportunità per fronteggiare la sfida legata alla dipendenza dalle fonti fossili e alla loro scarsità, nell'ottica di promuovere una crescita sostenibile.

Generalmente, gli scarti organici possono essere classificati in agroindustriali, zootecnici, forestali e urbani. Con riferimento ai primi, esistono coltivazioni e processi che portano in maggior misura alla formazione degli scarti. Secondo l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura, le coltivazioni maggiormente diffuse nel Sud Europa sono granturco, grano, uva, pomodoro e barbabietola da zucchero<sup>1</sup>, come mostrato nella **Figura 1**:



**Figura 1** Coltivazioni maggiormente diffuse nel Sud Europa con riferimento all'anno 2014. Fonte: FAOSTAT.

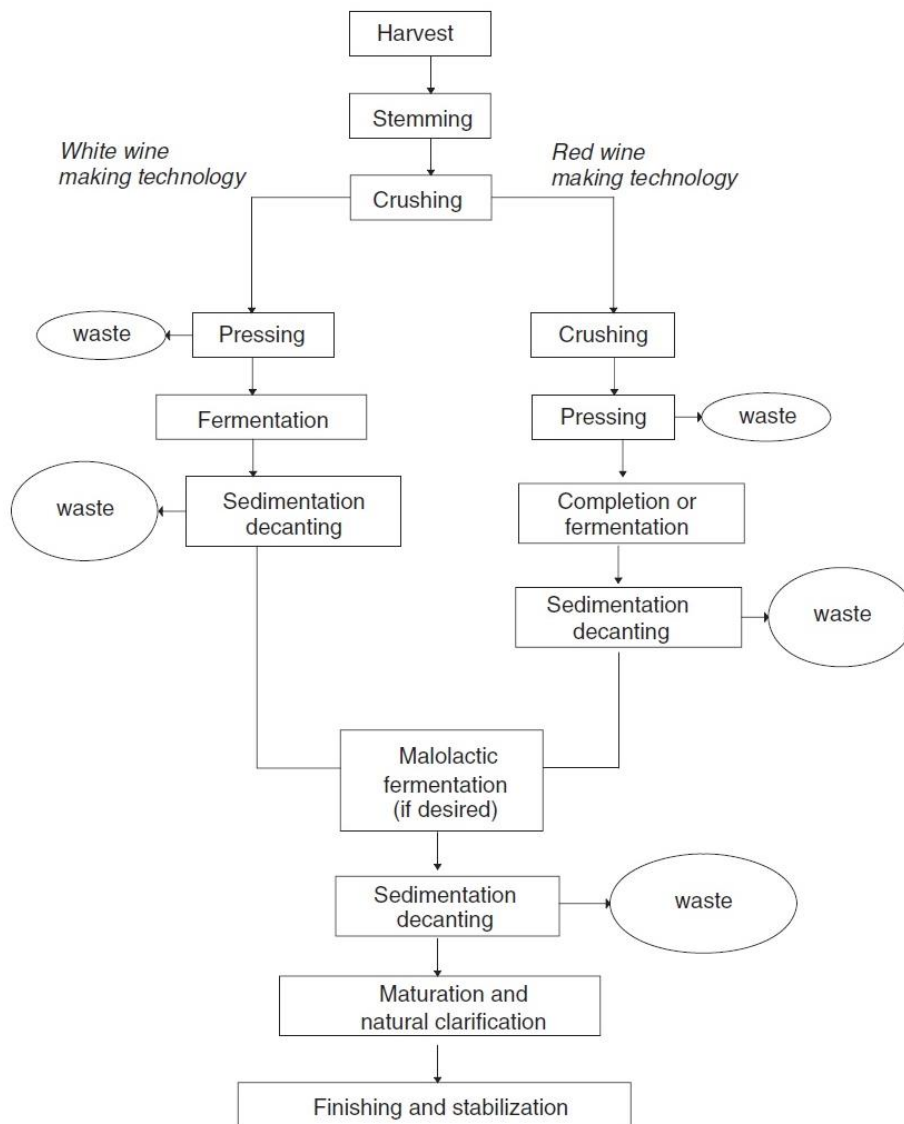
In particolare si nota che nell'anno 2014 nel Sud Europa sono stati prodotti oltre 15 milioni di tonnellate d'uva, i quali sono destinati principalmente all'industria vinicola. Secondo l'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino, globalmente nell'anno 2017 sono stati



**Figura 2** Produzione di vino espressa in milioni di ettolitri suddivisa nei principali paesi produttori. Anno di riferimento 2017, ad esclusione della Cina (anno di riferimento 2016). Fonte: Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino.

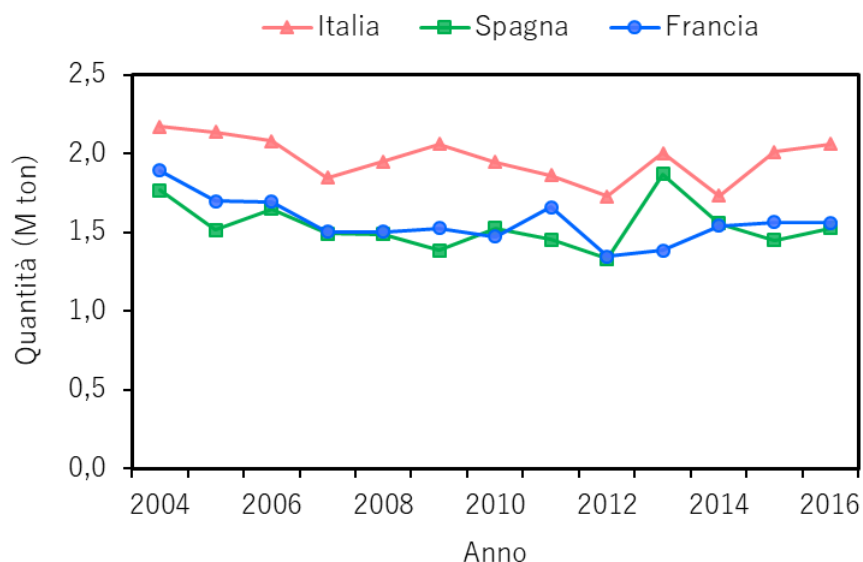
prodotti 247 milioni di ettolitri di vino<sup>2</sup>, in calo di oltre l'8% rispetto al 2016 a causa dei fenomeni climatici che hanno interessato i principali paesi produttori in Europa. Di questi 247 milioni, circa il 45% è prodotto da Francia, Spagna e Italia, la quale è leader a livello mondiale (**Figura 2**).

Durante i processi che portano alla produzione del vino, illustrati nella **Figura 3**, si generano vari tipi di scarti solidi e liquidi. La materia solida di scarto è costituita principalmente da vinaccia, feccia e raspi.



**Figura 3** Diagramma a blocchi del processo di produzione del vino<sup>16</sup>.

## 1.1 Uno dei principali scarti agro-industriali della regione del Mediterraneo: la vinaccia



**Figura 4** Quantità di vinaccia prodotta dal 2004 al 2016 in Italia, Francia e Spagna.

La vinaccia (in inglese *grape pomace* -  $GP_{Fresh}$ ) è il maggior sottoprodotto solido del processo di vinificazione ed è costituita da bucce, gambi e semi. La quantità ottenibile dipende dal tipo di uva e dalla fase di pressatura e generalmente è compresa tra il 20 e il 30% in peso dell'uva<sup>3</sup>. Nella **Figura 4** sono rappresentate le quantità di vinaccia prodotta, espresse in milioni di tonnellate, nei tre principali paesi produttori tra il 2004 e il 2016, secondo l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura<sup>1</sup>.

Caratteristica peculiare della produzione di vino è la stagionalità. La vendemmia avviene una volta all'anno e ha una durata di circa tre mesi. In accordo con i dati appena mostrati, è facilmente intuibile come un'ingente quantità di scarti, prodotta in un periodo così breve, possa rappresentare un vero problema sia a livello gestionale sia a livello ambientale. Le proprietà della vinaccia la rendono infatti una materia non prontamente biodegradabile, pertanto, se rilasciata in ambiente senza adeguati pretrattamenti, l'impatto che ne deriva non è trascurabile.

Oltre ad emettere odori sgradevoli, si possono avere problemi di inquinamento del terreno e delle acque superficiali o sotterranee. La vinaccia presenta infatti un alto contenuto di sostanze fenoliche dotate di spiccate proprietà antiossidanti e antimicrobiche, quindi resistenti alla degradazione biologica. Inoltre è caratterizzata da pH acido<sup>4</sup>. La **Tabella 1** indica i contenuti medi di una vinaccia ottenuta dalla produzione di un vino rosso<sup>5</sup>:

**Tabella 1** Caratterizzazione di una vinaccia da uve rosse. DM=dry matter.

	Valore	Dev st ( $\pm$ )
Contenuto d'acqua (%)	7,12	0,25
Fibra alimentare totale (% DM)	49,40	0,90
Lipidi (% DM)	10,61	0,18
Proteine (% DM)	13,09	1,51
Cenere (% DM)	10,73	0,13
Polifenoli ( $\text{mg}_{\text{acido gallico}}/\text{g}$ )	32,49	0,26
Potassio ( $\text{mg}/\text{g}_{\text{DM}}$ )	38,20	1,26
Calcio ( $\text{mg}/\text{g}_{\text{DM}}$ )	3,13	0,20
Fosforo ( $\text{mg}/\text{g}_{\text{DM}}$ )	2,57	0,18
Sodio ( $\text{mg}/\text{g}_{\text{DM}}$ )	0,98	0,07

## 1.2 Normativa riguardante l'utilizzo dei sottoprodotti della vinificazione in Europa e Italia

La gestione degli scarti ottenuti dalla produzione di vino è soggetta a normativa. Le vinacce e le fecce, al termine del processo di pressatura dell'uva, possiedono ancora un certo grado alcolico, per cui applicando ulteriormente una sovrappressione è possibile ottenere altro vino,

tuttavia di qualità scadente. Per contrastare questa operazione e preservare la qualità del vino, la Comunità Europea con il Regolamento 1493/1999 aveva imposto il conferimento obbligatorio in distilleria degli scarti, imponendo che le vinacce al momento del ritiro possedessero ancora un determinato contenuto minimo d'alcol.

Successivamente, tramite i Regolamenti CE 479/2008 e 555/2008 (attuati in Italia con il D.M. 5396/2008, poi modificato con il D.M. 7407/2010), è stato revocato l'obbligo di consegna in distilleria e sono state introdotte alcune alternative. In particolare è previsto il ritiro sotto controllo per i seguenti usi alternativi:

- uso agronomico diretto, mediante la distribuzione dei sottoprodotti nei terreni agricoli, sotto opportune condizioni e limitazioni;
- uso agronomico indiretto, mediante l'utilizzo dei sottoprodotti per la preparazione di fertilizzanti;
- uso energetico, mediante l'utilizzo dei sottoprodotti quale biomassa per la produzione di biogas o per alimentare impianti per la produzione di energia, utilizzati anche congiuntamente ad altre fonti energetiche;
- uso farmaceutico, mediante l'utilizzo dei sottoprodotti per la preparazione di farmaci;
- uso cosmetico, mediante l'utilizzo dei sottoprodotti per la preparazione di cosmetici.

Attualmente il trattamento degli scarti della vinificazione è finalizzato principalmente all'ottenimento di etanolo. In alternativa sono prodotti mosto concentrato e acido tartarico. Il primo è utilizzato come additivo al mosto d'uva per aumentarne il contenuto zuccherino e di conseguenza il tenore alcolico del vino; l'altro trova invece largo impiego nel settore alimentare, farmaceutico e delle costruzioni. Ulteriori sostanze che possono essere estratte dalla vinaccia sono i composti fenolici, caratterizzati da un ampio spettro di interessanti proprietà fisiologiche (antimicrobiche, antiossidanti, antitrombotiche, cardioprotettive), l'enocianina, un colorante

naturale dell'uva utilizzato per colorare bevande alcoliche, confetture, dolci e altri prodotti, le fibre dietetiche e l'olio di semi d'uva, utilizzati nel settore alimentare<sup>6</sup>. Tra i possibili usi alternativi alla distillazione si colloca anche la produzione di acidi grassi volatili tramite fermentazione anaerobica.

### **1.3 La fermentazione anaerobica come strumento per valorizzare scarti agroindustriali**

La fermentazione anaerobica è un processo secondo il quale in assenza di ossigeno i composti biodegradabili presenti nella sostanza organica di cui è costituito il substrato sono convertiti in altri prodotti. Il processo avviene a opera di diversi gruppi microbici che interagiscono tra loro.

La fermentazione anaerobica può essere suddivisa in quattro fasi principali:

- fase idrolitica: si ha l'idrolisi delle sostanze organiche complesse con formazione di composti semplici come carboidrati e amminoacidi;
- fase acidogenica: scissione in sostanze ancora più semplici quali gli acidi grassi volatili (VFA);
- fase acetogenica: le sostanze semplici prodotte nelle fasi precedenti sono ulteriormente digerite con la produzione di biossido di carbonio, idrogeno e acido acetico;
- fase metanogenica: produzione di metano e biossido di carbonio.

La produzione di acidi grassi volatili avviene durante la fase acidogenica, per cui è fondamentale inibire le successive fasi del processo, acetogenica e metanogenica.

### 1.3.1 Parametri di processo

I principali parametri che regolano il processo fermentativo sono pH, temperatura, concentrazione di solidi totali e tempo di residenza idraulico. L'analisi di questi parametri deve essere complessiva, in quanto la variazione di un singolo parametro, se non accompagnata da un monitoraggio complessivo di tutti gli altri parametri, risulta difficilmente interpretabile.

Il pH è un parametro fondamentale per la corretta gestione del processo fermentativo. È stato infatti dimostrato che il valore di pH al quale è condotta la fermentazione influenza la composizione dei VFA prodotti<sup>7</sup>. Il pH in un digestore è determinato essenzialmente dalla presenza di CO<sub>2</sub> nel mezzo liquido, dalle concentrazioni degli acidi grassi volatili e dell'ammoniaca. La maggior parte delle specie batteriche acidogeniche sopravvive in un range da 3 a 12. Il valore ottimale va da 5.25 a 11, ma dipende fortemente dal tipo di scarto utilizzato<sup>8</sup>.

La temperatura è un altro parametro importante in quanto influisce sulla velocità di reazione. I tipici intervalli di temperatura utilizzati nei processi di fermentazione anaerobica sono il mesofilo (da 25° C a 40° C) e il termofilo (oltre i 40° C). Dato che i processi di degradazione anaerobica sono determinati dall'attività di popolazioni microbiche eterogenee, l'effetto delle variazioni di temperatura è particolarmente importante. Ciò è imputabile al fatto che, al variare della temperatura, non si ha un semplice rallentamento o accelerazione dei processi metabolici, ma la vera e propria sostituzione di popolazioni batteriche, che risultano presenti solo in alcuni ristretti intervalli di temperatura.

La concentrazione di solidi totali influenza la cinetica di produzione degli acidi grassi volatili. A basse concentrazioni di substrato la resa di produzione è bassa, mentre aumenta fino ad un valore asintotico al crescere dei TS. Tuttavia, a causa di fenomeni di inibizione e di impedimento del trasferimento di materia, da un certo valore in poi la resa diminuisce. È quindi importante conoscere il range di TS ottimale per avere una buona produzione.



Notevole importanza è rivestita dal tempo medio di residenza idraulico (HRT, Hydraulic Retention Time), definito come il rapporto tra il volume del reattore e la portata di alimentazione del reattore:

$$\text{HRT} = V / Q$$

HRT: tempo medio di residenza idraulico (giorni), V: volume del reattore (m<sup>3</sup>), Q: portata in ingresso al reattore (m<sup>3</sup>/giorno).

L'HRT rappresenta il tempo di permanenza medio di un elemento di fluido all'interno di un reattore. Un HRT troppo elevato porterebbe ad un ricambio molto rapido del volume del reattore, con il rischio di perdere la biomassa (wash out). Viceversa, con un HRT troppo basso il substrato fornito alla biomassa è insufficiente.

Un ulteriore aspetto da tenere in considerazione è la scelta delle colture microbiche da utilizzare. La scelta principale riguarda l'utilizzo di colture pure o di colture miste. Nel primo caso, la fermentazione viene condotta in presenza di una sola specie batterica selezionata. Questo permette di avere una maggiore resa del processo, ma richiede l'utilizzo di più risorse per mantenere la sterilità del reattore. Viceversa, nel caso dell'utilizzo di colture miste, non è necessario prendere precauzioni per mantenere il processo isolato da agenti contaminanti. Inoltre la flessibilità metabolica conferita dalle molte specie microbiche della comunità permette di tollerare la complessità e la variabilità dei substrati da trattare. Di contro, nella maggior parte dei casi la resa risulta essere inferiore rispetto a quella raggiungibile mediante l'utilizzo di colture pure.

### 1.3.2 Produzione di acidi grassi volatili

Gli acidi grassi volatili (VFA – *Volatile Fatty Acids*) sono acidi carbossilici a medio-corta catena, costituiti cioè da un numero pari o inferiore a sei carboni: acido acetico (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>),

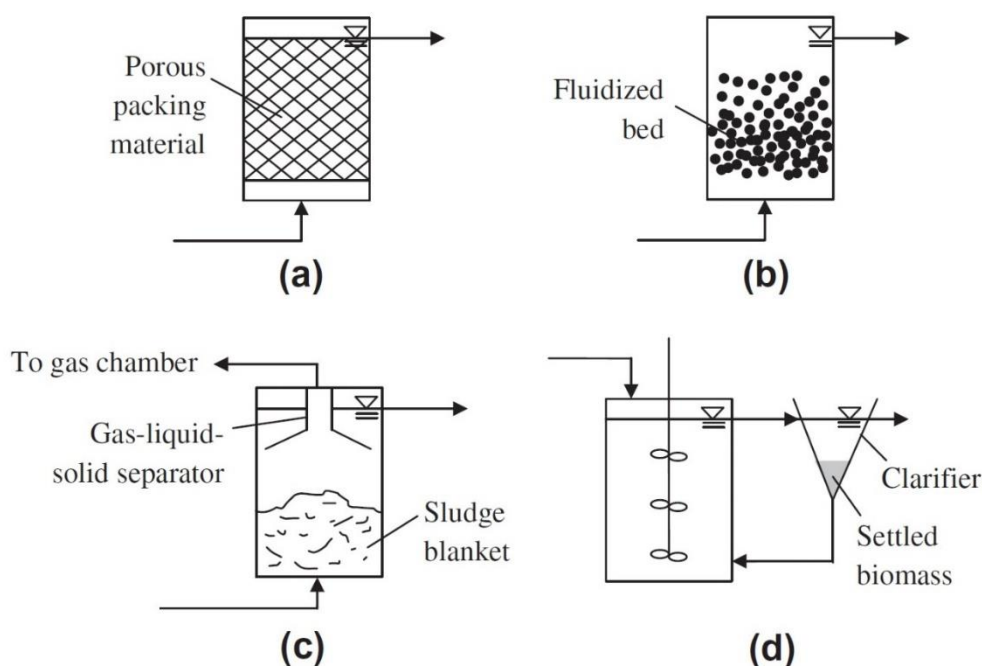
propionico ( $C_3H_6O_2$ ), isobutirrico e butirrico ( $C_4H_8O_2$ ), isovalerico e valerico ( $C_5H_{10}O_2$ ), isocaproico e caproico ( $C_6H_{12}O_2$ ). Questi acidi trovano applicazione in vari settori. Possono essere utilizzati per produrre bioplastiche, bioenergia attraverso le *microbial fuel cell*, idrogeno, biogas ricco in metano e per la rimozione biologica di nutrienti da acque reflue<sup>8,9</sup>. Ogni VFA possiede caratteristiche diverse ed attraverso la gestione dei parametri operativi quali pH, temperatura, HRT e carico organico è possibile variare la concentrazione, la resa e la composizione dei VFAs prodotti dagli scarti.

Come già accennato, il trattamento della vinaccia è generalmente orientato al recupero dell'etanolo tramite distillazione. Un'interessante alternativa consiste nella produzione di VFAs e, nello specifico, di acido caproico, il quale risulta un prodotto di maggior valore rispetto all'etanolo. Rispetto a quest'ultimo, infatti, il rapporto tra ossigeno e carbonio dell'acido caproico è inferiore, e questo gli conferisce una maggiore densità di energia. Inoltre la sua bassa solubilità, a causa della catena idrofobica a sei carboni, facilita considerevolmente il processo di estrazione, e ciò rappresenta indubbiamente un vantaggio se confrontato al processo energivoro di distillazione dell'etanolo<sup>10</sup>. Alcuni ricercatori hanno infatti dimostrato che il recupero dell'etanolo richiede una quantità di energia compresa tra il 15% e il 20% dell'energia stessa dell'etanolo<sup>11</sup>.

Le applicazioni dell'acido caproico trovano spazio in vari campi: può essere utilizzato come precursore nella produzione di biodiesel e di altri prodotti chimici derivanti da biomassa, come agente antimicrobico nell'industria farmaceutica, come additivo nei mangimi per animali, come aroma nel settore alimentare<sup>12,13</sup>. Inoltre, può essere impiegato per produrre poliidrossialcanoati, poliesteri accumulati da batteri aerobici, completamente biodegradabili, che possono sostituire le plastiche tradizionali in determinate applicazioni. L'acido caproico risulta quindi una sostanza di maggior valore rispetto all'etanolo ed attualmente è ottenuto per via petrolchimica<sup>14</sup>, pertanto una produzione dello stesso a partire da scarti organici agroindustriali è di grande interesse.

### 1.3.3 Tecnologie di produzione dei VFAs

Le tecnologie comunemente utilizzate per la fermentazione anaerobica di scarti organici sono a biomassa adesa o a biomassa sospesa. In base a questa distinzione, sono stati sviluppati diversi tipi di reattori, di cui i principali sono a letto impaccato, a letto fluidizzato, a letto fluidizzato con flusso ascendente (UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*) e continuo a perfetta miscelazione (CSTR - *Continuous Stirred Tank Reactor*), illustrati nella **Figura 5**.



**Figura 5** Tipi di reattori utilizzati per la fermentazione anaerobica<sup>8</sup>. a) Reattore a letto impaccato; b) Reattore a letto fluidizzato; c) Reattore a letto fluidizzato con flusso ascendente (UASB); d) Reattore continuo perfettamente miscelato (CSTR).

Il primo tipo di reattore, a letto impaccato, è a biomassa adesa e può presentare problemi se la concentrazione di TS del substrato è elevata. Nel secondo reattore il letto è invece fluidizzato, per cui il materiale su cui la biomassa è adesa è in movimento e si evitano in questo modo problemi di intasamento. Al contrario, gli ultimi due tipi di reattori sono a biomassa sospesa. Il funzionamento del reattore UASB è basato sulla formazione di aggregati batterici (fiocchi) tali da originare un letto ad alta concentrazione di biomassa, separato dalla fase liquida

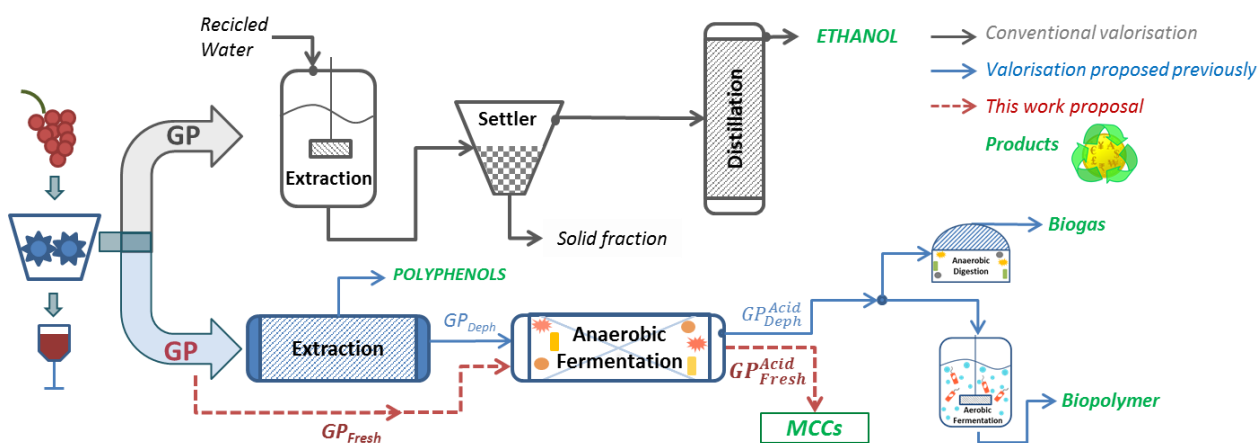
sovrastante, costituita da una modesta concentrazione di solidi sospesi. Nel CSTR si ha la completa miscelazione di biomassa e scarti, grazie ad un opportuno sistema di agitazione ed eventualmente alla presenza di deflettori. Questo tipo di reattore, data l'omogeneità che si riesce ad ottenere al suo interno, garantisce un buon controllo del pH. Per reazioni che richiedono lunghi tempi di permanenza, è possibile convertire il CSTR in un *fed-batch*, alimentando e prelevando il liquido in modo intermittente anziché secondo un processo continuo.

Il meccanismo di produzione dei VFAs avviene mediante un processo ciclico di allungamento della catena (in inglese *chain elongation*). Diversi studi hanno dimostrato che, sotto opportune condizioni operative, è possibile allungare la catena di carboni degli acidi carbossilici in presenza di colture pure o miste e di un donatore di elettroni, quali l'etanolo, il lattato, il metanolo, il piruvato o il propanolo<sup>11</sup>.

Se il ruolo di donatore di elettroni è assunto dall'etanolo, questo è dapprima ossidato ad acetil-CoA. Attraverso una reazione di  $\beta$ -ossidazione inversa la molecola di acetil-CoA, contenente due atomi di carbonio, viene aggiunta all'acido carbossilico, per cui ad ogni ciclo la catena di carboni dell'acido è allungata con due atomi<sup>11</sup>. Nel caso degli acidi con un numero pari di atomi di carbonio, a partire da acido acetico ed etanolo si ottiene quindi acido butirrico; al ciclo successivo dal butirrico si ottiene acido caproico.

## 2 Obiettivi

L'obiettivo di questa tesi è lo studio della produzione di acidi organici a catena media tramite la fermentazione anaerobica di vinacce provenienti da uve rosse; questo come alternativa al sovvenzionato recupero di etanolo tramite distillazione (**Figura 6**).



**Figura 6** Da uno schema di bioraffineria tradizionale per il recupero di etanolo da GP (in grigio) a una strategia di valorizzazione della vinaccia (a colori). La fattibilità del recupero di polifenoli e acidi carbossilici a corta catena era stato dimostrato in precedenza (linee blu). Il progetto in questione propone di bypassare il processo di estrazione (linea rossa) per convertire l'etanolo in acidi carbossilici a media catena.

Più specificatamente, gli obiettivi sono i seguenti:

- Screening delle condizioni di pH e temperatura a scala di microcosmo (100 mL)
- Ottenimento di un inoculo (microbioma) specifico per la produzione di acido caproico tramite l'applicazione di batch sequenziali in un fermentatore di 0,5 L
- Studio della cinetica di produzione di acido caproico da vinacce rosse
- Studio della produzione in continuo.



## 3 Materiali e metodi

### 3.1 Substrato e inoculo

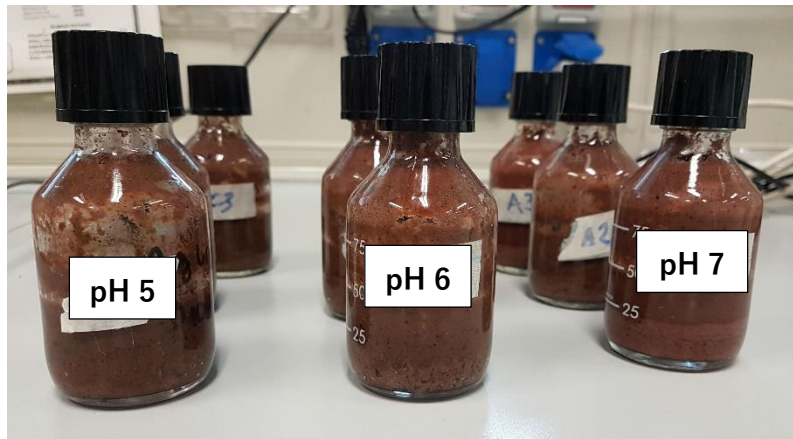
La vinaccia utilizzata per questo studio, proveniente da uve rosse, è stata fornita da un'azienda produttrice di vino della regione Emilia Romagna. Preliminarmente agli esperimenti, sono state analizzate le caratteristiche della vinaccia in termini di contenuto di solidi totali (TS), di solidi volatili (VS) e di etanolo.

Inizialmente per la fermentazione della vinaccia è stato utilizzato un inoculo acidogenico ottenuto da precedenti processi fermentativi in continuo per la produzione di acidi grassi volatili a partire da scarti ortofrutticoli. Il medesimo è stato acclimatato mediante l'applicazione di una fermentazione anaerobica (processo batch) alimentata con vinaccia.

### 3.2 Set-up sperimentale

#### 3.2.1 Produzione di acido caproico da $GP_{\text{Fresh}}$ : *screening delle condizioni ottimali di pH e temperatura a scala di microcosmo*

Il test è stato realizzato in bottiglie di vetro Pyrex da 100 mL (volume operativo 50 mL, **Figura 7**), sigillate con un setto di silicone e da un tappo a vite modificato per consentire il campionamento del biogas. Tutte le condizioni sono state preparate con una quantità di  $GP_{\text{fresh}}$  tale da avere 11% di TS e inoculate in quantità equivalente al 4% v/v. L'inoculo utilizzato è stato ottenuto dalla precedente acclimatazione. Sono state valutate tre diverse condizioni di pH (5, 6, 7) ciascuna delle quali è stata condotta in triplicato. Le condizioni di incubazione sono state 37°C e 150 rpm (agitatore orbitale Stuart SSL1).



**Figura 7** Microcosmi per lo studio della condizione di pH ottimale.

I microcosmi sono stati monitorati con frequenza giornaliera mediante l'applicazione della seguente procedura: 1) estrazione dei microcosmi dall'incubatore; 2) raffreddamento a temperatura ambiente; 3) misura del volume di biogas prodotto utilizzando una siringa di vetro graduata; 4) collegamento del microcosmo al  $\mu$ GC (vedi **par. 3.3.3**) per valutare la composizione del biogas; 5) campionamento del brodo di fermentazione (500  $\mu$ L) tramite una micropipetta; 6) misura e controllo manuale del pH (aggiunta di NaOH o HCl 2 M).

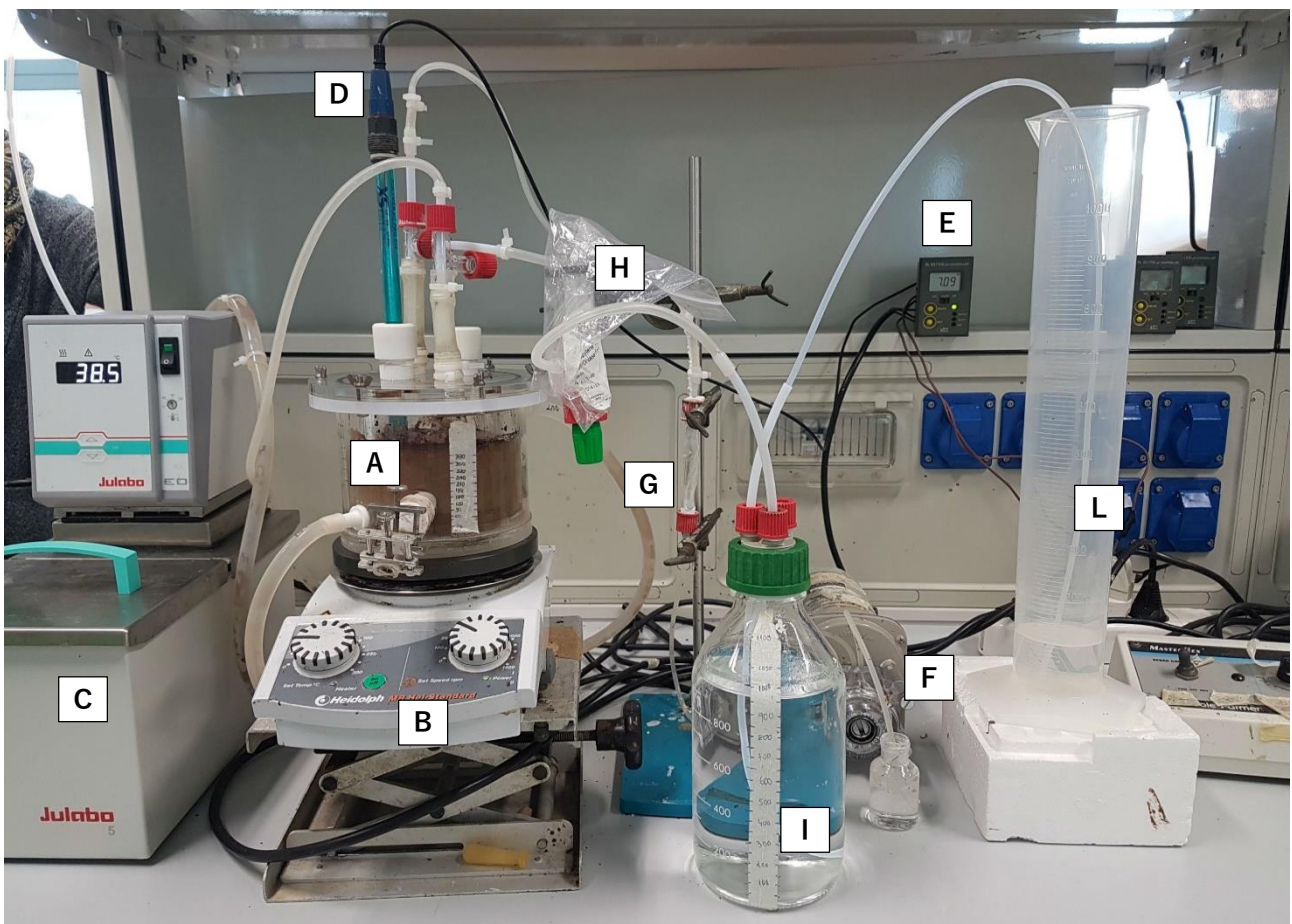
Durante le ultime due fasi è stato mantenuto un flusso di azoto all'interno della bottiglia per prevenire l'entrata di ossigeno.

### 3.2.2 Prove in batch utilizzando un fermentatore di banco

Data l'importanza del pH come parametro di processo, è stata valutata la produzione in un fermentatore di banco con controllo automatico del pH. Inoltre, l'applicazione di batch sequenziali ha consentito di sviluppare un consorzio di microorganismi (microbioma) dedicato alla produzione di acido caproico. I processi batch sono stati allestiti impiegando un fermentatore del tipo STR (**Figura 8 A**) incamiciato con volume operativo di 0,3 L (volume nominale 0,5 L), collegato ad un bagno termico (**Figura 8 C**) per mantenere la temperatura a



37°C. Per la miscelazione, è stato utilizzato un agitatore magnetico (250 rpm, Heidolph MR Hei-Standard; **Figura 8 B**) e un magnete. Il pH è stato controllato in automatico mediante l'impiego di un controllore (Hanna Instruments BL 931700; **Figura 8 E**) collegato ad una pompa peristaltica (Masterflex 7013-20; ; **Figura 8 F**) che aggiunge NaOH (5 M). Lo spazio di testa è collegato ad una valvola di sfiato (per evitare contro pressione, mantenendo una lieve sovrappressione di 0,05 bar circa; **Figura 8 H**) e questa ad un sistema Mariotte (**Figura 8 I, L**) che consente di misurare il volume di biogas prodotto e mantenere il fermentatore a pressione atmosferica. Specificatamente, detto sistema è costituito da una bottiglia da 1 L chiusa e riempita con una



**Figura 8** Set-up della prova in batch, costituita da A) fermentatore; B) agitatore magnetico; C) bagno termico; D) elettrodo per la misura del pH; E) controller del pH; F) pompa peristaltica e bottiglia contenente NaOH; G) valvola di non ritorno; H) valvola di sfiato; I) bottiglia Mariotte; L) cilindro graduato collegato al sistema Mariotte.

quantità nota d'acqua, il cui spazio di testa è collegato a quello del reattore. Un tubo immerso nell'acqua della bottiglia connette la medesima ad un cilindro graduato, anch'esso parzialmente riempito d'acqua. Quando viene prodotto biogas, la pressione sul pelo libero della bottiglia aumenta, provocando un flusso di acqua verso il cilindro.

Il primo batch è stato avviato come descritto nel **paragrafo 3.1**. Successivamente, la procedura con cui tutti i batch sequenziali sono stati impostati è stata la seguente: 1) separazione dei solidi grossolani mediante filtrazione con garza del brodo di fermentazione proveniente dal previo processo batch; 2) centrifugazione (12000 rpm, 10 min, 6 °C) per recuperare le cellule (scartando il surnatante); 3) risospensione del pellet in 120 mL di acqua mediante l'impiego di un vortex (10 min); 4) aggiunta di  $GP_{Fresh}$  triturrata e acqua in quantità tali da avere un contenuto di TS del 11%; 5) correzione del pH al valore ottimale mediante l'aggiunta di NaOH (5 M); 6) immissione di azoto nel reattore per rispettare la condizione di anaerobiosi; 7) predisposizione del sistema Mariotte.

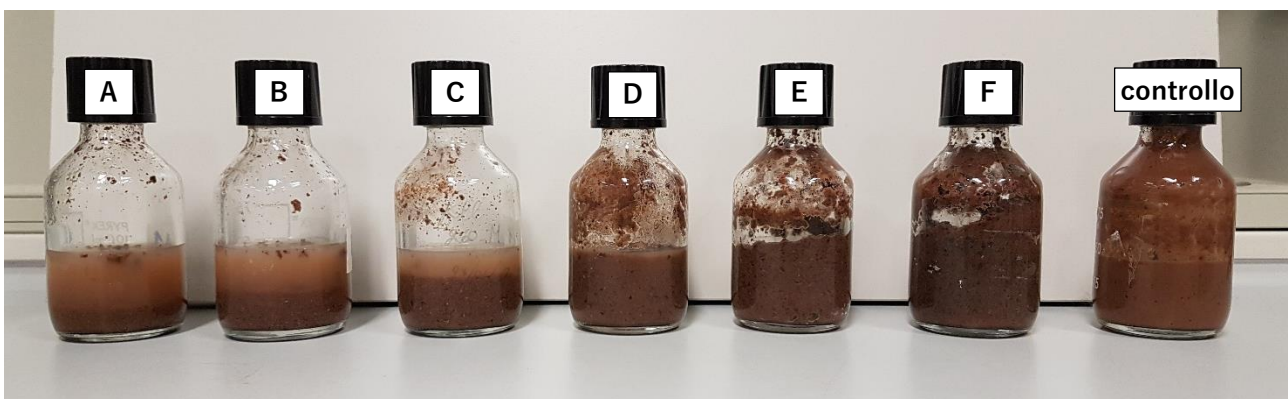
Ogni batch è stato monitorato quotidianamente tramite campionamento del biogas e del brodo di fermentazione. Con una siringa sono stati prelevati 3 mL di biogas dallo spazio di testa del reattore e sono stati trasferiti in una fiala di vetro (vial) da 11 mL, sigillata con tappo in gomma, da collegare in seguito al  $\mu$ GC. Per evitare la presenza di altri eventuali gas al suo interno, la vial è stata precedentemente lavata con un flusso di azoto. Successivamente, sono stati prelevati 2 mL dal brodo di fermentazione inserendo una siringa collegata ad un tubo di teflon all'interno del reattore. Poiché questa fase ha richiesto l'apertura di un tappo del fermentatore, è stato mantenuto un flusso di azoto nello spazio di testa per prevenire l'entrata di ossigeno.

### 3.2.3 Studio della cinetica di produzione di acido caproico da GP<sub>Fresh</sub>

Al fine di determinare la concentrazione ottimale di GP<sub>Fresh</sub> per produrre acido caproico è stato effettuato uno studio della cinetica di fermentazione anaerobica. L'esperimento è stato realizzato a scala di microcosmi, utilizzando le medesime bottiglie (volume operativo di 50 mL) e procedura di preparazione descritte nel **paragrafo 3.2.1**, ad eccezione della concentrazione di substrato. Sono state analizzate sei condizioni di concentrazione di GP<sub>Fresh</sub>, ciascuna delle quali condotta in triplicato. La **Tabella 2** indica le concentrazioni di substrato in termini di contenuto di TS ed etanolo di ciascuna condizione:

**Tabella 2** Condizioni valutate per lo studio della cinetica di fermentazione.

Condizioni	Contenuto	
	g <sub>TS</sub> /l	g <sub>EtOH</sub> /l
A	25,6	5,0
B	51,3	10,0
C	76,9	15,0
D	102,5	20,0
E	128,2	25,0
F	153,8	30,0



**Figura 9** Microcosmi per lo studio della cinetica, in ordine crescente di concentrazione di TS da sinistra verso destra. L'ultimo è la condizione di controllo.

Inoltre si è allestita, sempre in triplicato, una condizione di “controllo” contenente acqua ed inoculo 80% v/v. Le condizioni di incubazione sono state le medesime descritte nel **paragrafo 3.2.1**.

#### 3.2.4 Produzione di acido caproico: *processo in continuo*

Con l'obiettivo di valutare la produzione di acido caproico a scala reale, si è studiato il processo di fermentazione anaerobica in continuo nel medesimo STR precedentemente descritto. L'HRT è stato fissato in base ai risultati ottenuti con i processi batch. Ogni due giorni, in seguito al medesimo campionamento descritto al **paragrafo 3.2.2**, è stato alimentato il fermentatore secondo la procedura seguente: 1) prelievo del brodo di fermentazione nella quantità stabilita dall'HRT utilizzando una siringa da 60 mL; 2) raccolta del campione prelevato all'interno di una bottiglia; 3) aggiunta di GP<sub>Fresh</sub> e acqua nella medesima quantità del campione prelevato, in proporzioni tali da rispettare il contenuto di 11% di TS, con una siringa da 60 mL.

### 3.3 Procedure analitiche

#### 3.3.1 Determinazione del contenuto di solidi totali e volatili

Il contenuto di solidi totali (TS) della vinaccia è stato valutato utilizzando un crogiolo di peso noto, contenente una certa quantità di GP<sub>Fresh</sub>. Il crogiolo è stato lasciato all'interno di una stufa a 105° C per 48 ore. In seguito, il campione è stato fatto raffreddare all'interno di un essiccatore ed è stato nuovamente pesato. Dal rapporto tra questo peso e quello della GP<sub>Fresh</sub> è stato determinato il contenuto di TS.

Lo stesso campione è stato successivamente posto in un forno a muffola a 600 °C per un'ora e poi pesato. Il contenuto di VS è stato valutato tramite il rapporto tra quest'ultimo peso

e quello del campione dopo le 48 ore in stufa a 105 °C. Entrambe le procedure sono state effettuate in triplicato.

### 3.3.2 Determinazione della concentrazione di etanolo e di acidi organici

Due strumenti sono stati impiegati per valutare la concentrazione di etanolo e di acidi organici: un HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e un GC (gascromatografo). Il primo strumento (Agilent Technologies, Milano, Italia) utilizza un rilevatore ad infrarossi e una colonna Varian Hi-Plex H 300 X 7.7 mm. Come eluente è stato utilizzato acido solforico 0.005 M, con un flusso di eluizione di 0.6 mL/min e una temperatura operativa di 65 °C.

Il GC (Agilent Technologies, Milano, Italia) è invece abbinato ad un Flame Ionization Detector (GC-FID 7890A) e una colonna HP-INNOWAX (lunghezza 30 m, diametro 0.250 mm, spessore del film 0.25  $\mu$ m). Le condizioni utilizzate sono state le seguenti: temperatura di iniettore e FID fissate rispettivamente a 250 °C e 280 °C; pressione di 9.5649 psi; flusso di H<sub>2</sub> 30 mL min<sup>-1</sup>; flusso d'aria 300 mL min<sup>-1</sup>; portata del gas carrier (azoto) 29.281 mL min<sup>-1</sup>, con un rapporto di divisione di 10:1 (7 mL min<sup>-1</sup>); volume di iniezione di 1  $\mu$ L. Il programma di temperature utilizzato è stato il seguente: 80 °C per 0.5 min, poi 20 °C min<sup>-1</sup> fino a 150 °C per 1 min, poi 20 °C min<sup>-1</sup> fino a 240 °C per 2.5 min.

Prima delle analisi, i campioni sono stati centrifugati a 12000 rpm per 10 minuti; il surnatante è stato diluito all'interno di spin filters (0.45  $\mu$ m) in acqua deionizzata o in una soluzione di acido ossalico 60 mM a seconda dello strumento utilizzato per le analisi, HPLC o GC rispettivamente. Dopo un'ulteriore centrifugazione a 9000 rpm per 10 minuti, i campioni sono stati trasferiti in vial di vetro per essere analizzati.

Il contenuto di etanolo della GP<sub>Fresh</sub> è stato valutato ponendo una bottiglia di vetro Pyrex di 100 mL contenente quantità note di vinaccia e acqua all'interno di un incubatore in agitazione a 37 °C per 48 ore. Un campione è stato prelevato ed analizzato all'HPLC.

### 3.3.3 Determinazione della produzione di biogas

La composizione del biogas in termini di H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> è stata valutata utilizzando un  $\mu$ GC, modello 3000 A (Agilent Technologies, Milano, Italia) sotto le seguenti condizioni: temperatura dell'iniettore 90 °C; temperatura della colonna 60 °C; tempo di campionamento 20 s; tempo di iniezione 50 ms; pressione della colonna 25 psi, tempo di corsa 45 s. Come gas carrier è stato utilizzato azoto.

## 4 Risultati

### 4.1 Contenuto di solidi totali, volatili ed etanolo della GP<sub>Fresh</sub>

I risultati ottenuti dalla caratterizzazione della GP<sub>Fresh</sub> sono riassunti nella tabella seguente:

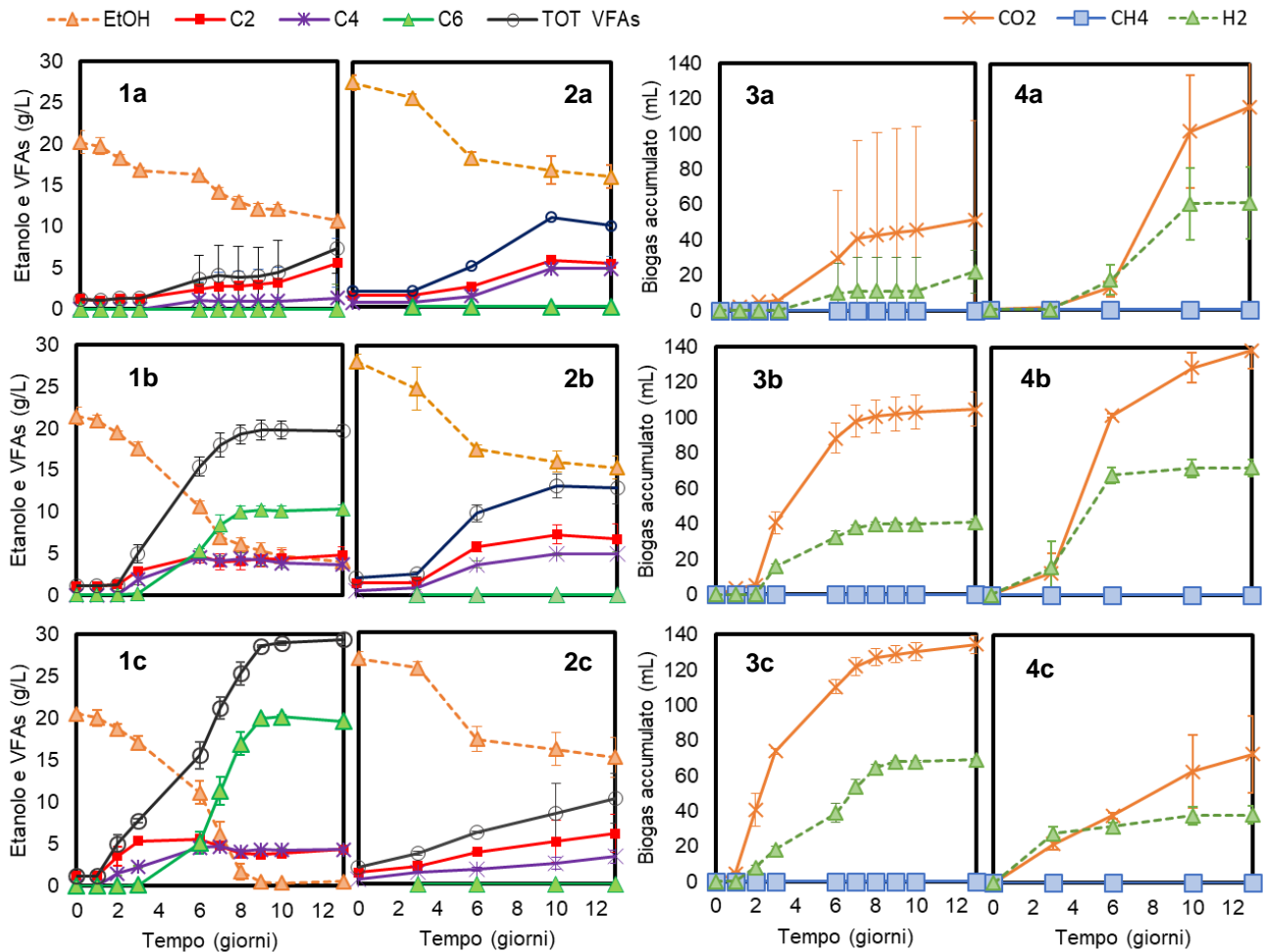
% TS	% VS	Etanolo
$g_{TS}/g_{GP_{Fresh}}$	$g_{VS}/g_{TS}$	$g_{EtOH}/g_{TS}$
32,68% ± 1,65%	86,86% ± 1,33%	0,24

### 4.2 Produzione di acido caproico da GP<sub>Fresh</sub>: *screening delle condizioni ottimali di pH e temperatura a scala di microcosmo*

Sono state allestite tre condizioni di pH (5, 6 e 7; 37°C) al fine di individuare la condizione operativa ottimale per la produzione di acido caproico. I risultati in termini di consumo di etanolo, produzione di VFAs e di biogas accumulato sono mostrati nella **Figura 10 (1a, 1b, 1c e 3a, 3b, 3c)**. Poiché ciascuna prova è stata svolta in triplicato, sono stati rappresentati i valori medi ottenuti con le relative deviazioni standard. Queste in generale sono risultate inferiori al 10 %, eccetto per la condizione a pH 5 che ha mostrato maggiore variabilità (< 35 %).

Il contenuto iniziale di etanolo è stato di  $20 \pm 0,5$  g/L per tutte e tre le condizioni e i test sono stati condotti fino al raggiungimento di un plateau della concentrazione dei VFAs. Confrontando le figure **1a, 1b, e 1c** è evidente che un valore di pH pari a 5 non favorisce la produzione di acidi grassi volatili e soprattutto di acido caproico, la cui presenza non è stata rilevata nemmeno dopo 13 giorni. Diversamente, osservando le figure relative alle condizioni di pH più elevato (**1b e 1c**), si può notare il processo di allungamento della catena: inizialmente è

stato prodotto acido acetico (C2), a seguire acido butirrico (C4), e infine, una volta che questo ha raggiunto una determinata concentrazione, si è avviata la produzione di acido caproico (C6).



**Figura 10** Trend di concentrazione dei metaboliti e biogas prodotto (accumulato) per le condizioni di temperatura e pH studiate: 37°C (indicati con 1 e 3), 50°C (indicati con 2 e 4), alle corrispondenti condizioni di pH 5 (a), 6 (b) e 7 (c).

Il plateau è stato raggiunto dopo 13 giorni e si è osservata una concentrazione massima di acido caproico di circa 10 g/L per la condizione a pH 6 e di 20 g/L per i microcosmi a pH 7. Per quest'ultima in particolare si può notare che il consumo di etanolo è proporzionale alla crescita dell'acido caproico, il quale raggiunge il suo massimo quando la concentrazione dell'etanolo è

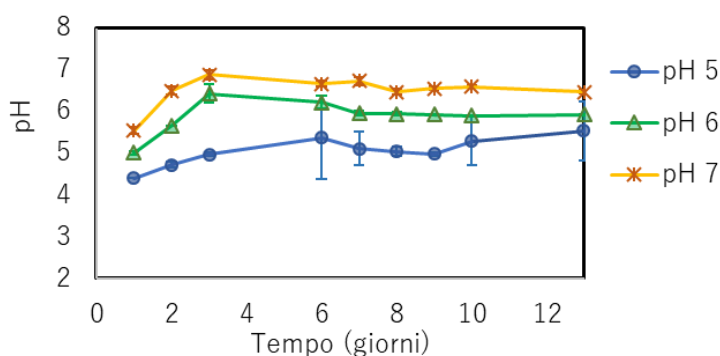


nulla. La resa di conversione etanolo-acido caproico è stata del 120% ( $C_{C_6}$ -mmol/ $C_{EtOH}$ -mmol), corrispondenti a 59  $g_{C_6}$  per kg di  $GP_{Fresh}$  e una produttività di 1,9  $g_{C_6} L^{-1} day^{-1}$ .

Le **Figura 10 3a, 3b e 3c** rappresentano la produzione di biogas in termini di volume accumulato e di composizione. Le condizioni a pH 6 e 7 hanno prodotto biogas in quantità maggiori rispetto a quella a pH 5. Il biogas è risultato essere composto principalmente da  $CO_2$  e, in misura minore, da  $H_2$ . Si evidenzia che non è mai stata rilevata la presenza di  $CH_4$ , nemmeno a pH alti. Ponendo a confronto i dati relativi al biogas con quelli riguardanti le concentrazioni di VFAs, è interessante notare che la crescita della produzione di acido caproico è avvenuta in concomitanza all'aumento del volume prodotto di  $H_2$  e  $CO_2$ .

Per confrontare la temperatura di coltivazione, sono stati presentati anche i dati ottenuti in un esperimento preliminare a 50°C (**Figura 10 2a, 2b, 2c, 4a, 4b, 4c**), in cui la concentrazione iniziale di etanolo era lievemente più alta. Anche questo test è stato condotto a tre diversi valori di pH.

In **Figura 11** sono riportati gli andamenti del pH misurato relativi alle tre condizioni studiate a  $T=37^\circ C$ . Il pH inizialmente è sempre apparso molto inferiore rispetto al valore richiesto, risultando 4,4 per i microcosmi a pH 5, 5,0 per la serie a pH 6 e 5,6 per quelli a pH 7. A partire dal sesto giorno il valore si è mantenuto invece abbastanza stabile. La condizione a pH 7 ha mostrato una tendenza ad acidificare più marcata rispetto alle altre, anche fino a raggiungere

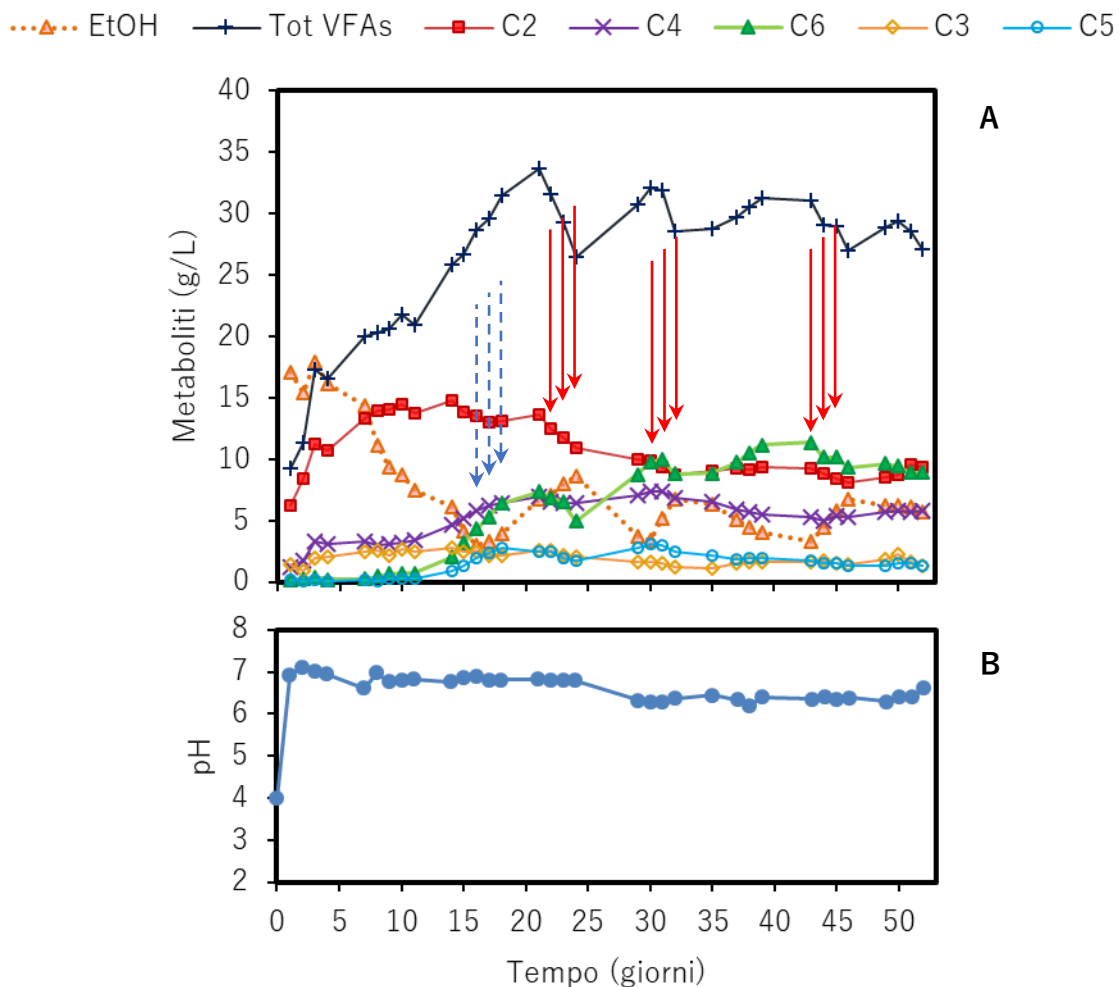


**Figura 11** Andamento del pH misurato nelle tre condizioni valutate a 37°C.

valori inferiori di 0,5 a quello richiesto. L'andamento della condizione a pH 5 è invece risultata molto variabile.

### 4.3 Prove in batch utilizzando un fermentatore di banco

Al fine di acclimatare l'inoculo proveniente da una fermentazione anaerobica in cui era prodotto acido caproico da scarti ortofrutticoli si è condotta una prova preliminare, i cui risultati sono riportati in **Figura 12**.

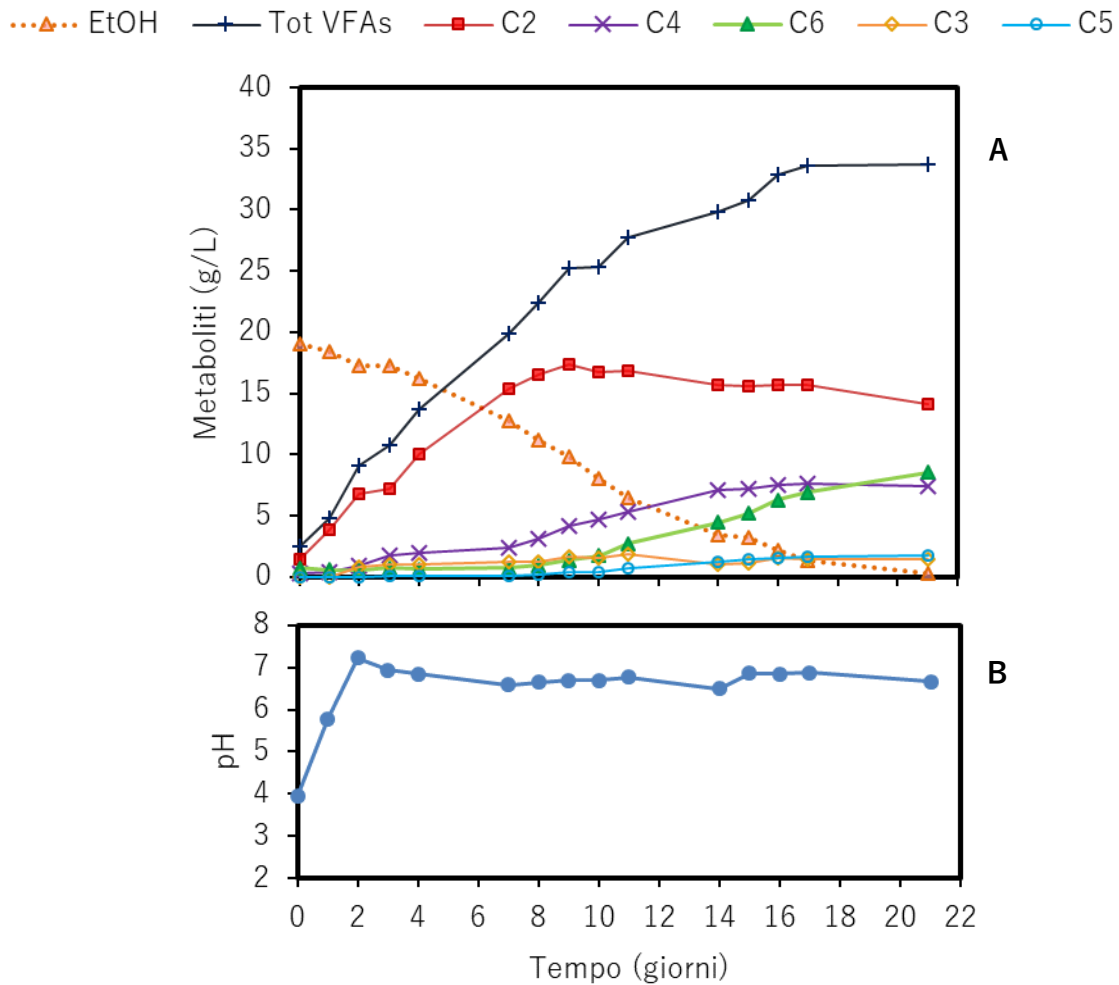


**Figura 12** (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del 1° batch, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs). Le frecce blu tratteggiate indicano l'aggiunta di etanolo sintetico, le rosse l'aggiunta di GP<sub>Fresh</sub>. (B) Trend del pH misurato.

Il processo è stato condotto in batch per i primi 20 giorni. Si è osservato un calo della concentrazione di etanolo da 17 g/L a 3 g/L al sedicesimo giorno. È stata riscontrata una produzione di acido acetico fino a oltre 14 g/L e una più lenta crescita dell'acido butirrico, fino a 6 g/L. La concentrazione di acido caproico raggiunta dopo 16 giorni è invece risultata piuttosto scarsa (4,4 g/L). Per questo è stato aggiunto etanolo sintetico nei tre giorni seguenti e successivamente il processo è stato messo in continuo per stimolare la produzione di acido caproico. Il fermentatore è stato alimentato con  $GP_{Fresh}$  nei giorni indicati in figura ed effettivamente la concentrazione di acido caproico è aumentata, pur non raggiungendo i valori desiderati. Al termine del batch è stato anche impostato il controllo del pH ad un valore inferiore (6,5) ma non sono stati ottenuti risultati soddisfacenti.

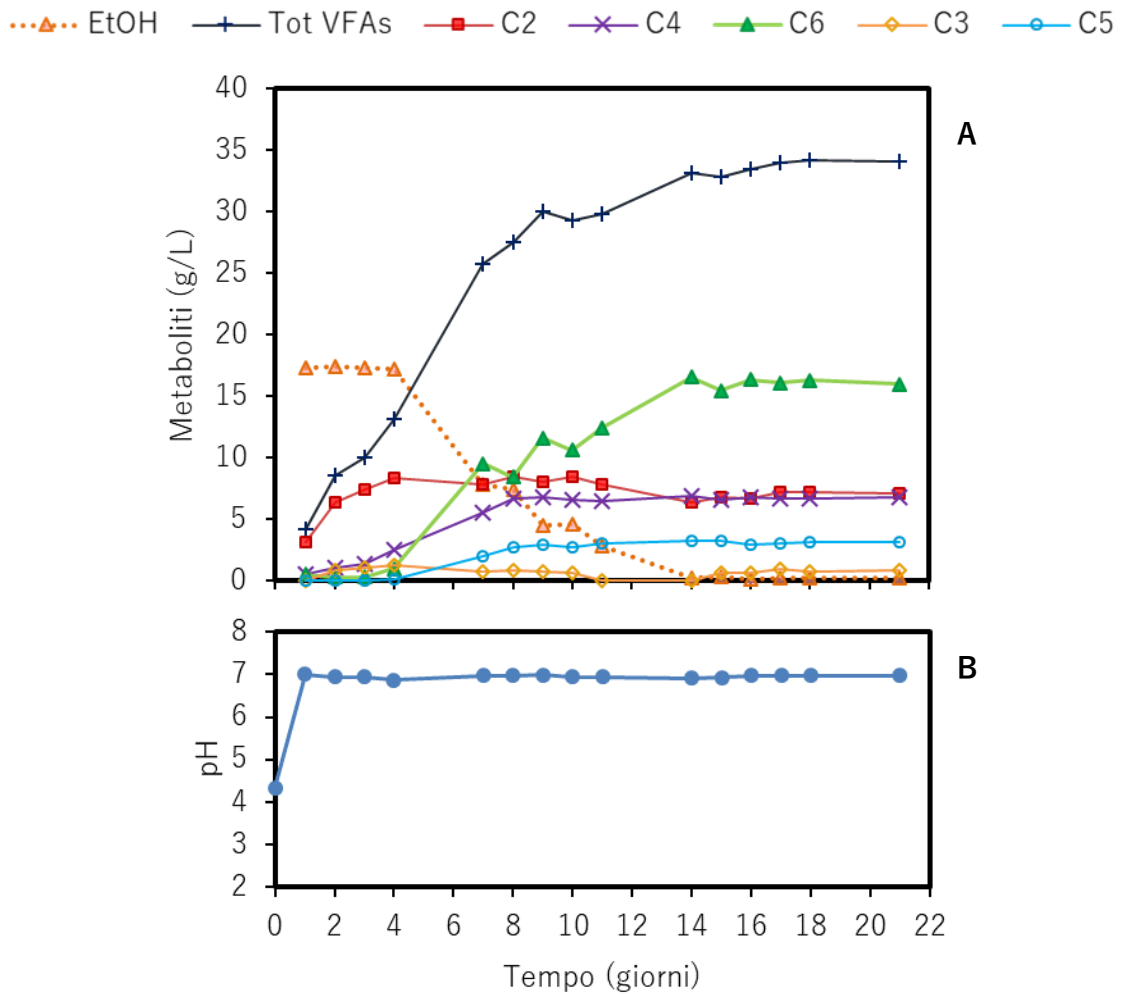
Con l'obiettivo di confermare o rifiutare i risultati precedenti si è realizzato un secondo batch, avviato utilizzando l'inoculo recuperato dalla prova precedente, così come descritto al **paragrafo 3.2.2**. Il pH di questo processo è stato controllato manualmente (**Figura 13 B**) a causa di un'agitazione non adeguata. Inoltre, è stato inserito un termometro nel fermentatore per verificare che la temperatura interna fosse di 37°C, valore al quale era stato impostato il bagno termico. La procedura di campionamento, come anche per il fermentatore precedente, è stata la medesima seguita per i microcosmi dello screening iniziale, ossia il prelievo del brodo è stato effettuato dopo aver aperto la testa del reattore e mantenendo un flusso di azoto per garantire l'anaerobiosi.

I trend di concentrazione degli acidi e dell'etanolo sono risultati diversi da quelli ottenuti con i microcosmi nello screening iniziale. Rispetto alla prova precedente si è osservata una produzione di acido acetico e butirrico lievemente maggiore (17 e 8 g/L rispettivamente). In corrispondenza del consumo totale di etanolo, avvenuto il 21° giorno, si è ottenuta la concentrazione massima di acido caproico, pari a 9 g/L, valore ancora piuttosto limitato. Inoltre, la temperatura misurata è risultata inferiore a quella voluta di circa 2°C.



**Figura 13** (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del 2° batch, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs). (B) Trend del pH misurato.

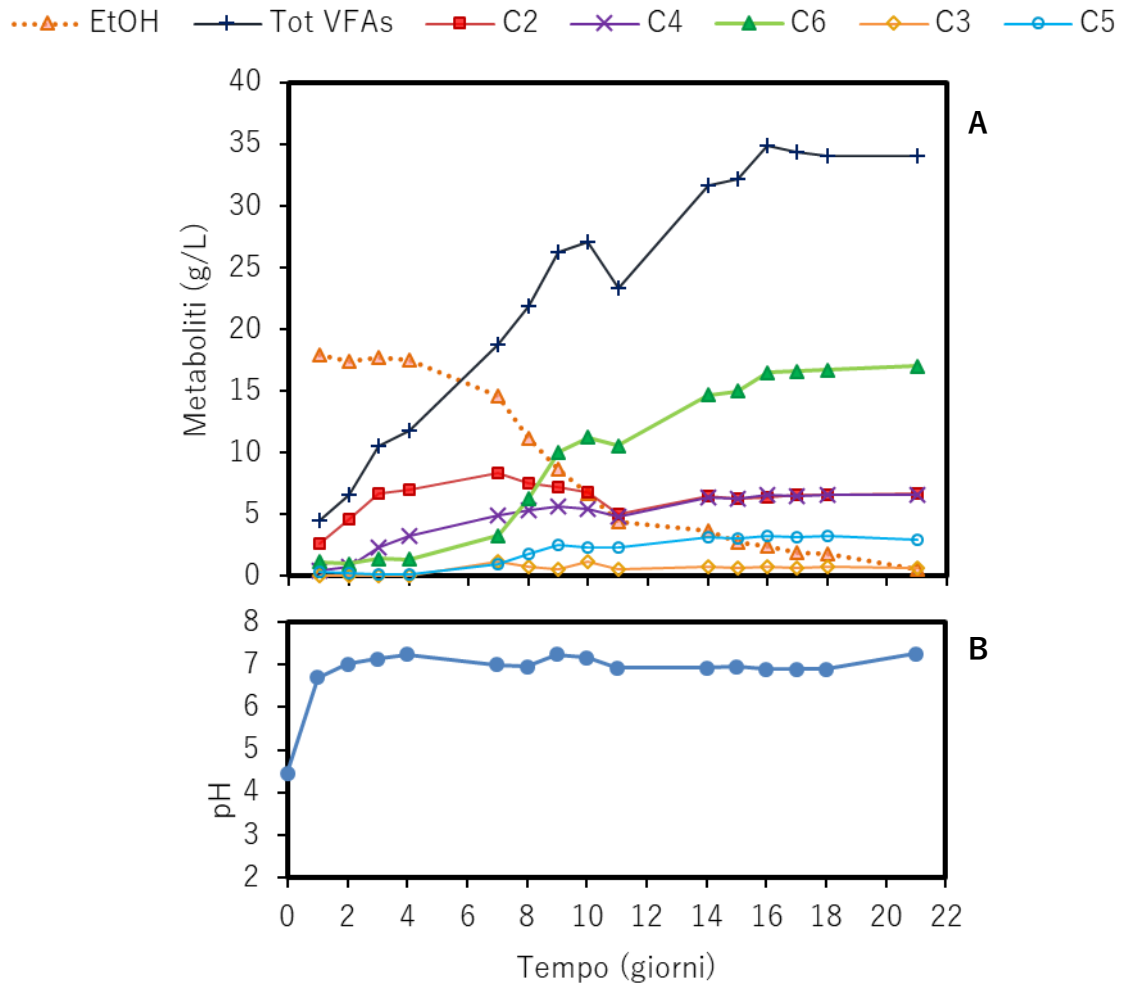
Al termine del secondo batch è stato avviato un terzo processo in cui il sistema è stato modificato mediante l'inserimento di una valvola di sfiato. La medesima è stata introdotta al fine di trattenere internamente il biogas, provocando in tal modo un lieve aumento di pressione. È stata modificata anche la procedura di campionamento per evitare l'apertura della testa del reattore e mantenere la leggera sovrappressione formatasi: il campione è stato prelevato con una siringa dalla superficie laterale del fermentatore. In tal modo il reattore risultava essere un



**Figura 14** (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del 3° batch, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs). (B) Trend del pH misurato.

sistema chiuso, come i microcosmi. In aggiunta, è stato migliorato il sistema di agitazione per assicurare il controllo automatico del pH. Infine, il bagno termico è stato impostato a 38,5°C in modo tale da mantenere effettivamente il processo a 37 °C.

Il trend delle concentrazioni ottenuto (**Figura 14**) è più simile a quello aspettato. Si è osservato un calo della concentrazione di etanolo proporzionale alla produzione di acido caproico. Questo ha raggiunto il valore massimo (16,5 g/L) dopo 14 giorni. L'acido acetico è stato prodotto in



**Figura 15** (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del 4° batch, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs).(B) Trend del pH misurato.

quantità inferiori, raggiungendo una concentrazione massima pari a 8,3 g/L, e allo stesso modo l'acido butirrico (6,7 g/L).

Tuttavia, è aumentata la produzione di acido valerico, il quale ha raggiunto il massimo valore di 3,3 g/L. È importante sottolineare che, come nelle prove precedenti, non è stata mai rilevata la presenza di CH<sub>4</sub> nel biogas.

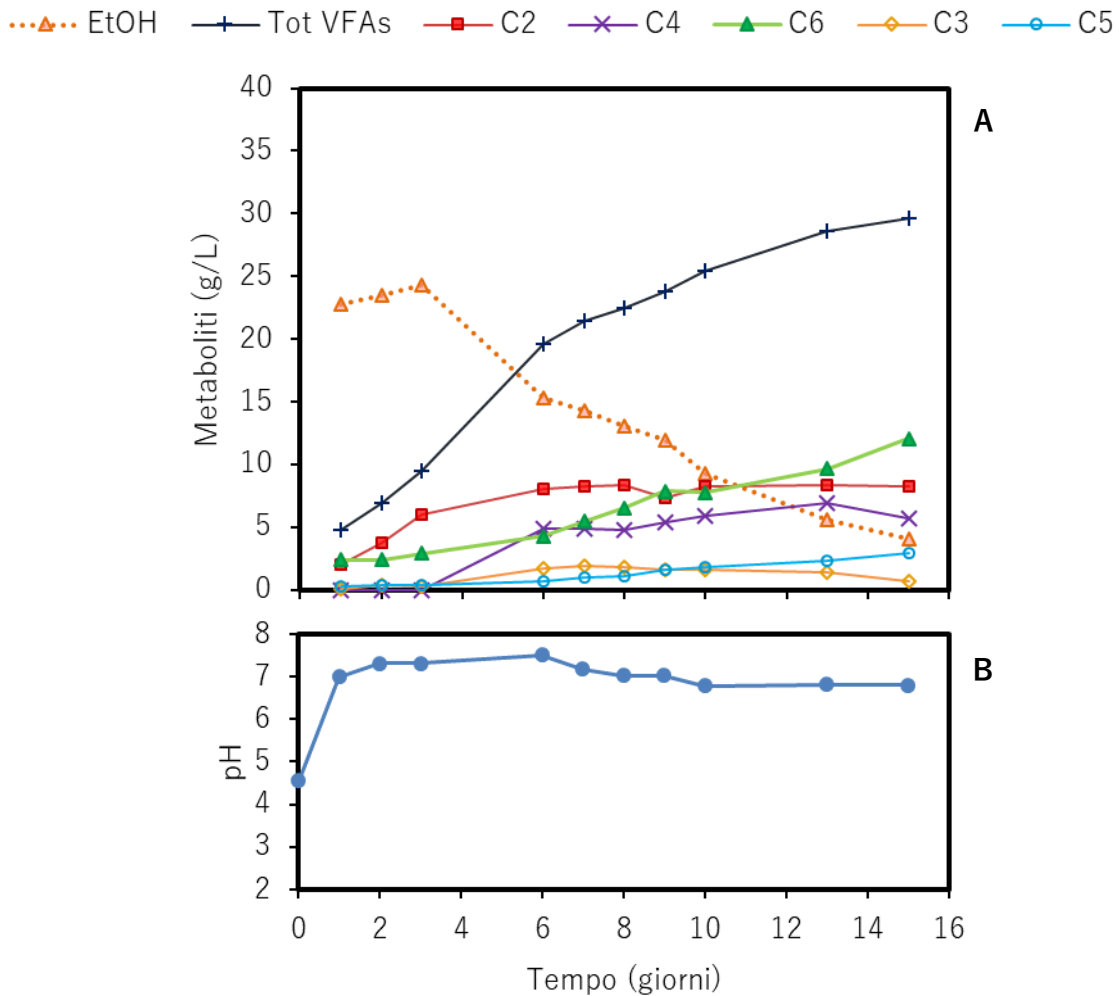
Probabilmente a causa di piccole perdite di biogas, difficilmente individuabili, non sempre il reattore è risultato essere in pressione. Per questo motivo, si è allestito il quarto batch (**Figura**

**15).** In questa occasione, la pressione è stata fornita ogni giorno mediante l'iniezione di azoto, secondo la procedura seguente: 1) lavaggio di una siringa da 60 mL con N<sub>2</sub>; 2) riempimento della stessa con N<sub>2</sub>; 3) conferimento della pressione tramite iniezione dalla testa del reattore. Anche nel corso di questo batch, alcune perdite hanno fatto sì che la sovrappressione all'interno del fermentatore fosse mantenuta soltanto occasionalmente. I risultati ottenuti rispecchiano quelli osservati con la prova svolta in precedenza.

Per verificare o rifiutare i risultati ottenuti, è stato allestito un quinto processo in batch. In questo caso, per pressurizzare il fermentatore, è stata collegata la linea di distribuzione dell'azoto direttamente al reattore, tramite un tubo e un ago da inserire sulla testa. Questa operazione è stata ripetuta ogni giorno, una volta terminato il campionamento. Il manometro della linea è stato impostato a 1,3 bar e il collegamento è stato mantenuto soltanto per qualche minuto. I risultati mostrano una produzione di VFAs in generale scarsa, inferiore a 30 g/L dopo 15 giorni. La diminuzione dell'etanolo appare lenta, così come l'aumento della concentrazione di acido caproico, che raggiunge il valore di 12,1 g/L a due settimane dall'inizio del processo fermentativo.

È da segnalare che le analisi per determinare il contenuto di metaboliti di questo batch sono state svolte impiegando un HPLC diverso da quello utilizzato in precedenza. Nei cromatogrammi forniti da questo strumento i tempi di ritenzione dell'etanolo e dell'acido butirrico risultavano gli stessi; ciò ha portato ad una non corretta integrazione dei segnali forniti dallo strumento.

Appare infatti evidente (**Figura 16 A**) come l'etanolo sembri aumentare nei primi tre giorni, mentre l'acido butirrico rimanga a concentrazione nulla. Chiaramente, nella realtà l'etanolo era consumato mentre l'acido butirrico cresceva lentamente.

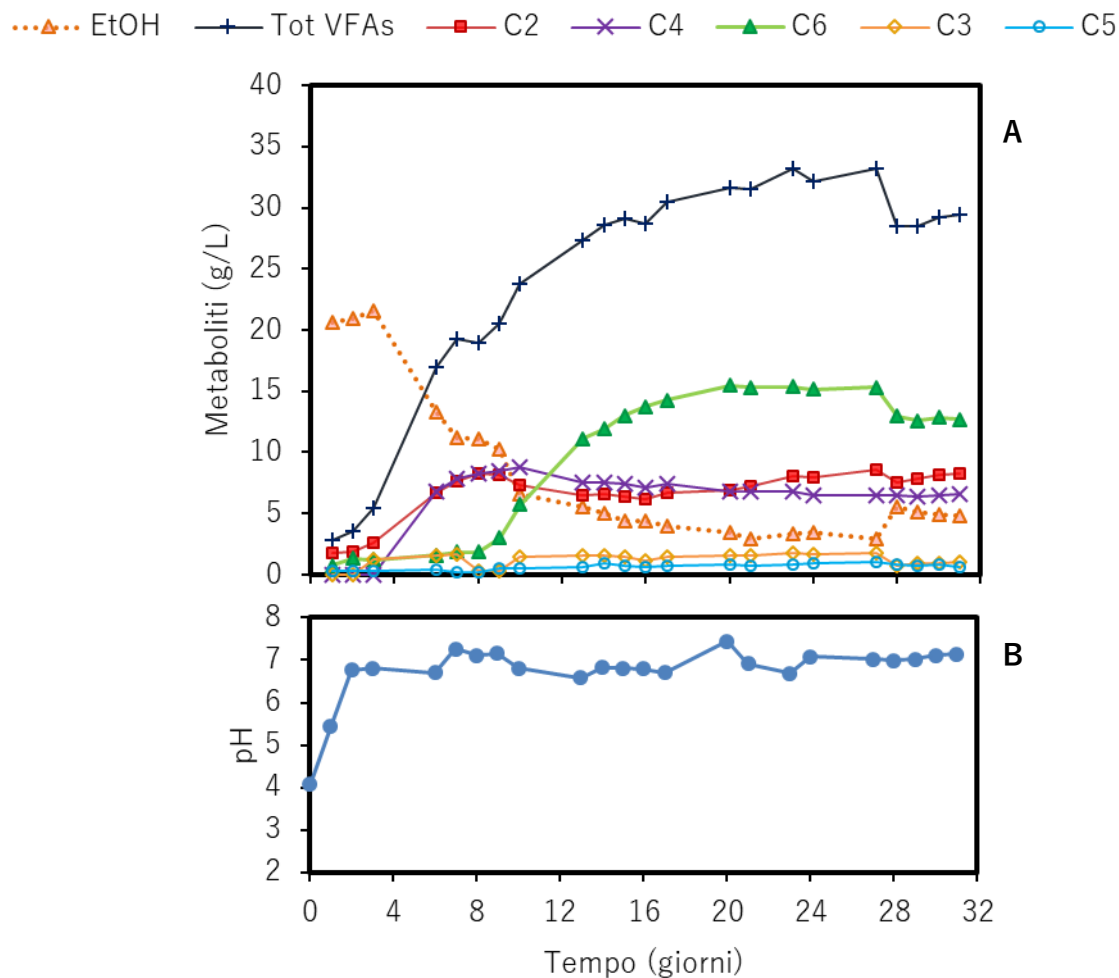


**Figura 16** (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del 5° batch, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs). (B) Trend del pH misurato.

Il pH non è stato mantenuto alla condizione ottimale a causa di alcune difficoltà riscontrate con il sistema di controllo e l'agitazione (**Figura 16 B**). Inoltre, come per i batch precedenti, è risultato complesso mantenere la sovrappressione interna al reattore.

Al termine della pausa estiva, si è allestito il sesto processo batch (**Figura 17**). In questa occasione, la linea di distribuzione dell'azoto è stata mantenuta collegata al fermentatore per tutta la durata della prova e il manometro della linea è stato impostato a 0,3 bar di





**Figura 17** (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del 6° batch, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs). (B) Trend del pH misurato.

sovrappressione. I risultati mostrano una lunga fase di latenza iniziale. Come per il batch precedente, l'apparente aumento di etanolo durante i primi tre giorni è da imputare ad una non corretta integrazione dei segnali forniti dall'HPLC. Ad eccezione di alcuni giorni (10, 13 e 20), il reattore è sempre risultato essere in pressione. Le massime concentrazioni di acido acetico e acido butirrico sono state raggiunte rispettivamente nei giorni 8 e 10 (8,3 g/L e 8,8 g/L rispettivamente). Si è osservato un consumo di etanolo fino ad un valore minimo di concentrazione pari a 2,9 g/L al ventunesimo giorno; successivamente la concentrazione è rimasta stabile. Al contempo la concentrazione di acido caproico è giunta al valore massimo

(15,4 g/L). L'oscillazione del pH mostrata in **Figura 17 B** è dovuta ad una deficienza nell'agitazione, che non ha permesso un controllo adeguato.

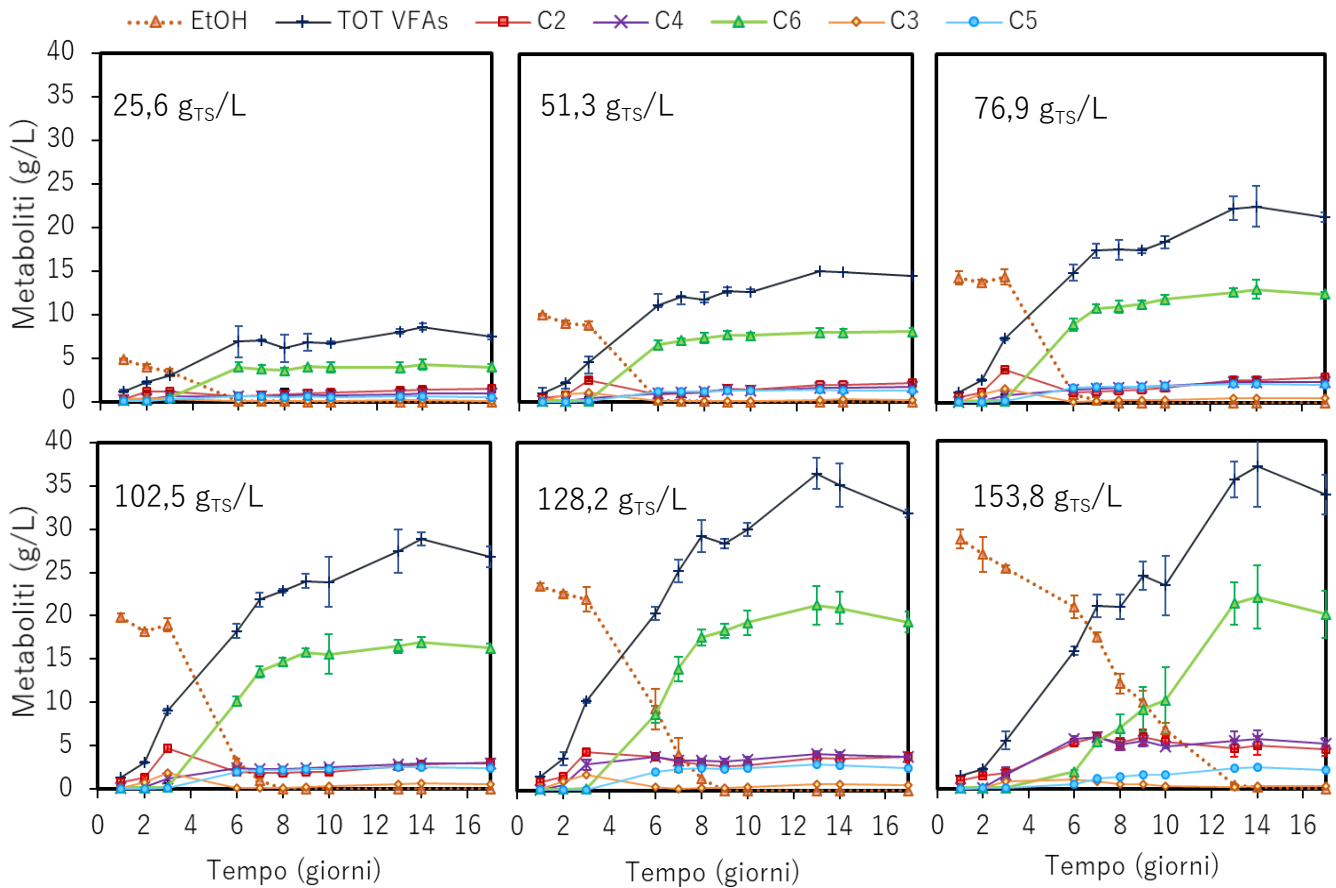
Al giorno 28 si è osservato un aumento della concentrazione dell'etanolo, dovuto ad un'aggiunta di  $GP_{Fresh}$  per sopperire ad una perdita di volume causata dai campionamenti quotidiani. Successivamente, l'intenzione sarebbe stata quella di portare il processo da una modalità in batch ad una in continuo. Tuttavia, il 31° giorno si è verificata la rottura della camicia esterna del reattore. Questo ha comportato la diluizione del brodo di fermentazione nell'acqua utilizzata dal bagno termico per mantenere la temperatura di 37 °C. Di conseguenza, l'inoculo è stato recuperato secondo le medesime procedure indicate nel **par. 3.2.2** ed è stato avviato il processo descritto in seguito (**par. 4.5**).

#### **4.4 Studio della cinetica di produzione di acido caproico da $GP_{Fresh}$**

La cinetica di fermentazione è stata valutata mediante un esperimento a scala di microcosmi, considerando sei condizioni di concentrazione del substrato (**par. 3.2.3**). I trend di consumo e produzione dei metaboliti sono mostrati in **Figura 18**. In tutte le condizioni si è osservato un aumento della concentrazione di acido acetico tra il secondo e il terzo giorno, il quale è stato successivamente convertito in acido butirrico in accordo con il meccanismo dell'allungamento della catena. Soltanto per la condizione a maggior contenuto di TS, questo è accaduto più tardi, tra il sesto e il settimo giorno. Inoltre, per le condizioni 102.5, 128.2 e 153.8  $g_{TS}/L$  si è riscontrata una concentrazione massima di acido valerico compresa tra 2.5 e 3 g/L.

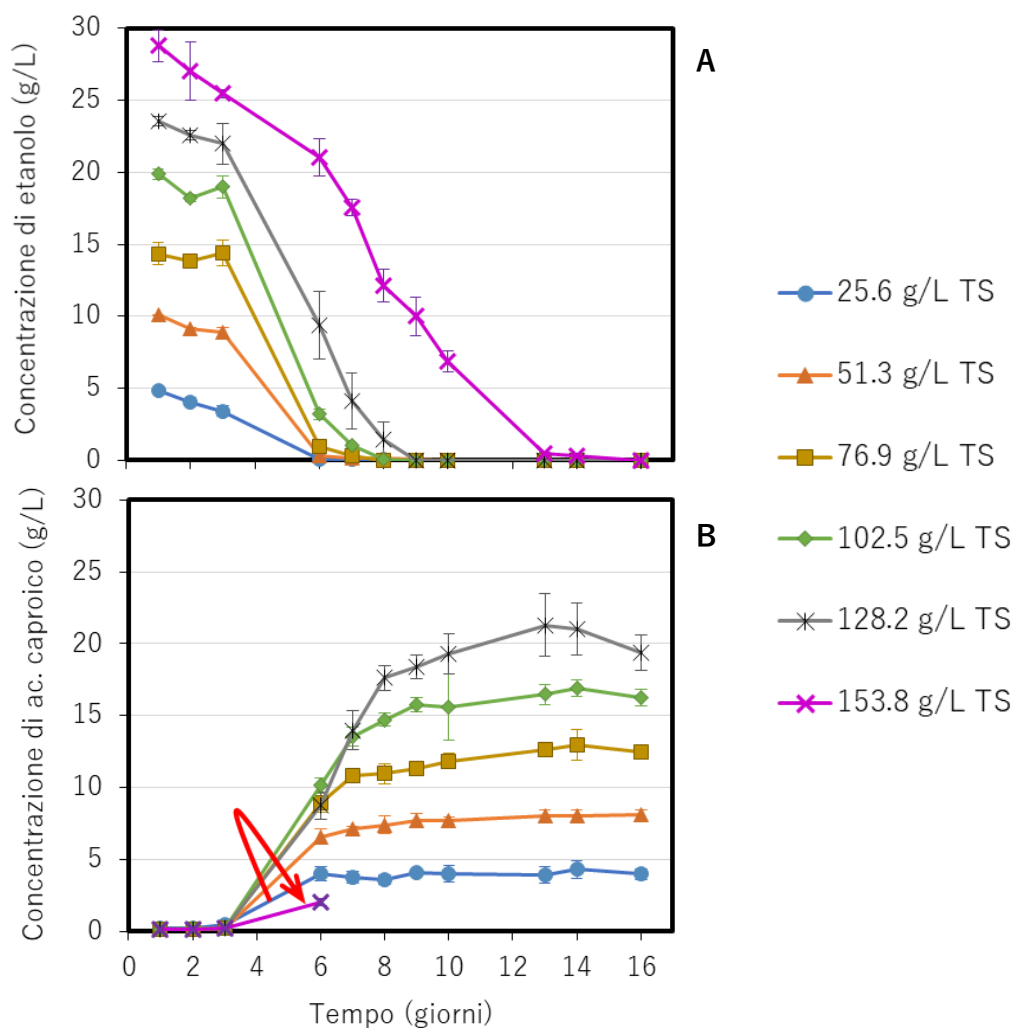
La **Figura 19** evidenzia il confronto tra gli andamenti di consumo dell'etanolo e di produzione di acido caproico relativi alle sei condizioni studiate. La concentrazione di etanolo ha raggiunto lo zero al giorno 6 per le condizioni 25,6 e 51,3  $g_{TS}/L$ . Lo stesso accade uno, due e tre giorni dopo per le condizioni 76.9, 102.5 e 128.2  $g_{TS}/L$ . Per la condizione 153,8  $g_{TS}/L$ , il consumo è invece

giunto al massimo il giorno 16. La produzione di acido caproico ha avuto inizio al terzo giorno, eccetto per la condizione 25.6 g<sub>TS</sub>/L, per la quale l'aumento è avvenuto già a partire dal secondo giorno di fermentazione.



**Figura 18** Trend di concentrazione dei metaboliti delle sei condizioni valutate per lo studio della cinetica.

Per definire le velocità specifiche di produzione dell'acido caproico sono state considerate le velocità iniziali: per la condizione 25.6 g<sub>TS</sub>/L è stato considerato il tratto compreso tra i giorni 2 e 6; per la condizione successiva il tratto tra i giorni 3 e 6; per tutte le altre è stato scelto l'andamento tra i giorni 3 e 7. Le velocità così ottenute sono poi state rapportate alla quantità di inoculo (espresso in VS) aggiunto a ciascun microcosmo, in tutti i casi equivalente al 4% v/v.



**Figura 19** (A) Trend di consumo dell'etanolo. (B) Trend di produzione dell'acido caproico. La freccia rossa indica l'andamento di produzione dell'acido caproico dalla condizione 25.6 g<sub>TS</sub>/L alla 153.8 g<sub>TS</sub>/L.

I dati, espressi in termini di velocità specifica di produzione dell'acido caproico  $\mu$  rispetto al contenuto di solidi totali, sono mostrati in **Figura 20**. È apparso evidente l'allontanamento del punto relativo alla condizione a maggior contenuto di TS dagli altri, per il quale, infatti, la velocità di produzione dell'acido caproico risultava essere la più bassa, anche minore della condizione 25.6 g<sub>TS</sub>/L. La velocità massima raggiunta è risultata essere pari a 0.71 g<sub>C6</sub>/(L day g<sub>VS</sub>).

I risultati ottenuti sperimentalmente sono stati confrontati con la cinetica del modello di Monod, secondo il quale la velocità specifica di produzione è data da:

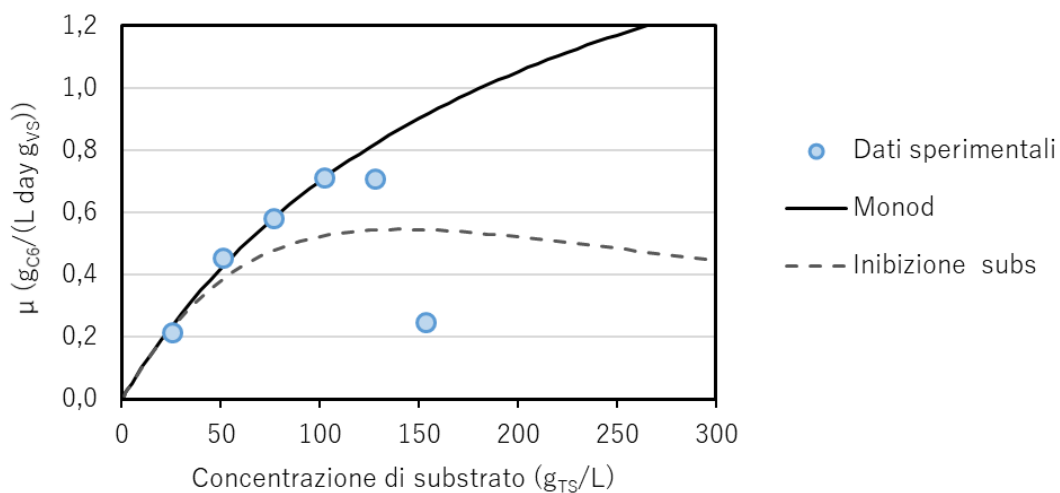
$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot [S]}{K_s + [S]}$$

dove  $\mu_{max}$  rappresenta la velocità massima di produzione ( $g_{C6}/(L \text{ day } g_{VS})$ ),  $[S]$  la concentrazione di substrato espressa in termini di TS ( $g_{TS}/L$ ),  $K_s$  la costante di semi-saturazione del substrato ( $g_{TS}/L$ ), che rappresenta la concentrazione di substrato in corrispondenza della quale si ha  $\mu = \frac{\mu_{max}}{2}$ . La velocità specifica ottenuta con questo modello è risultata pari a  $2.1 g_{C6}/(L \text{ day } g_{VS})$ ; la costante  $K_s$  è invece risultata pari a  $200.7 g_{TS}/L$ .

Oltre a Monod, i dati sono stati confrontati con un modello che tenesse conto di eventuali effetti inibitori in grado di interferire con la produzione degli acidi. In particolare, è stata considerata l'inibizione data dall'eccesso di substrato. La velocità specifica di produzione è in questo caso descritta dalla formula seguente:

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot [S]}{K_s + [S] \cdot (1 + [S] \cdot K_I)}$$

dove  $K_I$  rappresenta un coefficiente che tiene conto dell'inibizione data dall'eccesso di substrato. I valori di  $\mu_{max}$  e  $K_s$  sono stati mantenuti uguali a quelli ottenuti dalla cinetica di Monod;  $K_I$  è invece risultato pari a  $0.01 g_{TS}/L$ .

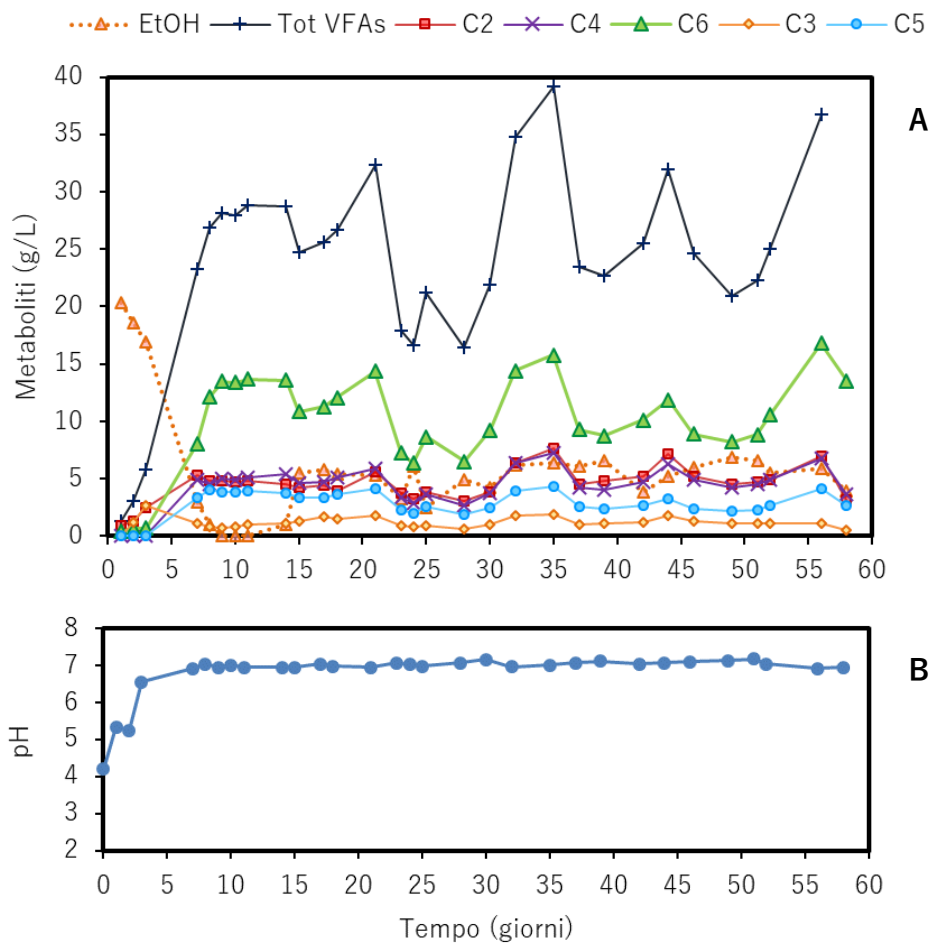


**Figura 20** Velocità specifiche di produzione di acido caproico osservate per le diverse concentrazioni di  $GP_{Fresh}$ .

## 4.5 Produzione di acido caproico: *processo in continuo*

Si è allestita una prova di produzione in continuo per verificare la fattibilità del processo a scala reale. Il test è stato avviato con un batch in cui si è osservata una produzione di acido caproico a partire dal terzo giorno (**Figura 21**). Questo ha raggiunto una concentrazione massima di 13,7 g/L dopo 9 giorni, con una resa dell'80% ( $C_{\text{EtOH}}$ -mmol/ $C_{\text{C}_6}$ -mmol). Contemporaneamente, tutto l'etanolo disponibile è stato consumato. Inoltre, si è osservata una produzione piuttosto considerevole di acido valerico (4 g/L).

In seguito al batch iniziale, è stato avviato il processo in continuo. L'HRT è stato fissato a 15 giorni e l'alimentazione è stata fornita ogni quarantotto ore. Tra i giorni 21 e 23 si è osservato un calo netto della concentrazione di acido caproico: il ventunesimo giorno è stata individuata una perdita di biogas dalla testa del reattore ed è stato necessario aprire il medesimo per sistemarlo. Il giorno 28 è stato necessario alimentare il reattore per ripristinare il volume operativo a 300 mL, poiché in seguito ai continui campionamenti, questo era calato di circa 60 mL. Successivamente la concentrazione di acido caproico è aumentata fino al raggiungimento di 15,8 g/L il 35° giorno. In questa occasione, si è tentato di abbassare l'HRT a 12 giorni. In seguito, al giorno 42 il processo è stato alimentato di nuovo secondo un HRT di 15 giorni. A causa di un'ulteriore perdita di volume, il 49° giorno sono stati nuovamente forniti 60 mL di alimentazione.



**Figura 21** (A) Trend di concentrazione dei metaboliti del processo continuo, in particolare etanolo (EtOH), acido acetico (C2), acido butirrico (C4), acido caproico (C6), acido propionico (C3), acido valerico (C5), somma di tutti gli acidi (TOT VFAs). (B) Trend del pH misurato.





## 5 Discussioni

### 5.1 Produzione di acido caproico da GP<sub>Fresh</sub>: *screening delle condizioni ottimali di pH e temperatura a scala di microcosmo*

I risultati ottenuti dall'esperimento condotto alla temperatura di 37 °C sono stati confrontati con i dati conseguiti in una prova precedente a 50 °C (**Figura 10**). Anche se la concentrazione di etanolo iniziale per il test a 50 °C è risultata più alta, le due prove continuano ad essere paragonabili poiché è noto che 27 g/L di etanolo non risulta essere una concentrazione inibente. In più, in detta prova precedente, si era prodotto acido caproico nelle medesime condizioni a 37 °C. L'esperimento realizzato nel presente lavoro aveva l'obiettivo di verificare i risultati a 37 °C mediante campionamenti e correzioni di pH giornalieri.

Dal confronto è risultato evidente che i microrganismi utilizzati per la fermentazione in oggetto non fossero termofili. Inoltre, esaminando i dati ottenuti ai tre diversi valori di pH, è apparso chiaro come la condizione a pH neutro rappresentasse quella ottimale. Abbassando il valore di questo parametro, la produzione di acido caproico è diminuita, fino ad annullarsi per valori di pH pari a 5.

Per quanto riguarda il biogas, questo è sempre risultato composto da H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, e nessuna traccia di CH<sub>4</sub> è mai stata rilevata. Alcune ricerche precedenti indicavano un pH ottimale di 5.5 e la necessità di aggiungere inibitori nel caso di condizioni più neutre, per evitare la metanogenesi<sup>11</sup>. In questo caso non è stata aggiunta alcuna sostanza poiché si è ritenuta valida l'ipotesi secondo la quale l'alta concentrazione di VFAs inibisca la produzione di metano. Infine, si può notare come la produzione di biogas, in particolare H<sub>2</sub>, sembri correlata a quella di acido caproico: entrambe, infatti, hanno interessato i primi giorni della fermentazione.

## 5.2 Prove in batch utilizzando un fermentatore di banco

La seconda fermentazione in batch, pur essendo stata avviata con un inoculo già acclimatato mediante un processo preliminare, ha fornito risultati piuttosto diversi da quelli raggiunti con l'esperimento in microcosmi alle condizioni di pH e temperatura ottimali. I parametri del processo, tuttavia, risultavano i medesimi dei test dello screening iniziale (37°C, pH 7, 11% TS). La sola differenza tra le due prove è stata individuata nella presenza di una leggera sovrappressione che si veniva a formare all'interno dei microcosmi a causa della produzione di biogas. Mentre questi risultavano essere sistemi perfettamente chiusi, il fermentatore era invece connesso al sistema Mariotte che manteneva il processo a pressione atmosferica. Pertanto, è stato ipotizzato che la pressione potesse avere una certa influenza sulla produzione di VFAs. Da questa osservazione, con l'obiettivo di replicare i risultati ottenuti con l'esperimento in microcosmi, si è pensato di porre il fermentatore ad una lieve sovrappressione.

Effettivamente, il terzo batch, condotto in un reattore leggermente pressurizzato, ha fornito risultati migliori rispetto alla prova precedente: la concentrazione di acido acetico è stata dimezzata, l'acido caproico è stato prodotto in quantità maggiori (16.6 g/L) e il consumo di etanolo è avvenuto in un tempo più breve. L'ipotesi relativa all'importanza della pressione si basa sulle osservazioni seguenti: 1) nei microcosmi, sistemi perfettamente chiusi, sono stati prodotti 20 g/L di acido caproico; 2) la pressione potrebbe influenzare la solubilità dell'idrogeno che compone il biogas; 3) potrebbe essere presente una specie microbica per la quale le condizioni di lieve sovrappressione possano favorire il metabolismo coinvolto nella produzione di VFAs. Comunque, pur essendo inferiore a quella raggiunta con i microcosmi, la concentrazione di acido caproico di 16.6 g/L ottenuta con i processi batch è risultata maggiore rispetto ai 12.6 g/L<sup>11</sup> riportati in altri studi.

Successivamente, durante il 4° e 5° batch, si è verificato un rallentamento nella produzione di acido caproico: il massimo di concentrazione è stato raggiunto dopo un tempo maggiore rispetto al terzo batch. Le motivazioni di questo comportamento sono dovute probabilmente ad un'agitazione difficoltosa del fermentato, la quale, tra l'altro, ha implicato un controllo inadeguato del pH, che è risultato troppo alto nel corso dei primi giorni. La scarsa agitazione era dovuta probabilmente ad un aumento del contenuto di solidi totali. Come descritto al **paragrafo 3.2.2**, al termine di ogni batch il fermentato veniva sottoposto ad operazioni di filtrazione e centrifugazione per recuperare i microrganismi da utilizzare poi come inoculo al batch successivo. Probabilmente durante questi passaggi, oltre ai microrganismi, sono stati recuperati anche solidi. Per questo, processo dopo processo, il contenuto di solidi totali risultava aumentare, peggiorando l'agitazione.

I dati ottenuti con il 6° batch hanno mostrato invece una lunga fase di latenza iniziale. Al termine del quinto batch il fermentatore era stato alimentato con una quantità di  $GP_{Fresh}$  del 5% v/v ed era stato lasciato a pH 6 e a temperatura ambiente per circa un mese, a causa delle vacanze estive. La lunga fase di latenza all'avviamento del 6° batch è quindi stata determinata dalla necessaria acclimatazione delle colture batteriche in seguito al periodo di sosta. Viceversa, osservando i dati relativi al settimo batch, si è notato come la produzione di acido caproico abbia avuto inizio già al terzo giorno, indice del fatto che l'inoculo risultava ben selezionato.

### **5.3 Studio della cinetica di produzione di acido caproico da $GP_{Fresh}$**

La velocità specifica di produzione dell'acido caproico, rappresentata nella **Figura 20**, è risultata aumentare al crescere del contenuto di TS fino a raggiungere il valore massimo di  $0.71 \text{ day}^{-1}$  in corrispondenza della condizione  $102.5 \text{ g}_{TS}/\text{L}$ . La medesima si è mantenuta stabile finché

la concentrazione di TS non ha superato i 128.2 g<sub>TS</sub>/L. Oltrepassato questo valore si è osservato un drastico calo della velocità.

La cinetica è stata modellata utilizzando l'equazione di Monod. La curva così ottenuta, tuttavia, non è risultata adeguata a descrivere la cinetica del processo, poiché i dati sperimentali si sono disposti al di sotto di essa. In particolare, la velocità specifica in corrispondenza della condizione 153.8 g<sub>TS</sub>/L è risultata molto distante dal modello. Pertanto, si è ipotizzato che la cinetica potesse essere soggetta ad un effetto di inibizione. A tal proposito, si è calcolata la velocità specifica di produzione dell'acido caproico con un modello che tenesse conto dell'inibizione data da un eccesso di substrato. Tuttavia, anche in questo caso il modello non è risultato idoneo a descrivere i dati sperimentali.

Si è osservato che il contenuto di TS della condizione 153.8 g<sub>TS</sub>/L risultava prossimo al limite considerato normalmente in letteratura per distinguere le fermentazioni allo stato liquido da quelle allo stato solido (15 % TS)<sup>15</sup>. È stato quindi ipotizzato che la cinetica del processo fosse controllata dal trasporto di materia. Per verificare questa osservazione sarebbe necessario condurre ulteriori studi: ad esempio, si potrebbe valutare la cinetica di processi fermentativi a diverse concentrazioni di etanolo, in assenza di GP<sub>Fresh</sub>.

In ogni caso, il test ha permesso di verificare che le fermentazioni condotte nella restante parte di questo lavoro sono state allestite con un contenuto di TS (11%) prossimo alla condizione di velocità di produzione di acido caproico massima. Altri ricercatori, inoltre, hanno riportato una velocità pari a 0.49 g/(L day)), inferiore rispetto a quella ottenuta nel presente lavoro.

## 5.4 Produzione di acido caproico: *processo in continuo*

Il profilo della concentrazione di acido caproico, dopo il batch iniziale, ha mostrato un andamento piuttosto instabile nel tempo, sintomo del fatto che il processo fosse ancora in fase di stabilizzazione. Tuttavia, il primo calo netto che si è verificato al giorno 21 è da imputare, probabilmente, all'annullamento della sovrappressione nel reattore. Quel giorno, infatti, è stato necessario aprire la testa del fermentatore per bloccare una perdita di biogas, portando così il sistema a pressione atmosferica. Il calo che si è verificato in seguito a questa operazione ha quindi rafforzato l'ipotesi riguardante l'importanza di questa variabile nella produzione di acidi grassi volatili.

Altro parametro che influenza fortemente il processo è l'HRT. Osservando i profili di consumo dell'etanolo e di produzione dell'acido caproico nel corso del batch preliminare al continuo, si può notare che questi hanno raggiunto le concentrazioni rispettivamente minime e massime il nono giorno. Sulla base dei dati, quindi, l'HRT sarebbe dovuto essere pari a 9. In realtà, si è scelto un HRT conservativo pari a 15. In questo modo, si è cercato di evitare il fenomeno del wash-out, ossia la perdita di biomassa in seguito ad un ricambio troppo spinto del brodo di fermentazione. Oltre al valore dell'HRT, anche la scelta della frequenza di alimentazione è stata influenzata da simili aspetti. È infatti da tenere in considerazione la presenza dei fine settimana, in corrispondenza dei quali è necessario alimentare un volume corrispondente a tre giorni (venerdì, sabato e domenica). Se la frequenza di alimentazione fosse stata giornaliera, l'alimentazione da fornire prima del fine settimana avrebbe gravato notevolmente sul processo, e le colture batteriche avrebbero risentito dell'eccessivo volume ricambiato. Alimentando invece ogni due giorni la differenza è risultata meno marcata. L'influenza dell'HRT sul processo è ben visibile quando questo è stato portato da 15 a 12. È evidente al 37° giorno il conseguente calo

di concentrazione dei VFAs, indice del fatto che il processo non è stato in grado di sostenere un HRT così basso.

Un ulteriore aspetto da segnalare riguarda il consumo di etanolo: durante il continuo la concentrazione è sempre rimasta attorno al valore di 5 g/L. Diversamente, nel caso dei processi in batch e degli esperimenti in microcosmi, seppur impiegando tempi diversi, l'etanolo è sempre stato totalmente consumato. Pertanto, la differenza in termini di produzione di acido caproico rispetto ai risultati ottenuti con i microcosmi o i batch è dovuta ad un consumo soltanto parziale dell'etanolo.

## 6 Conclusioni

In conclusione, è stato dimostrato che mediante la fermentazione acidogenica della vinaccia è possibile ottenere miscele di acidi grassi volatili contenenti fino a 20 g/L di acido caproico. Si è realizzato uno studio che ha permesso di individuare le condizioni migliori alle quali condurre i processi fermentativi in termini di pH e temperatura.

Determinati i valori ottimali di questi parametri, sono state compiute varie fermentazioni sequenziali in batch al fine di selezionare un inoculo specifico per la produzione di acido caproico. Nel corso di queste prove è emersa l'importanza della variabile pressione. In futuro sarebbe interessante approfondire il ruolo di questo parametro sulla produzione di acidi grassi volatili, ricercando il valore ottimale di sovrappressione alla quale mantenere il reattore. Inoltre, si potrebbe condurre uno studio per verificare se, oltre alla pressione, anche la composizione del gas con cui si pressurizza il fermentatore possa influenzare i risultati del processo.

In seguito, è stato condotto uno studio della cinetica. I risultati ottenuti hanno mostrato un andamento che non seguiva né la curva tipica di Monod né un modello che considerasse l'inibizione da eccesso di substrato. Si è ipotizzato, pertanto, che la cinetica del processo fosse controllata dal trasporto di materia. In questo senso, sarebbe utile in futuro svolgere ulteriori studi per verificare l'ipotesi.

Infine, è stato allestito un processo in continuo. Osservando gli andamenti delle concentrazioni dei metaboliti, è risultato che il processo fosse ancora in fase di stabilizzazione, motivo per il quale non sono state raggiunte le performance ottenute con le prove in batch. Sarebbe quindi auspicabile proseguire l'esperimento o condurre ulteriori indagini al fine di ottimizzare questo tipo di processo.





## 7 Bibliografia

1. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Retrieved August 3, 2016 from <http://www.fao.org/faostat/en/#home>* (2016). doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00270-1
2. Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino. Available at: <http://www.oiv.int/it/lorganizzazione-internazionale-della-vigna-e-del-vino>.
3. Beres, C. *et al.* Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manag.* **68**, 581–594 (2017).
4. Bustamante, M. A. *et al.* Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manag.* **28**, 372–380 (2008).
5. García-Lomillo, J., González-Sanjosé, M. L., Del Pino-García, R., Rivero-Perez, M. D. & Muñiz-Rodríguez, P. Antioxidant and antimicrobial properties of wine by – products and their potential uses in the food industry . PubMed Commons. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 12595–12602 (2014).
6. Beres, C. *et al.* Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manag.* **68**, 581–594 (2017).
7. Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M. & Welander, T. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresour. Technol.* **99**, 509–516 (2008).
8. Lee, W. S., Chua, A. S. M., Yeoh, H. K. & Ngoh, G. C. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chem. Eng. J.* **235**, 83–99 (2014).
9. Teng, S.-X. *et al.* Electricity generation from mixed volatile fatty acids using microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 2365–2372 (2010).

10. Steinbusch, K. J. J., Hamelers, H. V. M., Plugge, C. M. & Buisman, C. J. N. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass. *Energy Environ. Sci.* **4**, 216–224 (2011).
11. Angenent, L. T. *et al.* Chain Elongation with Reactor Microbiomes: Open-Culture Biotechnology to Produce Biochemicals. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 2796–2810 (2016).
12. Cavalcante, W. de A., Leitão, R. C., Gehring, T. A., Angenent, L. T. & Santaella, S. T. Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review. *Process Biochem.* **54**, 106–119 (2017).
13. Grootsholten, T. I. M., Strik, D. P. B. T. B., Steinbusch, K. J. J., Buisman, C. J. N. & Hamelers, H. V. M. Two-stage medium chain fatty acid (MCFA) production from municipal solid waste and ethanol. *Appl. Energy* **116**, 223–229 (2014).
14. Spirito, C. M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A. J. M. & Angenent, L. T. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Curr. Opin. Biotechnol.* **27**, 115–122 (2014).
15. Raposo, F. *et al.* Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **86**, 1088–1098 (2011).
16. Arvanitoyannis, I. S., Ladas, D. & Mavromatis, A. Wine waste treatment methodology. *Int. J. Food Sci. Technol.* **41**, 1117–1151 (2006).