

**ALMA MATER STUDIORUM**  
**UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

---

Scuola di Scienze – Campus di Ravenna

Corso di laurea magistrale in Analisi e gestione dell'ambiente

**Produzione di poliidrossialcanoati dalla frazione organica  
dei rifiuti solidi urbani: recupero e utilizzo di acidi grassi  
volatili in sistemi a colture microbiche miste.**

Tesi di laurea in

Biocarburanti e Bioraffinerie

**Relatore**

**Dott. Cristian Torri**

**Correlatore**

**Dott.ssa Eleonora Torricelli**

**Presentata da**

**Agostino Seritti**

*Alla mia famiglia*

# INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
1.1	Acidi grassi volatili (Volatile Fatty Acids, VFA) .....	2
1.2	Fermentazione Acidogenica .....	4
1.2.1	Effetti delle condizioni operative sulla produzione e composizione dei VFA .....	6
1.2.2	Vie Metaboliche .....	14
1.3	Recupero dei VFA dalla fermentazione .....	20
1.4	Plastiche e bioplastiche .....	24
1.4.1	Cosa si intende per bioplastiche? .....	25
1.4.2	Standard per bioplastiche “ <i>bio-based</i> ” .....	26
1.4.3	Standard per bioplastiche biodegradabili .....	27
1.4.4	Produzione Globale .....	28
1.5	Poliidrossialcanoati (PHA) .....	32
1.5.1	Produzione PHA .....	35
1.5.2	Colture Microbiche Miste (MMC) .....	36
1.6	Scopo della tesi .....	38
<b>2</b>	<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>39</b>
2.1	Caratterizzazione della FORSU .....	39
2.1.1	Liofilizzatore .....	39
2.1.2	Analisi elementare .....	39
2.1.3	Analisi del contenuto di ceneri .....	40
2.1.4	Proteine totali .....	40
2.1.5	Lipidi totali .....	40
2.1.6	Carboidrati totali .....	41
2.2	Strippaggio di soluzioni standard .....	42
2.3	Fermentazione acidogenica accoppiata a strippaggio .....	45
2.3.1	Analisi dei VFA (GC-MS) .....	47
2.3.2	Domanda chimica di ossigeno (COD) .....	49
2.4	ProBiotipo - Produzione di PHA .....	50
2.4.1	Quantificazione del PHA Metapirolisi-GC-MS .....	56
2.4.2	Estrazione del PHA dalla biomassa batterica .....	58
<b>3</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>59</b>
3.1	Caratterizzazione della FORSU .....	59
3.1.1	Analisi elementare .....	59
3.1.2	Carboidrati, lipidi e proteine totali .....	59
3.1.3	Domanda chimica di ossigeno (COD) .....	60

3.2	Strippaggio di soluzioni standard .....	61
3.2.1	Prima configurazione.....	61
3.2.2	Seconda configurazione.....	62
3.2.3	Terza configurazione .....	66
3.2.4	Quarta configurazione.....	67
3.3	Fermentazione acidogenica accoppiata a strippaggio .....	69
3.3.1	Primo test .....	69
3.3.2	Secondo test (Inoculo e FORSU liofilizzati).....	73
3.3.3	Terzo test.....	74
3.3.4	Quarto Test.....	76
3.4	Produzione di PHA – ProBiotipo.....	79
3.4.1	Primo periodo.....	79
3.4.2	Secondo periodo.....	83
3.4.3	Estrazione del PHA dalla biomassa batterica.....	85
<b>4</b>	<b>Conclusioni.....</b>	<b>86</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>88</b>

## INDICE DELLE FIGURE

FIGURA 1: STRUTTURA, NOME E ALCUNE CARATTERISTICHE DEI VFA. ....	3
FIGURA 2:LE STRATEGIE PER MIGLIORARE LA PRODUZIONE DI VFA [16]. ....	5
FIGURA 3: INFLUENZA DEL PH NEL TASSO DI IDROLISI (A) E NELL'ACIDOGENESI (B),[26]. ....	6
FIGURA 4: CONCENTRAZIONE DEI VFA PRODOTTI DALLA FERMENTAZIONE ACIDOGENICA A DIVERSE TEMPERATURE DA RIFIUTI DA CUCINA [34]. ....	8
FIGURA 5: ACIDO BUTIRRICO PRODOTTO DALLA FERMENTAZIONE A DIVERSE TEMPERATURE DEI RIFIUTI DA CUCINA [34]. ....	8
FIGURA 6: PRODUZIONE DI VFA A DIVERSI PH, TEMPO DI RITENZIONE 5 GIORNI [35] .....	9
FIGURA 7 PRODUZIONE DI VFA A DIVERSI PH, TEMPO DI RITENZIONE 10 GIORNI [35]. ....	10
FIGURA 8 PRODUZIONE DI VFA A DIVERSI PH, TEMPO DI RITENZIONE 15 GIORNI [35]. ....	10
FIGURA 9: VFA PRODOTTI DA DIVERSI SUBSTRATI, A) GRADO DI ACIDIFICAZIONE, B) COMPOSIZIONE DEI VFA PRODOTTI, AAC (ACIDO ACETICO), APR (ACIDO PROPIONICO, ABU (ACIDO BUTIRRICO) [41], MODIFICATA.. .....	12
FIGURA 10: VIE METABOLICHE DELLA FERMENTAZIONE ACIDA. (AET, FERMENTAZIONE DI TIPO ACETATO- ETANOLO; ABE, ACETONE-BUTANOLO-ETANOLO; PTF, FERMENTAZIONE DI TIPO PROPIONATO; BTF, FERMENTAZIONE DI TIPO BUTIRRATO; MAF, FERMENTAZIONE DI ACIDI MISTI; LTF, FERMENTAZIONE DI TIPO LATTATO [16].....	14

FIGURA 11: PERCORSO DI WOOD-LJUNGAHL, VIE METABOLICHE OMOACETOGENE DELLA PRODUZIONE DI ACETATO DA CO <sub>2</sub> . (THF, TETRAIDROFOLATO ; [CO-PROTEINA], ENZIMA CORRINOIDE) [16].	19
FIGURA 12: SCHEMA DI UNA PILA DI ELETTRODIALISI CONVENZIONALE CHE MOSTRA IL PRINCIPIO PER IL RECUPERO DI VFA [74].	20
FIGURA 13: SCHEMA DI ESTRAZIONE CON SOLVENTE A MEMBRANA [88].	22
FIGURA 14: (A) ESTRAZIONE CON SOLVENTE A BASE DI MEMBRANA (MBSE), (B) PERTRAZIONE ATTRAVERSO MEMBRANA LIQUIDA SUPPORTATA (SLM), (C) PERTRAZIONE ATTRAVERSO MEMBRANA LIQUIDA SFUSA (BLM) CON DUE INTERFACCE L / L IMMOBILIZZATE IN UN CONTATTORE A FIBRA CAVA (HF). F: FASE DI ALIMENTAZIONE (DONATRICE), HF: FIBRA CAVA (MICROPOROSA, IDROFOBICA), M: FASE DI MEMBRANA, R: SOLUZIONE DI STRIPPAGGIO (ACCETTORE), S: SOLVENTE. [88].	23
FIGURA 15: SCHEMA DEL RECUPERO DI VFA ATTRAVERSO LO STRIPPAGGIO [72].	24
FIGURA 16: ETICHETTE CERTIFICATE PER PLASTICHE "BIO-BASED", DIN CERTCO, VINÇOTTE	27
FIGURA 17: ETICHETTE CERTIFICATE PER PLASTICHE BIODEGRADABILI.	28
FIGURA 18: CAPACITÀ DI PRODUZIONE GLOBALE DI BIOPLASTICA PER TIPO DI MATERIALE 2019.	29
FIGURA 19: CAPACITÀ DI PRODUZIONE GLOBALE DI BIOPLASTICA PER TIPO DI MATERIALE STIMATO NEL 2024.	29
FIGURA 20: CAPACITÀ PRODUTTIVE GLOBALI DI BIOPLASTICHE NEL 2019.	30
FIGURA 21: CAPACITÀ PRODUTTIVE GLOBALI DI BIOPLASTICHE NEL 2019 PER REGIONE.	31
FIGURA 22: STIMA DELLA CAPACITÀ PRODUTTIVE GLOBALI DI BIOPLASTICHE NEL 2024 PER REGIONE.	31
FIGURA 23: STIMA DELL'USO DEL SUOLO PER LE BIOPLASTICHE, 2019 E 2024.	32
FIGURA 24: IMMAGINE AL TEM DI P.PUTIDA CON GRANULI DI PHA [105].	34
FIGURA 25: SCOPO DELLA TESI NELL'OTTICA DELL'ECONOMIA CIRCOLARE.	38
FIGURA 26: F.O.R.S.U.	39
FIGURA 27: LIOFILIZZATORE ALPHA 1-2 LD PLUS, FORSU LIOFILIZZATA E MACINATA.	39
FIGURA 28: LIPIDI TOTALI (SURNATANTE).	40
FIGURA 29: DETERMINAZIONE DEI CARBOIDRATI TOTALI.	41
FIGURA 30: PRIMA CONFIGURAZIONE PER LO STRIPPAGGIO.	42
FIGURA 31: SECONDA CONFIGURAZIONE, CON L'AGGIUNTA DI CARTA DA FILTRO PER AUMENTARE L'AREA SUPERFICIALE.	43
FIGURA 32: TERZA CONFIGURAZIONE, UTILIZZO DI UNA POMPA PERISTALTICA.	43
FIGURA 33: QUARTA CONFIGURAZIONE, UTILIZZO DI UNA POMPA AD ARIA.	44
FIGURA 34: COSTRUZIONE DEL SISTEMA DI FERMENTAZIONE ACIDOGENICA ACCOPPIATA A STRIPPAGGIO.	45
FIGURA 35: SCHEMA DEL SISTEMA DI FERMENTAZIONE E STRIPPAGGIO.	45
FIGURA 36: FERMENTAZIONE ACIDOGENICA, ACCOPPIATA A STRIPPAGGIO.	46
FIGURA 37: GC-MS, AGILENT HP 7820A CON AUTOCAMPIONATORE - AGILENT HP 5977E.	48
FIGURA 38: STRUMENTO UTILIZZATO PER L'ANALISI DEL COD.	49
FIGURA 39: PROBIOTIPO (PRESSO CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCA PER LE SCIENZE AMBIENTALI).	50
FIGURA 40: SCHEMA D'IMPIANTO DEL PROBIOTIPO.	52
FIGURA 41: PLC PROGRAMMABLE LOGIC CONTROLLER, PROBIOTIPO.	53

FIGURA 42: PROBIOTIPO, PANNELLO DI CONTROLLO.....	54
FIGURA 43: VIALS PRONTI PER L'ANALISI IN GC-MS PER LA QUANTIFICAZIONE DEL PHA.....	56
FIGURA 44: RETTA DI CALIBRAZIONE PER L'ACIDO CROTONICO.....	57
FIGURA 45: METAPIROLISI-GC-MS [125].....	57
FIGURA 46: ESTRAZIONE DEL PHA.....	58
FIGURA 47: PRIMA CONFIGURAZIONE: 0.2 ML DI SOLUZIONE TRAPPOLA (NAOH 1 M) E 0.5 ML DI SOLUZIONE MIX VFA 30 G/L.....	61
FIGURA 48: RISULTATI DELLO STRIPPAGGIO NELLA PRIMA CONFIGURAZIONE; TRE REPLICHE 1, 2 E 3.....	61
FIGURA 49: SECONDA CONFIGURAZIONE: 0.2 ML DI SOLUZIONE TRAPPOLA (NAOH 1 M) E 0.5 ML DI SOLUZIONE MIX VFA 30 G/L.....	62
FIGURA 50: SECONDA CONFIGURAZIONE DI STRIPPAGGIO CON CARTA DA FILTRO, DUE REPLICHE A) E B).....	62
FIGURA 51: SECONDA CONFIGURAZIONE DI STRIPPAGGIO (C E D) CON CARTA DA FILTRO, LA TRAPPOLA CAMBIATA OGNI MEZZ'ORA, LE PERCENTUALI SONO CUMULATE IN 3 H E 30 MIN DALL'AVVIO DELLO STRIPPAGGIO.....	64
FIGURA 52: ANDAMENTI DELL'RSD (%) DELLE RESE NEL TEMPO NELLE REPLICHE C E D.....	65
FIGURA 53: TERZA CONFIGURAZIONE, STRIPPAGGIO CON POMPA PERISTALTICA (60ML/MIN) PER MUOVERE LO SPAZIO DI TESTA.....	66
FIGURA 54: TERZA CONFIGURAZIONE, CON POMPA DA 60 ML/MIN.....	66
FIGURA 55: QUARTA CONFIGURAZIONE CON POMPA AD ARIA (PORTATA 1 L/MIN).....	67
FIGURA 56: QUARTA CONFIGURAZIONE, UTILIZZO DI UNA POMPA AD ARIA CON PORTATA DA 1 L/MIN.....	67
FIGURA 57: QUARTA CONFIGURAZIONE DI STRIPPAGGIO EFFETTUATA CON UNA SOLUZIONE MIX A PH 5.6.....	68
FIGURA 58: FERMENTAZIONE ACCOPPIATA A STRIPPAGGIO.....	69
FIGURA 59: COMPOSIZIONE DEI VFA NEL FERMENTATORE.....	70
FIGURA 60: COMPOSIZIONE DEI VFA NELLA TRAPPOLA.....	71
FIGURA 61: FERMENTAZIONE ACIDOGENICA ACCOPPIATA A STRIPPAGGIO, ANDAMENTO DELLA CONCENTRAZIONE DEI VFA NEL TEMPO.....	72
FIGURA 62: PERCENTUALE DI ACIDO DISSOCIATO IN FUNZIONE DEL PH E PKA.....	72
FIGURA 63: ANDAMENTO DEI VFA (GCOD/L) NEL SECONDO TEST DI FERMENTAZIONE ACCOPPIATA A STRIPPAGGIO.....	73
FIGURA 64: ANDAMENTO DEI VFA (GCOD/L) NEL TERZO TEST DI FERMENTAZIONE ACCOPPIATA A STRIPPAGGIO, ED ANDAMENTO DEL PH DURANTE LA FERMENTAZIONE.....	74
FIGURA 65: VFA RECUPERATI DAL TERZO TEST DI FERMENTAZIONE ACCOPPIATA A STRIPPAGGIO.....	75
FIGURA 66: FERMENTAZIONE ACCOPPIATA A STRIPPAGGIO, QUARTO TEST.....	76
FIGURA 67: COMPOSIZIONE E CONCENTRAZIONE DEI VFA RECUPERATI DURANTE IL QUARTO TEST.....	77
FIGURA 68: MONITORAGGIO SBR, ANDAMENTO DEL PH E DELLA DOMANDA CHIMICA DI OSSIGENO.....	79
FIGURA 69: MONITORAGGIO AR, ANDAMENTO DEL PH E DELLA DOMANDA CHIMICA DI OSSIGENO.....	80
FIGURA 70: PRODUZIONE DI PHA DA MMC, PRIMO PERIODO.....	81
FIGURA 71: PHA DA MMC AL MICROSCOPIO OTTICO A FLUORESCENZA.....	81

FIGURA 72: MONITORAGGIO AR, ANDAMENTO DEL COD ED ACCUMULO DI PHA DA MMC. ....	82
FIGURA 73: ANDAMENTO DEL PH IN SBR ED AR DURANTE SEI CICLI. ....	83
FIGURA 74: PRODUZIONE DI PHA DA MMC, SECONDO PERIODO. ....	84
FIGURA 75: ESTRAZIONE DI PHA DA MMC. ....	85

## INDICE DELLE TABELLE

TABELLA 1: ALTRI STUDI DI LETTERATURA SUL TIPO DI SUBSTRATO E COMPOSIZIONE DEI VFA PRODOTTI, [1] MODIFICATA. ....	13
TABELLA 2: FATTORI DI RISPOSTA DEGLI ACIDI GRASSI VOLATILI UTILIZZATI PER L'ANALISI QUANTITATIVA. ....	48
TABELLA 3: RICETTA DEI NUTRIENTI PER L'ACCRESIMENTO DI MMC. ....	51
TABELLA 4: COSTANTI DI IMPIANTO. ....	55
TABELLA 5: ANALISI ELEMENTARE DELLA FORSU. ....	59
TABELLA 6: CONTENUTO TOTALE SU PESO SECCO DI LIPIDI, CARBOIDRATI E PROTEINE. ....	59
TABELLA 7: DOMANDA CHIMICA DI OSSIGENO (COD), SOLUBILE E TOTALE. ....	60
TABELLA 8: ALTRI RIFERIMENTI DELLA CARATTERIZZAZIONE DELLA FORSU. ....	60
TABELLA 9: CONFRONTO TRA LA PRIMA E LA SECONDA CONFIGURAZIONE, VALORI MEDIATI. ....	63
TABELLA 10: ANALISI STATISTICA TRA LE REPLICHE C E D. ....	65
TABELLA 11: PRIMA FERMENTAZIONE ACCOPPIATA A STRIPPAGGIO, RESE GLOBALI. ....	69
TABELLA 12: ANDAMENTO DEL PH NEL FERMENTATORE. ....	70
TABELLA 13: SECONDA FERMENTAZIONE ACCOPPIATA A STRIPPAGGIO, RESE GLOBALI. ....	73
TABELLA 14: TERZA FERMENTAZIONE ACCOPPIATA A STRIPPAGGIO, RESE GLOBALI. ....	74
TABELLA 15: QUARTA FERMENTAZIONE ACCOPPIATA A STRIPPAGGIO, RESE GLOBALI. ....	76
TABELLA 16: RIEPILOGO DEI TEST DI FERMENTAZIONE ACCOPPIATE A STRIPPAGGIO, RESE GLOBALI. ....	78
TABELLA 17: ESTRAZIONE PHA, TRE REPLICHE. ....	85

## Glossario

VFA:	Acidi grassi volatili.
PHA:	Poliidrossialcanoati.
PHB:	Poliidrossibutirrato.
FORSU:	Frazione organica dei rifiuti solidi urbani.
MMC:	Colture microbiche miste.
HRT:	Tempo di ritenzione.
AET:	Fermentazione di tipo acetato etanolo.
PTF:	Fermentazione di tipo propionato.
BTF:	Fermentazione di tipo butirrato.
MAF:	Fermentazione di tipo mista.
LTF:	Fermentazione di tipo lattato.
SBR:	Sequencing batch reactor.
AR:	Accumulation reactor.
IBC:	Intermediate Bulk Container.
ORP:	Potenziale di ossidoriduzione.
OLR:	Velocità di carico organico.
DMC:	Dimetilcarbonato.
SDS:	Sodio dodecil solfato.



## 1 INTRODUZIONE

La rapida crescita della popolazione umana ha determinato un grande incremento della produzione di rifiuti, la cui corretta gestione dei materiali di scarto è fondamentale per ridurre al minimo il degrado ambientale e favorire la transizione verso una società sostenibile.

La sostenibilità ambientale è un obiettivo per il XXI secolo e, per realizzarlo, è necessario il passaggio verso un'economia circolare che include il recupero, il riuso ed il riciclaggio, favorendo così la riduzione del consumo delle materie prime e la diminuzione della quantità di rifiuti [1].

I rifiuti alimentari, provenienti dalle nostre cucine, dalle mense, dalla trasformazione agroalimentare e dai ristoranti, sono la componente più significativa dei rifiuti solidi urbani (RSU), la cui gestione e continua produzione è diventata una preoccupazione globale [2].

La FAO [3] stima che ogni anno circa un terzo di tutto il cibo prodotto nel globo viene perso o sprecato. Questo spreco alimentare rappresenta un'occasione mancata per migliorare la sicurezza alimentare globale, ma anche per mitigare gli impatti ambientali e l'uso delle risorse derivanti dalle catene alimentari.

Nel 2012 gli Stati membri dell'UE-28 hanno prodotto circa 89 milioni di tonnellate di rifiuti alimentari [4], [5], in particolare, i settori che contribuiscono alla produzione di *food waste* sono le famiglie ( $47 \pm 4$  Mt) e l'industria di trasformazione ( $17 \pm 13$  Mt) [6]. Questi rifiuti vengono gestiti da:

- impianti di digestione anaerobica con produzione di biogas [4];
- impianti di compostaggio per la produzione di compost con scarso valore di mercato, indicativamente pari a 7.5 €/ton [7];
- impianti di termovalorizzazione o incenerimento con un recupero nullo o limitato di energia (a causa dell'elevato tenore di umidità del materiale), talvolta con un'elevata emissione di gas serra e, in situazioni tecnologicamente arretrate, composti tossici nell'atmosfera;
- discariche [2], nelle quali occuperebbero grandi quantità di terreno prezioso [8] e rilascio di gas serra [9].

A tal proposito è importante lo sviluppo di innovative tecnologie che sfruttano tali rifiuti per produrre nuovi materiali con un elevato valore economico come gli acidi grassi volatili a catena corta, detti *VFA* (*volatile fatty acids*), che tradizionalmente vengono prodotti da fonti

petrolchimiche non rinnovabili, causando il consumo di risorse ed emissioni di gas climalteranti (circa 3.3 t di CO<sub>2</sub>eq./t di VFA prodotti, [1]).

L'UE si impegna a ridurre le emissioni di gas serra tra l'80 e il 95% entro il 2050 [1]. La produzione di acidi grassi volatili (VFA) dal flusso di rifiuti segue perfettamente questo obiettivo, in quanto si oppone alla vecchia economia lineare "*take, make and dispose*" [1].

Il recupero di VFA dai rifiuti:

- limita l'apporto di materia ed energia in ingresso;
- minimizza scarti e perdite;
- pone attenzione alla prevenzione degli impatti ambientali e alla realizzazione di nuovo valore sociale e territoriale.

### 1.1 Acidi grassi volatili (Volatile Fatty Acids, VFA)

I VFA sono degli acidi grassi a catena corta che vanno da C<sub>2</sub> a C<sub>6</sub> (es. acetico, propionico, butirrico, isobutirrico, valerico, isovalerico, caproico) (Figura 1), sono importanti composti piattaforma con una domanda di mercato in forte aumento per numerose industrie: farmaceutiche, alimentari, chimiche e sono una preziosa materia prima per prodotti come:

- biogas [10];
- biodiesel [11];
- bioplastiche [12], [13];
- bioidrogeno [14];
- elettricità tramite cella a combustibile [15].

Sul mercato sono presenti vari tipi di acidi grassi volatili con numerosi usi e applicazioni differenti, i principali VFA producibili dalla fermentazione della frazione organica dei rifiuti solidi urbani sono [16] l'acido acetico, l'acido propionico e l'acido butirrico. In particolare:

- Acido acetico; è un elemento chiave per la produzione di vernici, gomme, plastiche, fibre sintetiche, finiture tessili, pesticidi, emulsioni polimeriche, rivestimenti di carta, nelle industrie chimiche ed è uno dei principali componenti di aromi, regolatori di acidità e conservanti utilizzati nelle industrie alimentari e delle bevande [17], [18].

Il valore di mercato si aggira tra 400-800 €/ton [1].

- L'acido propionico; è usato come sali di calcio e di sodio, erbicidi, aromi, fragranze, emulsioni, solventi ecologici per formulazioni di rivestimento, aromi di frutta artificiale, fibre di cellulosa sintetica modificate ecc. Inoltre, può essere usato come conservante

per alimenti (in particolare pane e altri prodotti da forno come i suoi sali di sodio o di calcio), alimenti per animali (direttamente o come suo sale di ammonio) e cereali a causa della sua inibizione della crescita di muffe e di vari batteri. Inoltre, l'acido propionico non è solo un conservante favorevole, ma anche l'elemento chiave nella produzione di vitamina E [18], [19].

Il suo valore di mercato si aggira tra i 2000-2500 €/ton [1].

- L'acido butirrico; utilizzato nel settore dell'alimentazione animale sia come integratore che come antibiotico. Grazie alle sue proprietà anti-patogene può essere utilizzato per ridurre l'uso di antibiotici nell'alimentazione degli animali. Inoltre, è accettato come integratore alimentare per gli animali, in particolare per il pollame e i suini. Infine, l'acido butirrico è ben noto per i suoi effetti antitumorali in quanto induce la differenziazione morfologica e biochimica in una varietà di cellule [20].

Il valore di mercato si aggira intorno ai 1500-1650 €/ton [1].


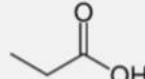
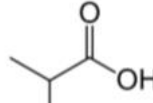
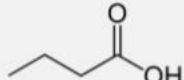
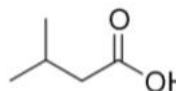
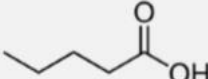
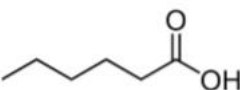
Struttura	Nome comune	Numero atomi di carbonio	Peso molecolare	Punto di ebollizione
	Acetico	2	60	117-118°C
	Propionico	3	74	141°C
	Isobutirrico	4	88	153-154°C
	Butirrico	4	88	162°C
	Isovalerico	5	102	175-177°C
	Valerico	5	102	185°C
	Caproico	6	116	202-203°C

Figura 1: Struttura, nome e alcune caratteristiche dei VFA.

## 1.2 Fermentazione Acidogenica

La fermentazione acidogenica è uno *step* fondamentale della digestione anaerobica [21]. Il processo prevede una serie di fasi in cui la materia organica viene degradata da diversi microrganismi, in assenza di ossigeno, portando alla formazione di  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ . I VFA sono il prodotto intermedio del processo [16]. La trasformazione dei substrati organici complessi in metano e anidride carbonica avviene attraverso quattro fasi, in cui partecipano almeno tre gruppi metabolici distinti di microrganismi che si differenziano sia per i substrati che per i prodotti del loro metabolismo, di seguito vengono riportate le fasi:

1. **Idrolisi**: processo in cui grazie all'azione di batteri idrolitici, le molecole organiche complesse quali proteine, grassi e carboidrati vengono scisse con la formazione di composti solubili, come aminoacidi, acidi grassi, chetoni e alcoli, che possono essere poi ulteriormente idrolizzati a monomeri semplici dai batteri che fanno uso di questi stessi prodotti e che operano la fermentazione;
2. **Acidogenesi**, che avviene contestualmente alla fase precedente, in cui composti solubili derivati dall'idrolisi vengono metabolizzati dai microrganismi acidogenici fermentanti, formando molecole ancora più semplici come gli acidi grassi volatili (VFA), acido acetico, propionico, butirrico e valerico con produzione di sottoprodotti come ammoniacca, anidride carbonica e acido solfidrico. L'idrolisi e l'acidogenesi coinvolgono una vasta gamma di batteri anaerobici, come *Batteriocidi*, *Clostridi*, *Bifidobatteri*, *Streptococchi* e *Enterobacteriaceae* [22];
3. **Acetogenesi**, per azione di batteri acetogeni, in cui a partire dagli acidi grassi ad alto peso molecolare, si ha la formazione di acido acetico, acido formico, biossido di carbonio e idrogeno molecolare. Vengono considerati due meccanismi diversi a seconda che la degradazione avvenga a partire da acidi grassi a catena lunga (LCFA, “*long chain fatty acids*”) o a catena corta (SCFA, “*short chain fatty acids*”, o VFA, “*volatile fatty acids*”).
4. **Metanogenesi**, in cui avviene la formazione di metano a partire dall'acido acetico o attraverso la riduzione del biossido di carbonio utilizzando l'idrogeno come co-substrato. La produzione di  $\text{CH}_4$  rappresenta la conclusione della catena trofica anaerobica, poiché è l'unico composto non reattivo nell'intero processo. La sua sintesi può avvenire attraverso due differenti reazioni: la dismutazione anaerobica dell'acido acetico con formazione di metano e biossido di carbonio, chiamata anche via *acetoclastica* e l'ossidazione anaerobica dell'idrogeno a metano, ad opera di batteri idrogenotrofi.

I VFA sono importanti intermedi che vengono prodotti nelle fasi di *acidogenesi* e *acetogenesi* [16]; in primo luogo i batteri *acidogenici* fermentano i monomeri idrolizzati in acetato, propionato, butirrato, alcoli, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e altri solventi. Quindi, propionato, butirrato, alcoli e CO<sub>2</sub> vengono ulteriormente convertiti in acetato attraverso vie *acetogeniche* di riduzione protonica o via *omoacetogena* [23]. È necessario dunque promuovere le fasi iniziali acidogeniche e acetogeniche inibendo il successivo passaggio metanogenico, che consuma idrogeno. La metanogenesi è una delle principali barriere per la produzione di VFA che deve essere superata.

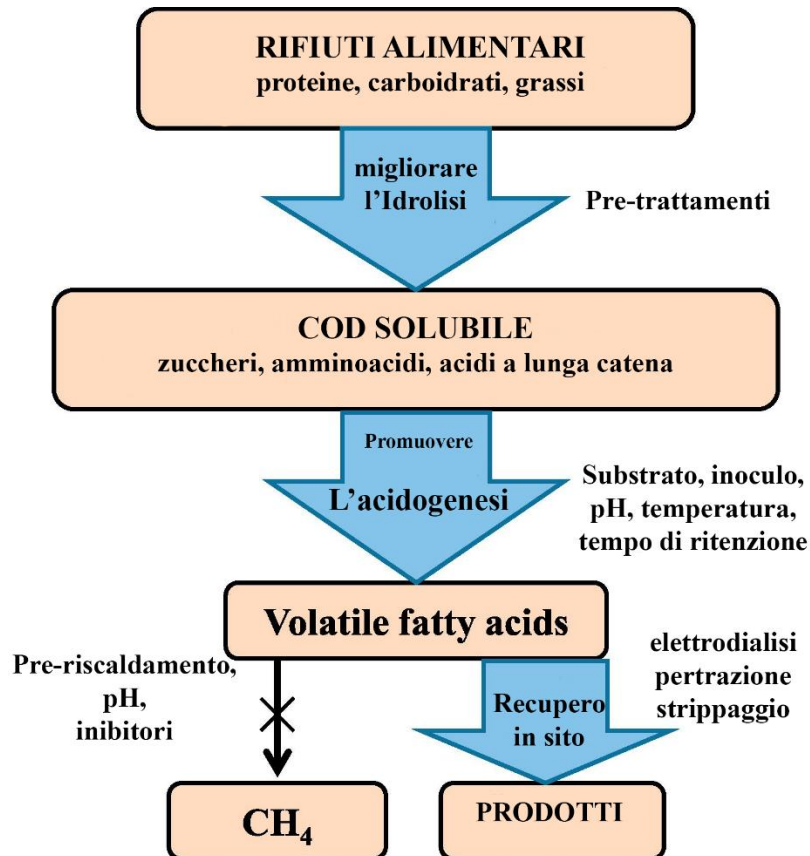


Figura 2:Le strategie per migliorare la produzione di VFA [16].

## 1.2.1 Effetti delle condizioni operative sulla produzione e composizione dei VFA

### 1.2.1.1 pH

Il pH è il fattore critico che controlla la produzione di VFA nella fermentazione [16] in quanto condiziona le attività metaboliche dei microrganismi. La maggior parte degli enzimi non riesce a tollerare ambienti ostili acidi ( $\text{pH} < 3$ ) o alcalini ( $\text{pH} > 12$ ) [24]. Durante la fermentazione acidogenica dei rifiuti alimentari, il pH potrebbe influenzare non solo il tasso di idrolisi ma anche il processo acidogenico [25]; pertanto il pH dovrebbe essere ottimale sia per i batteri *idrolitici* che per i batteri *acidogeni*. Il pH di 7 è il più adatto per l'idrolisi e l'acidogenesi dei rifiuti da cucina, infatti porta alla più alta concentrazione di VFA rispetto ad altri valori di pH [26].

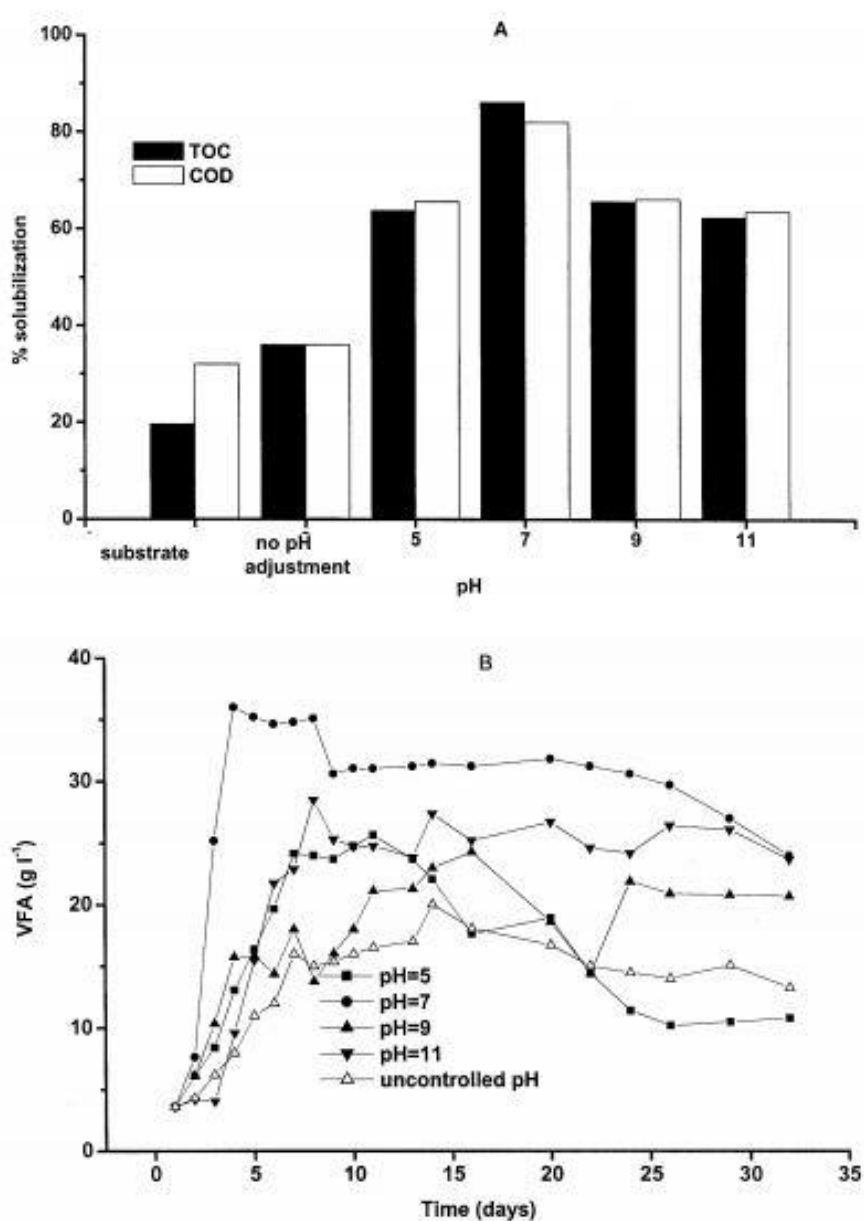


Figura 3: Influenza del pH nel tasso di idrolisi (A) e nell'acidogenesi (B),[26].

Questo è dovuto al fatto che, in condizioni neutre, la maggior parte delle proteine nel substrato sono degradate ad azoto ammoniacale che può essere utilizzato come tampone aggiuntivo nella soluzione fermentativa acidificata [16]. Diversi risultati sono ottenuti co-fermentando fanghi di depurazione e rifiuti alimentari; viene dimostrato che la produzione di VFA incrementa a pH 9 [27]. Questi risultati potrebbero essere correlati a proteine e carboidrati più solubili prodotti nella fase di idrolisi, mentre gli acidogeni non sono stati inibiti a pH 9 [16].

Molti studi hanno suggerito che il pH può modificare anche la via metabolica della fermentazione ed influenzare la distribuzione dei prodotti fermentativi:

- Via metabolica di tipo acetato, a pH pari a 5 o incontrollato [28];
- Via metabolica di tipo propionato, a pH 6.5 [29]
- Via metabolica di tipo butirato, a  $\text{pH} < 5$  [30], a pH 8 [31],  $6 < \text{pH} < 7$  [28].

I risultati incoerenti della ricerca suggeriscono che la composizione dei prodotti e la produzione di VFA dipendono anche da altri fattori.

In alcuni studi gli effetti di pH sono stati valutati insieme alla temperatura; verificando la produzione di VFA in condizioni acide (pH 5.5) e alcaline (pH 10) a temperatura mesofila (35°C) e termofila (55°C) [32]; il risultato evidenzia che l'alta temperatura influenza positivamente la produzione di VFA [32].

### **1.2.1.2 Temperatura**

La temperatura è un importante fattore operativo per migliorare la produzione di VFA poiché influenza la crescita di microrganismi, l'attività degli enzimi e il tasso di idrolisi [1], [16]. La fermentazione acidogenica può essere condotta a intervalli di temperatura differenti, in base ai tipi di microrganismi selezionati a diversa temperatura:

- mesofilia, in cui la temperatura è compresa tra i 35°C e i 45°C;
- termofilia, in cui la temperatura è compresa tra il 45°C e i 55°C
- ipertermofilia, con una temperatura superiore ai 60°C.

La condizione mesofila (35°C) è considerata la più favorevole dal punto di vista economico [28]; allo stesso tempo Jiang et al. (2013), ha riscontrato una produzione di VFA 10 volte maggiore in condizioni di termofilia rispetto alle condizioni di mesofilia senza l'aggiustamento del pH [33]; inoltre le condizioni di termofilia hanno determinato un aumento del tasso di idrolisi, portando a una maggiore produzione di VFA. Per quanto riguarda la composizione dei

VFA generati anche la temperatura, come il pH, influenza le vie metaboliche della fermentazione:

L'Acido acetico e propionico sono gli acidi più diffusi generati a 35° C e 45° C durante la fermentazione dei rifiuti alimentari; l'acido butirrico è il principale prodotto e rappresenta l'81% del totale quando la temperatura aumenta a 55° C[28].

Risultati simili sono stati trovati studiando l'effetto di tre diverse temperature, sull'idrolisi e l'acidificazione dei rifiuti da cucina; la produzione di VFA totali è risultata favorita a 35°C, la composizione dei VFA prodotti in termofilia ha favorito la formazione di acido butirrico [34].

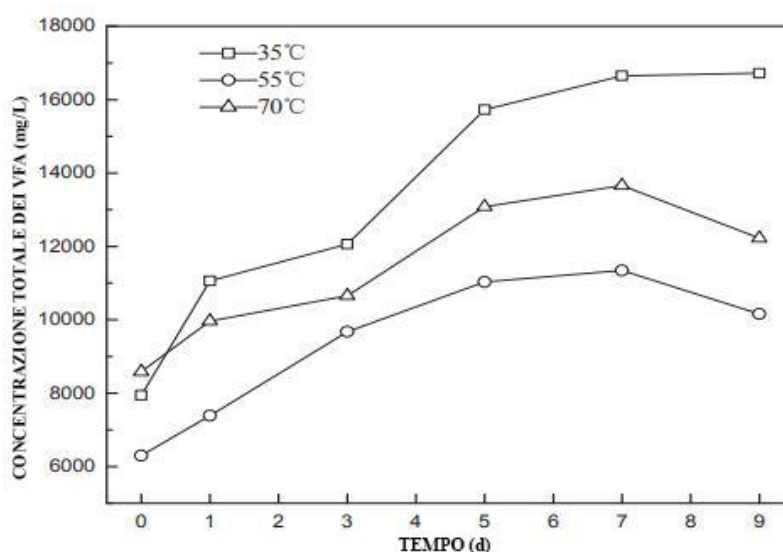


Figura 4: Concentrazione dei VFA prodotti dalla fermentazione acidogenica a diverse temperature da rifiuti da cucina [34].

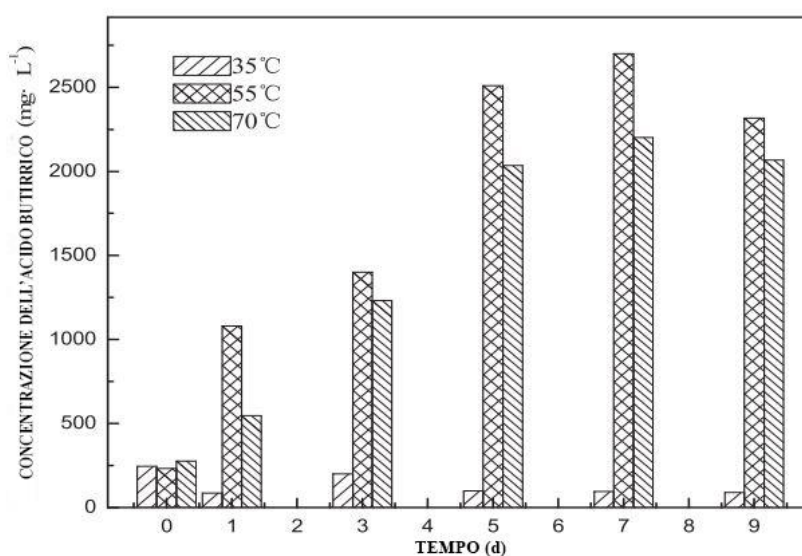


Figura 5: Acido butirrico prodotto dalla fermentazione a diverse temperature dei rifiuti da cucina [34].



### 1.2.1.3 Tempo di ritenzione (HRT)

Nei diversi studi di letteratura il tempo di ritenzione utilizzato viene stabilito sulla base del tipo di substrato e dal suo tasso di idrolisi [16]; in alcuni casi può differire anche nel substrato. In genere un tempo di ritenzione più lungo porta ad una produzione di VFA maggiore poiché i microrganismi restano a contatto con il substrato per più tempo [21], tuttavia la resa dei VFA dipende anche da altri fattori.

Di seguito viene riportato uno studio riguardante la produzione dei VFA in relazione a diversi tempi di ritenzione (HRT) [35]:

- a) 5 giorni, (Figura 6);
- b) 10 giorni, (Figura 7);
- c) 15 giorni, (Figura 8).

Lo studio mostra che senza l'aggiustamento di pH non si apprezzano differenze significative sulla produzione dei VFA. La differenza di produzione di VFA in relazione al tempo di ritenzione si apprezza invece a pH alcalini, con la produzione di VFA che aumenta con l'aumentare dell'HRT (Figura 8).

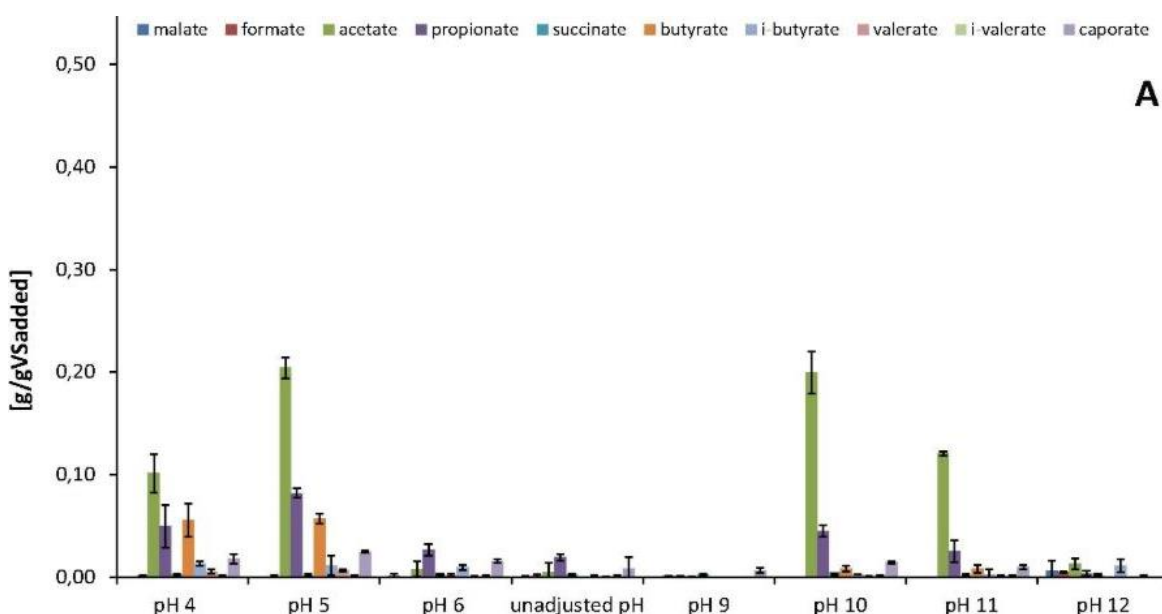


Figura 6: Produzione di VFA a diversi pH, tempo di ritenzione 5 giorni [35]

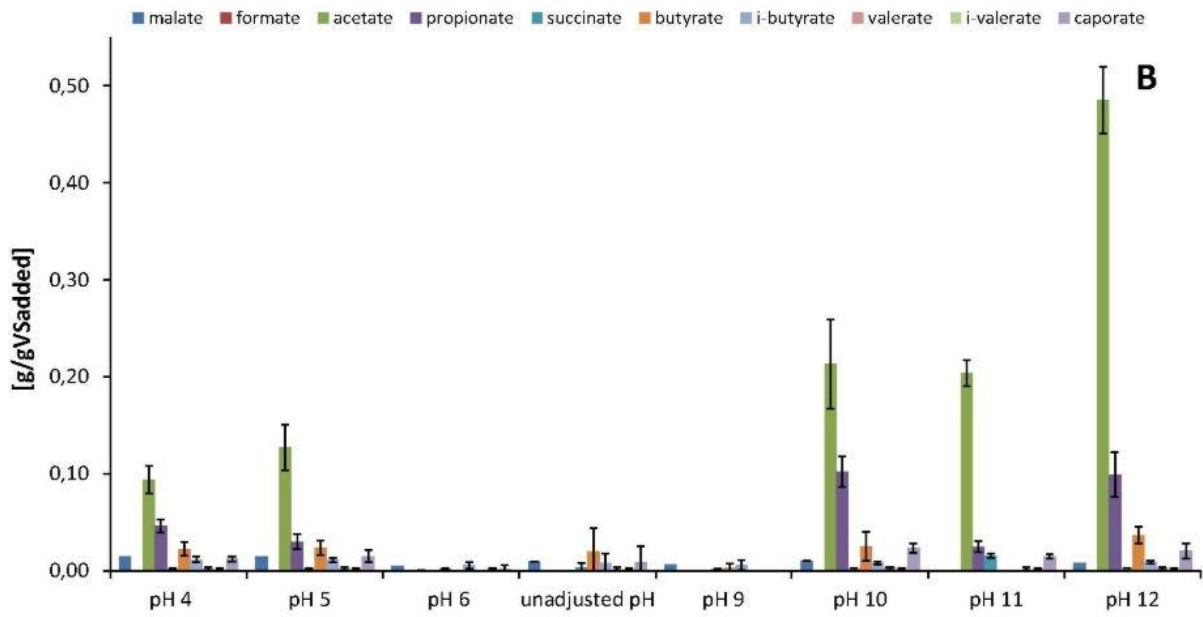


Figura 7 Produzione di VFA a diversi pH, tempo di ritenzione 10 giorni [35].

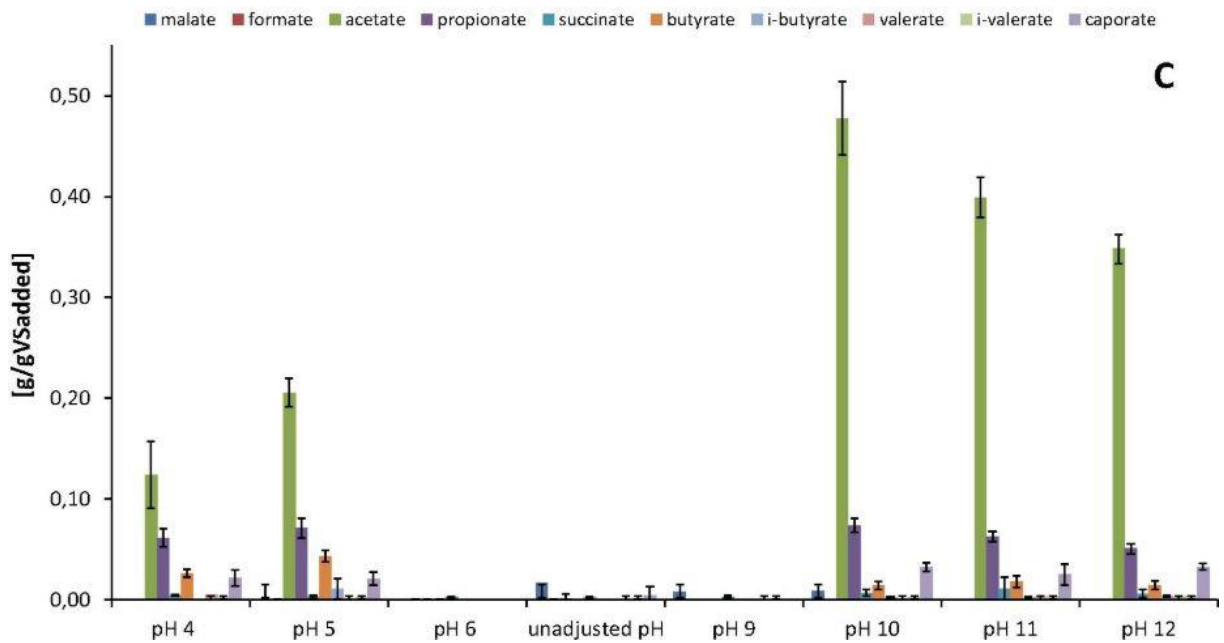


Figura 8 Produzione di VFA a diversi pH, tempo di ritenzione 15 giorni [35].

#### 1.2.1.4 Inoculo

Il degrado dei rifiuti organici richiede microrganismi misti ben funzionanti, quindi l'inoculo è un elemento fondamentale per accelerare il processo. Batteri *idrolitici*, batteri *acidogeni*, *acetogeni* e *metanogeni* sono i principali costituenti dei consorzi microbici misti che vengono utilizzati. Al fine di migliorare la produzione dei VFA i batteri *metanogeni* devono essere inibiti.

Ad oggi, sono stati utilizzati diversi metodi per inibire le attività dei *metanogeni*, come:

- il pretrattamento termico: consiste nel surriscaldare l'inoculo a 100° C o oltre, prima della fermentazione così da inattivare i *metanogeni* [36];
- il controllo del pH: un pH troppo basso o troppo alto potrebbe inibire la metanogenesi e portare all'accumulo di VFA [30] poiché le attività dei *metanogeni* sono favorite nell'intervallo di pH 7.8–8.2 [37];
- l'aggiunta di inibitori: esistono due tipi di inibitori della metanogenesi, specifici e non specifici [16]. Il gruppo specifico inibisce gli enzimi esistenti solo nei *metanogeni* e il gruppo non specifico può inibire l'attività dei *metanogeni* ed altri [38].

La variazione dell'inoculo determina il cambiamento della via metabolica della fermentazione e quindi la composizione dei VFA [16]. La produzione di un particolare acido grasso volatile può essere potenziata usando alcuni inoculi specifici [36]. Yan et al. (2014) [36], hanno studiato la produzione di acido acetico dall'*Acetobacterium woodii* in coltura con altri batteri *acidogeni*. I risultati hanno mostrato che l'aggiunta di *A. woodii* induce la fermentazione omoacetogenica durante i primi tre giorni e porta all'acetato come prodotto dominante. Chen et al. (2013) [39] hanno ottenuto un'alta concentrazione di acido propionico utilizzando *Propionibacterium acidipropionici* come inoculo.

### 1.2.1.5 Substrato

La caratteristica del substrato è uno dei fattori più importanti che influenzano la produzione di VFA e la composizione del prodotto. La quantità di VFA prodotti dipende dal grado di acidificazione del substrato [10]. Il grado di acidificazione è un fattore chiave nel processo di fermentazione per la produzione di VFA ed è definito come la percentuale di COD iniziale convertito in acidi organici e altri prodotti di fermentazione [40]. Il grado di acidificazione è determinato dalla frazione organica facilmente fermentabile del flusso di rifiuti. In uno studio che ha utilizzato diverse tipologie di rifiuti organici aventi la stessa concentrazione di sostanza organica, pari a 8 g COD /L e di 2 g VSS/L, si è osservato che il tipo di substrato influenza la produzione di VFA, sia in composizione che in concentrazione [41].

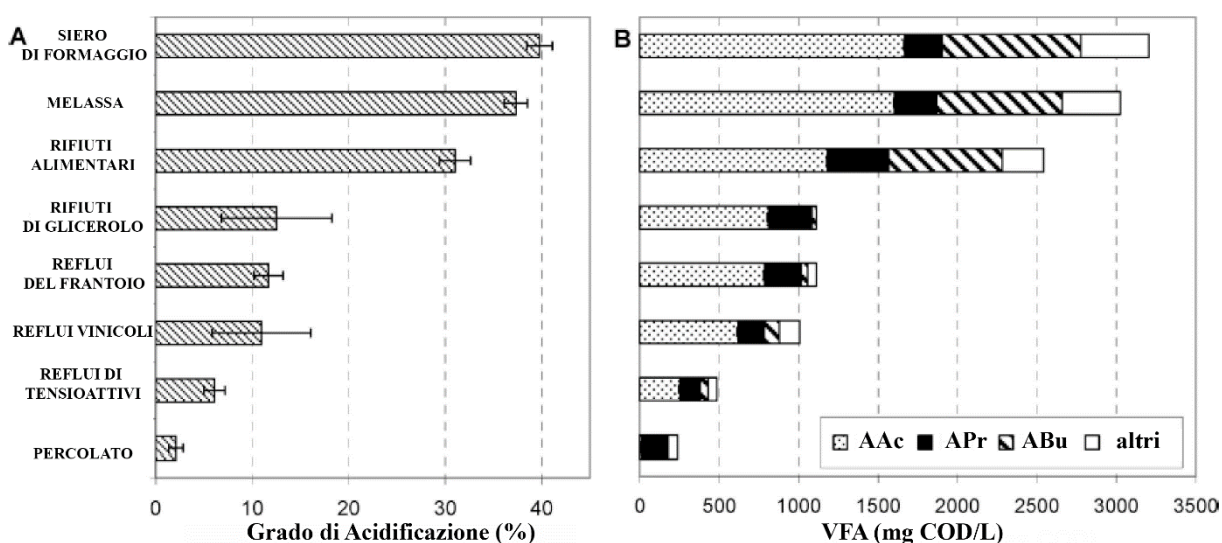


Figura 9: VFA prodotti da diversi substrati, A) grado di acidificazione, B) composizione dei VFA prodotti, AAc (Acido acetico), APr (acido propionico), ABu (acido butirrico) [41], modificata..

In letteratura sono presenti molti studi sulla produzione dei VFA da diversi substrati, (Tabella 1), [1].

Tabella 1: Altri studi di letteratura sul tipo di substrato e composizione dei VFA prodotti, [1] modificata.

Flusso di rifiuti	Condizioni operative	Produzione di VFA	Composizione VFA (%)			altri	Riferimenti
			Acido acetico	Acido propionico	Acido butirrico		
Biomassa di microalghe	pH 11, HRT 15 giorni, 35 ° C, reattori batch anaerobici in scala di laboratori.	0,83 gVFA /gsCOD	70	10	7	13	[35]
Rifiuti solidi urbani	pH 10, HRT 10 giorni, 35 ° C, reattori batch anaerobici in scala di laboratorio	8,320 mgCOD/L come VFA con 94% VFA/ sCOD	70	7	13	10	[32]
Rifiuti alimentari	pH 6, HRT 20 giorni, 30 ° C, reattore batch anaerobico	0.918 gVFA/gVSS	70	5	17	8	[30]
Rifiuti alimentari	pH 6, HRT 17 giorni, 30 ° C, reattori batch anaerobici in scala di laboratorio	0.67 kg VFA/kgVS	30	2	6	8	[42]
Lettiera pollame	pH 5.5, HRT 4 giorni, 35 ° C, reattori batch anaerobici	0.67 kg VFA/kgVS	-	-	-	-	[43]
Scarti del tonno	pH 8, HRT 32 giorni, 35 ° C, reattore anaerobico continuo	30.611 mgCOD / L	60	15	10	15	[44]
Fanghi attivi	pH 9, HRT 6 giorni, 55 ° C, fermentatore semi continuo	423 mgCOD / gVSS	-	-	-	-	[39]

## 1.2.2 Vie Metaboliche

Come detto precedentemente esistono diverse vie metaboliche coinvolte nella fermentazione acidogenica. La prevalenza di alcune vie rispetto ad altre è determinata dai fattori descritti nel paragrafo 1.2.1. Lo studio delle vie metaboliche e di come i fattori chimico-fisici le influenzano è molto importante, possono dare informazioni chiare sulla fermentazione e si può privilegiare una via metabolica al fine di determinare l'aumento di uno specifico VFA [27].

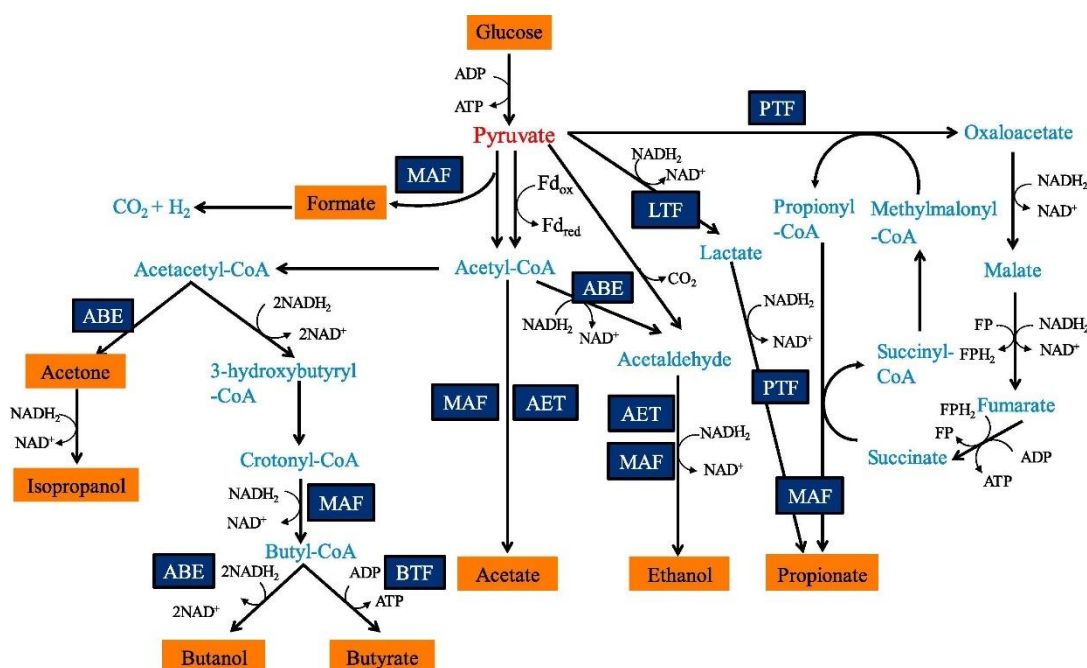


Figura 10: Vie metaboliche della fermentazione acidogenica. (AET, fermentazione di tipo acetato-etanolo; ABE, acetone-butanolo-etanolo; PTF, fermentazione di tipo propionato; BTF, fermentazione di tipo butirrato; MAF, fermentazione di acidi misti; LTF, fermentazione di tipo lattato [16]

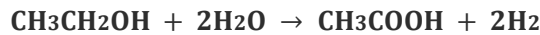
La fermentazione acidogenica dei rifiuti alimentari è condotta attraverso una serie di reazioni chimiche catalizzate da diversi enzimi. Esistono numerosi e distinti percorsi all'interno del digestore della fermentazione anaerobica e assumono un ruolo cruciale nelle prestazioni del sistema in termini di rese e ratei di reazione. Nella rete delle vie metaboliche acidogeniche, il piruvato è il punto di controllo cardine che può essere convertito in una vasta gamma di prodotti, come: acetato, propionato, butirrato, etanolo, propanolo, butanolo, idrogeno ed anidride carbonica [45]. Le vie metaboliche presenti nel reattore acidogenico svolgono un ruolo importante nel determinare l'efficienza di conversione complessiva dei rifiuti alimentari.

### 1.2.2.1 Via metabolica di tipo acetato-etanolo (AET)

Il percorso di fermentazione con acetato ed etanolo come prodotti principali è definito fermentazione di tipo acetato-etanolo (AET), (Figura 10). L'acido acetico e l'etanolo sono considerati gli intermedi più comuni durante la fermentazione acida di sostanze organiche e di solito si uniscono nella fermentazione per la produzione di idrogeno [46]. L'acetato può generarsi dal piruvato attraverso la via Acetil-CoA, ma può anche essere generato dall'ossidazione sintrofica dell'etanolo o di acidi grassi a catena più lunga, come il propionato e il butirato [16], (Figura 10):



Eq. 1 [16].



Eq. 2 [16].

In sostanza, l'abbondanza di acetato nella fermentazione AET è fortemente associata agli enzimi funzionali nella via dell'acetil-CoA e nell'ossidazione sintrofica [47]. L'etanolo è anche uno dei prodotti comuni che possono essere ottenuti durante la fermentazione del glucosio o di altri materiali organici:



Eq. 3 [16].

La tendenza della produzione di acetato è strettamente correlata ai microambienti nel fermentatore, inclusi tipo di substrato, inoculo, pH, temperatura, velocità di carico organico (OLR), tempo di ritenzione idraulica (HRT), e spazio di testa. La composizione di carboidrati, proteine e lipidi nei rifiuti alimentari determina la distribuzione dei prodotti di fermentazione, ad esempio una grande percentuale di carboidrati potrebbe favorire la generazione di acetato [48].

### 1.2.2.2 Via metabolica di tipo propionato (PTF)

La via metabolica acida con propionato come prodotto predominante è definita: fermentazione di tipo propionato (PTF). Il propionato è un altro prodotto comune durante la fermentazione acida di rifiuti alimentari. Teoricamente, una mole di glucosio potrebbe generare due moli di propionato [49]:



Eq. 4, [16].

Il propionato viene prodotto attraverso due percorsi distinti, (vedi Figura 10):

In uno di essi, il propionato proviene dalla riduzione del piruvato con il lattato come intermedio: in primo luogo, il lattato viene prodotto per riduzione del piruvato con la catalizzazione dell'enzima *lattato-deidrogenasi*; quindi il lattato viene ridotto a propionato dalla *propionato-deidrogenasi* [50].

L'altro percorso per la produzione di propionato può essere eseguito da batteri acidogeni come: *Corynebacteria*, *Propionibacterium* e *Bifidobacterium* attraverso il ciclo della *transcarbossilasi*. Tutte le reazioni del ciclo *transcarbossilasi* sono reversibili [16]. Di recente, l'interesse per la produzione di propionato dalla biomassa attraverso la fermentazione, è aumentato a causa del suo alto valore aggiunto nell'applicazione industriale. Molti sono i fattori che vanno ad influenzare la resa di acido propionico come prodotto principale della fermentazione; questa è favorita a pH 4.0–4.5 e a pH 4.0 la percentuale di propionato può salire fino al 10% dei VFA totali [30]. Precedenti ricerche hanno dimostrato che la produzione di propionato potrebbe essere migliorata usando come substrati il lattato misto e il glucosio [51]; ciò potrebbe essere dovuto al fatto che l'incremento del lattato, essendo questo un intermedio nella via metabolica di tipo propionato, potrebbe favorire il processo di formazione del propionato. Altri studi hanno riportato la possibilità di controllo della produzione di propionato dalla fermentazione acidogenica tramite regolazione del potenziale di ossidoriduzione (ORP), la resa di acido propionico può essere ridotta aumentando l'ORP [52].



### 1.2.2.3 Via metabolica di tipo butirrato (BTF)

I principali prodotti metabolici acidogenici della fermentazione di tipo butirrato (BTF) sono butirrato e acetato. L'idrogeno è sempre il prodotto di accompagnamento. Le reazioni metaboliche per la produzione di butirrato dal glucosio sono:



Eq. 5,[49].

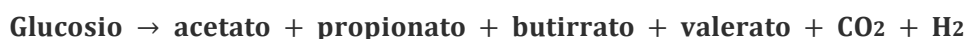


Eq. 6,[49].

Il butirrato viene sintetizzato mediante riduzione e decarbossilazione del piruvato con il consumo di acetato (vedi, Figura 10). Innanzitutto, il piruvato viene convertito in acetil-CoA dalla *piruvatodeidrogenasi* poi l'acetil-CoA viene convertito in butirril-CoA con acetoacetil-CoA, in 3-idrossibutil-CoA e crotonil-CoA come intermedi dalla catalisi di tialosi, in 3-idrossibutilil-CoA *deidrogenasi* e butil CoA *deidrogenasi* [37]. L'ultimo passaggio dal butirril-CoA al butirrato è catalizzato da enzimi *fosfotransbutyrylase* e butirrato-chinasi o catalizzato dal butirril-CoA: acetato CoA-transferasi [53]. Durante il processo di produzione del butirrato, vengono consumati due NADH<sub>2</sub> per ridurre gli intermedi.

### 1.2.2.4 Via metabolica acida mista (MAF)

Nella fermentazione ad acido misto (MAF), i batteri *acidogenici* potrebbero fermentare monomeri organici in una miscela di acetato, propionato, butirrato, valerato insieme a biogas (CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>) alla stessa concentrazione:



Eq. 7, [16].

La via metabolica mista è comune nella fermentazione acida di rifiuti alimentari con acetato e butirrato come principali metaboliti [28]. Questa via è influenzata da vari fattori come la concentrazione, le caratteristiche dei substrati, il pH e il potenziale redox [54]. Ad esempio, un pH basso (<4,5) porta alla produzione di acetato, butirrato ed etanolo come prodotti primari, mentre un pH > 6,5 indurrebbe l'aumento della produzione di etanolo e la diminuzione della formazione di acidi [55]. Inoltre, la distribuzione di questi prodotti metabolici dipende dal tipo di batteri dell'inoculo e dall'espressione dei loro enzimi funzionali. Tali fattori potrebbero aumentare la produzione di uno specifico acido grasso volatile [16].

### 1.2.2.5 Via metabolica di tipo lattato (LTF)

La fermentazione di tipo lattato (LTF) è una via metabolica per convertire il glucosio o altri materiali organici in acido lattico da batteri come *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*, ecc. Durante la fermentazione di tipo lattato, il piruvato prodotto dalla glicolisi viene convertito in lattato dalla *lattato-deidrogenasi* con la trasformazione del  $\text{NADH}_2$  in  $\text{NAD}^+$  (vedi Figura 10). Il processo di produzione del lattato può essere suddiviso in due tipi di fermentazione:

1. Fermentazione *omolattatica* in cui una mole di glucosio viene convertita in due moli di acido lattico:



Eq. 8, [16].

2. Fermentazione *eterolattata* in cui viene prodotta una mole di acido lattico insieme a  $\text{CO}_2$  ed etanolo:



Eq. 9, [56].

L'acido lattico è stato ampiamente utilizzato nell'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica e anche come utile monomero per la produzione di polimeri biodegradabili nell'industria chimica [57]. La produzione di acido lattico dalla fermentazione dipende dal substrato, dal pretrattamento, pH, temperatura, ecc.

In uno studio, i rifiuti di buccia di patata si sono fatti fermentare utilizzando colture miste, a temperatura di  $35^\circ\text{C}$ , producendo acido lattico ad una concentrazione di  $60 \text{ g / L}$  [58].

### 1.2.2.6 Via metabolica omoacetogenica

Nelle comunità anaerobiche, esiste un gruppo di batteri obbligati che possono utilizzare l'idrogeno come donatore di elettroni per ridurre l'anidride carbonica in acetato [59]. Questa reazione è definita omoacetogenesi ed i batteri sono chiamati *omoacetogeni* [49].



Eq. 10, [16].

Tale processo è chiamato anche percorso di Wood-Ljungdahl [16] che si ramifica in due direzioni: metile e carbonile.

- Il ramo metilico inizia consumando 2 moli di equivalenti riducenti per ridurre la CO<sub>2</sub> in acido formico dall'enzima *formato-deidrogenasi*. Dopo una serie di reazioni catalizzate da successivi enzimi *formato-deidrogenasi*, *metilene-H<sub>4</sub>F-reduttasi* e *metiltransferasi*, viene sintetizzato il gruppo metile. In questo ramo, la sintesi del gruppo metilico consuma totalmente sei moli di equivalenti riducenti;
- Il ramo carbonilico è la riduzione di CO<sub>2</sub> in CO dall'*acetil-CoA sintasi* e questa fase consuma due moli di equivalenti riducenti.

I gruppi metile e carbonile vengono convertiti in Acetil-CoA che in ultima fase viene convertito in acetato con la sintesi di ATP.

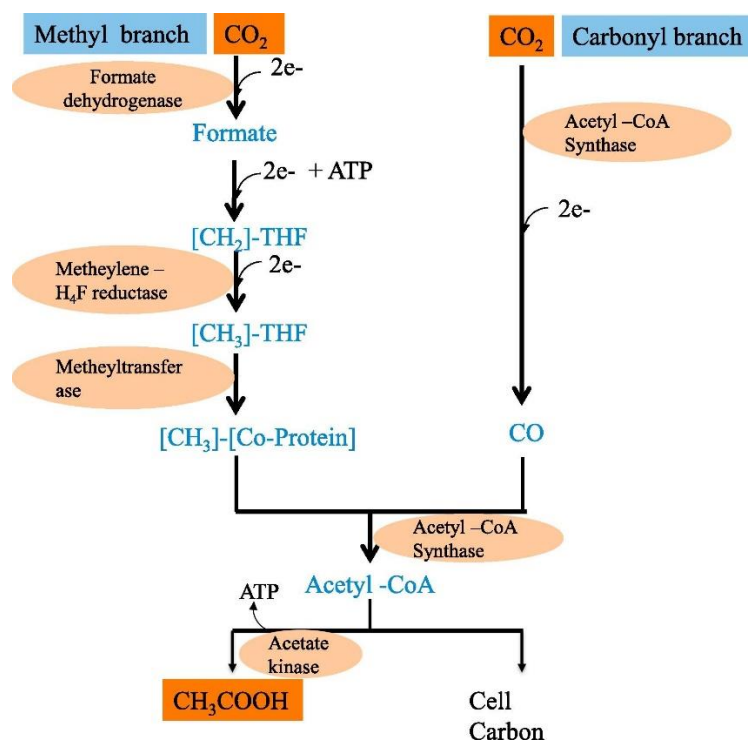


Figura 11: Percorso di Wood-Ljungdahl, Vie metaboliche omoacetogene della produzione di acetato da CO<sub>2</sub>. (THF, tetraidrofolato; [co-proteina], enzima corrinoidi) [16].

### 1.3 Recupero dei VFA dalla fermentazione

La principale barriera nell'uso del processo di fermentazione per la produzione di VFA è la difficoltà tecnica associata al loro recupero dai brodi di fermentazione [60]. Infatti, la separazione e purificazione degli acidi organici dalla massa di liquidi, rappresenta la porzione più rilevante dei costi di produzione [61]. Pertanto, il tema del recupero di questi prodotti della fermentazione ha ricevuto una notevole attenzione. Ad oggi sono state testate varie tecniche per il recupero degli acidi organici dai brodi di fermentazione, tra cui:

- Elettrodialisi [62], [63];
- osmosi inversa e nanofiltrazione [20], [64]–[66];
- adsorbimento [67] e scambio ionico [61];
- estrazione con solvente [68], [69], [70];
- pertrazione [71];
- stripping [72].

#### 1.3.1.1 Elettrodialisi

Convenzionalmente, l'elettrodialisi è un processo di separazione a membrana utilizzato per trasportare i soluti ionici da una soluzione all'altra, attraverso membrane di scambio anionico e cationico, separate da una guarnizione distanziatrice che forma singole celle tra due elettrodi. La soluzione viene pompata attraverso le celle, i cationi migrano verso il catodo e passano attraverso la membrana di scambio cationico, ma vengono trattenuti dalla membrana di scambio anionico; viceversa per gli anioni che si muovono verso l'anodo, passando attraverso la membrana di scambio anionico, ma provenienti dalla membrana di scambio cationico [73]. Ciò si traduce nella concentrazione di un elettrolita (sale, acido o base) in compartimenti alternativi, camere concentrate e camere diluite, come descritto in Figura 12 per il recupero di acido acetico e butirrico [74].

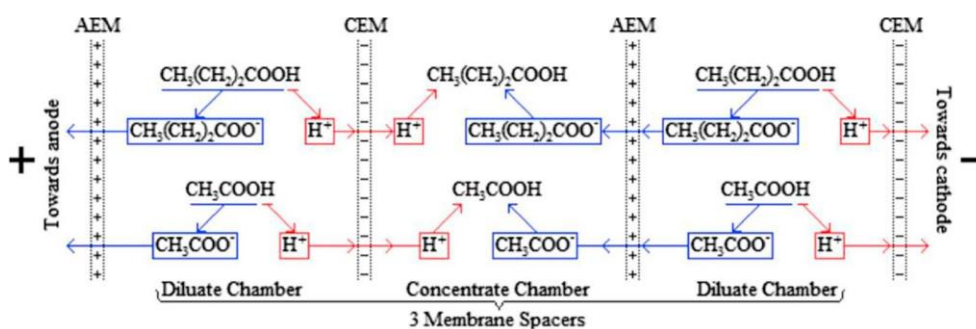


Figura 12: Schema di una pila di elettrodialisi convenzionale che mostra il principio per il recupero di VFA [74].

Jones et al. (2015) [74] hanno utilizzato l'elettrodialisi convenzionale per rimuovere i VFA inibitori dai brodi di fermentazione. Entro 60 minuti di funzionamento, l'elettrodialisi convenzionale ha rimosso fino al 99% dei VFA dalle soluzioni modello e dai brodi di fermentazione reali, contenenti fino a 1.2 g / L ciascuno, di VFA diversi.

### **1.3.1.2 Osmosi inversa e nanofiltrazione**

L'osmosi inversa e la nanofiltrazione sono processi a membrana che utilizzano membrane semipermeabili per separare i soluti (molecole organiche) dal solvente (tipicamente acqua). Consentono al solvente di passare attraverso le membrane rigettando i soluti ad una pressione di lavoro superiore a quella osmotica della soluzione. Normalmente, l'osmosi inversa viene utilizzata per il recupero o il riutilizzo dell'acqua nel contesto del trattamento delle acque reflue [75]–[78]. Tali tecniche sono state utilizzate per il recupero dei VFA dai flussi di rifiuti. In questo contesto, le prestazioni di osmosi inversa e nanofiltrazione sono influenzate da una serie di fattori, tra cui il pH della soluzione, la temperatura, la concentrazione dei soluti e la pressione. Zhou et al., (2013) [66], hanno utilizzato l'osmosi inversa per separare l'acido acetico dai monosaccaridi in soluzioni idrolizzate. Tuttavia, la tecnica di recupero non è stata utilizzata per separare i singoli VFA dalla fermentazione. Diversi studi sperimentali hanno utilizzato la nanofiltrazione per il recupero dei VFA dal brodo di fermentazione [20], [64]–[66]. In tali lavori le membrane di nanofiltrazione hanno determinato un recupero di VFA fino al 75%, fornendo concentrati ricchi di VFA fino a 3.23 g/L di acetato e 2.5 g/L di butirrato dalle acque reflue agricole [20], [65]. Analogamente, Xiong et al. (2015) [79] hanno utilizzato la nanofiltrazione per recuperare i VFA da un digestore, ottenendo recuperi pari all'86% dei VFA prodotti in 21 giorni.

### **1.3.1.3 Adsorbimento/Desorbimento**

Il metodo di adsorbimento per il recupero di VFA viene eseguito facendo passare il digestato ricco di VFA attraverso una colonna di resina assorbente (solitamente resina a scambio ionico). Gli anioni carbossilati dei VFA si vanno a scambiare con l'anione funzionale della resina. La colonna di resina esausta viene successivamente rigenerata con un solvente appropriato [1]. Recenti studi hanno dimostrato che gli acidi grassi volatili, in particolare, l'acido acetico e l'acido butirrico vengono ben adsorbiti dalla resina; vi è uno scambio ionico tra gli acidi carbossilici e i gruppi amminici della resina [80]. Tali studi però non sono mirati al recupero, ma piuttosto alla rimozione dei VFA che agiscono come composti inibitori nei processi di fermentazione. Vari studi in cui hanno utilizzato l'adsorbimento per il recupero di VFA [80]–[83], Rebecchi et al. (2016) [81], hanno studiato l'efficienza di adsorbimento di diverse resine

amminiche (tra cui ammina primaria, terziaria e quaternaria) e hanno concluso che la resina da ammina terziaria era la migliore grazie alle sue elevate prestazioni di scambio ionico in presenza di acido acetico. Con queste resine Rebecchi et al. (2016) hanno ottenuto rese di rimozione di VFA di circa il 76% ed 85% [81].

#### 1.3.1.4 Estrazione con solvente

L'estrazione con solvente è un metodo efficace per il recupero dei VFA da soluzioni diluite [84]. L'efficienza di estrazione dei VFA tramite solvente dipende da una serie di fattori quali, il pH, il tipo di VFA, il solvente e la composizione del digestato ricco di VFA.

Alkaya et al., (2009) [68] hanno studiato il recupero dei VFA dal brodo di fermentazione di barbabietola da zucchero utilizzando l'ossido di trietilfosfina (TOPO) e cherosene come solvente. Le percentuali di recupero ottenute sono state tra il 61% e il 98%. I principali punti critici dell'estrazione tramite solvente sono:

- la presenza di sali disciolti che può influenzare negativamente sull'efficienza del recupero dei VFA a causa della coestrazione di anioni salini e di un aumento del pH delle soluzioni acquose [83];
- alcuni solventi utilizzati per il recupero possono essere tossici o inibitori per i microrganismi [85].

In considerazione di ciò, la pertrazione (estrazione con membrana a base di solventi biocompatibili) è stata investigata come metodo di recupero alternativo dei VFA per evitare il contatto degli estrattori tossici con i bioti [86], [87].

L'estrazione con solvente a membrana (Figura 13) (*MBSE*) è una tecnica relativamente nuova rispetto all'estrazione con solvente classica in cui il trasferimento di massa tra liquidi immiscibili avviene dall'interfaccia di una membrana microporosa [88]. Il solvente utilizzato può essere rigenerato mediante lo stripping (solventi altobollenti) dei VFA o mediante la rimozione dello stesso tramite distillazione (solventi bassobollenti).

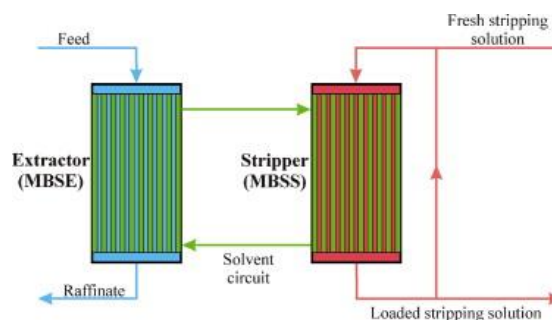


Figura 13: Schema di estrazione con solvente a membrana [88].

### 1.3.1.5 Pertrazione

La pertrazione è un processo simile all'estrazione con solvente a membrana in cui sia l'estrazione che lo stripping del soluto sono realizzati in un'apparecchiatura: un contattore trifase con due interfacce a contatto con una membrana liquida [88]. Le membrane liquide (LM) possono essere di tre tipologie:

- Membrana liquida supportata (LMS); è formata immergendo il solvente nei pori di una parete microporosa (con un diametro dei pori inferiore a  $1\ \mu\text{m}$ ). Un problema che finora non è stato risolto, è la breve durata di SLM.
- Membrana liquida in blocco (LMB); è simile alla precedente, ma le membrane sono più spesse, il contattore è a fibra cava.
- Membrana liquida emulsionata (LME); la fase continua dell'emulsione funge da membrana liquida, mentre nei sistemi in cui le soluzioni acquose sono separate, la membrana è formata dalla fase organica immiscibile che separa l'alimentazione acquosa e le soluzioni di stripping.

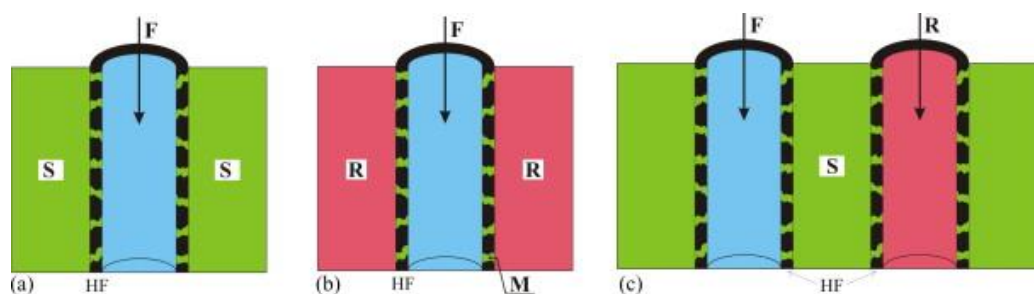


Figura 14: (a) Estrazione con solvente a base di membrana (MBSE), (b) pertrazione attraverso membrana liquida supportata (SLM), (c) pertrazione attraverso membrana liquida sfusa (BLM) con due interfacce L/L immobilizzate in un contattore a fibra cava (HF). F: fase di alimentazione (donatrice), HF: fibra cava (microporosa, idrofobica), M: fase di membrana, R: soluzione di stripping (accettore), S: solvente. [88].

### 1.3.1.6 Strippaggio

Lo strippaggio è un metodo che solitamente viene applicato per la rimozione di contaminanti organici volatili dall'acqua [89], [90]. Recentemente questo processo è stato utilizzato per il recupero dei VFA prodotti dalla digestione anaerobica [72]. Dallo spazio di testa del digestore i VFA in forma volatile vengono veicolati (come miscela gassosa satura di vapore acqueo) alla *trappola*, che è solitamente formata da una soluzione assorbente a pH alcalino nella quale, gli acidi grassi perdono la loro volatilità e vengono catturati (vedi Figura 15). Il processo di strippaggio del gas è regolato dalla legge di Henry che mette in relazione le concentrazioni di un composto in fase acquosa e in fase gassosa [1]. La legge di Henry descrive la pressione

parziale di un componente volatile (ad es. VFA) in una fase gassosa ( $P_{VFA}$ ) in equilibrio con una soluzione diluita di quel componente ad una concentrazione,  $C_{VFA(aq)}$ :

$$C_{VFA(aq)} = K_H \times P_{VFA}$$

Dove  $K_H$ , è la costante della legge di Henry ( $\text{mol L}^{-1} \text{atm}^{-1}$ ).

Eq. 11. Legge di Henry, [72].

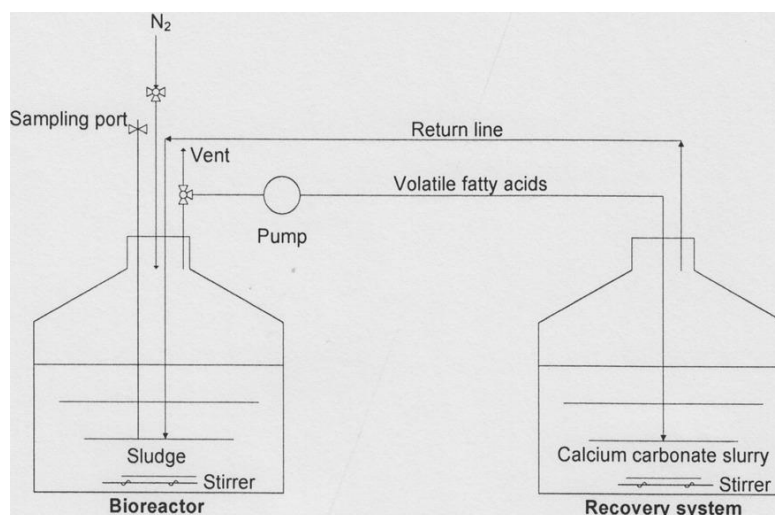


Figura 15: Schema del recupero di VFA attraverso lo stripping [72].

Utilizzando il metodo di stripping e assorbimento del gas, Li et al. (2015) [72] hanno recuperato i VFA da un digestore anaerobico alimentato ripetutamente con glucosio. In questo studio, una combinazione di stripping e assorbimento di azoto gassoso con uno *slurry* di carbonato di calcio, è stata utilizzata per recuperare VFA come sali di calcio costituiti per l'80% da butirato e per il 20% da acetato, con quantità minori di propionato e valerato. Inoltre, lo stripping in maniera intermittente ha portato ad una conversione dell'acido lattico in altri VFA [72].

#### 1.4 Plastiche e bioplastiche

La plastica è un materiale importante ed onnipresente nella nostra vita quotidiana. Grazie alle numerose funzioni che offre, ci aiuta a far fronte a molteplici sfide che la società impone. Materiali leggeri e innovativi nelle autovetture o negli aerei fanno risparmiare carburante e riducono le emissioni di CO<sub>2</sub>. I materiali isolanti ad alte prestazioni ci aiutano a risparmiare sulle bollette energetiche. Negli imballaggi, la plastica aiuta a garantire la sicurezza alimentare, riducendo gli sprechi alimentari. In combinazione con la stampa 3D, i materiali plastici biocompatibili possono salvare vite umane consentendo l'innovazione medica. Tuttavia, troppo spesso il modo in cui le materie plastiche vengono attualmente prodotte, utilizzate e scartate non rientra nell'ottica di un'economia circolare causando problemi ambientali [91].



La produzione globale di plastica negli ultimi 60 anni è aumentata esponenzialmente, negli ultimi 13 anni sono stati prodotti circa 3.900 Mt di plastica con circa il 40% degli articoli che entrano nel flusso dei rifiuti lo stesso anno di produzione, questo dato corrisponde quasi alla metà di tutta la plastica prodotta in questo periodo (8.300 Mt) [92]. La necessità di sostituire le materie plastiche a base di petrolio con alternative sostenibili e rispettose dell'ambiente è diventata, negli ultimi anni, una priorità assoluta, a causa dell'accumulo ormai incontrollato di tali sostanze dannose nell'ecosistema, con ricadute importanti sia sull'ambiente che sulla fauna, soprattutto quella acquatica, con conseguente alterazione degli equilibri naturali e della catena alimentare.

Per cercare di ridurre la produzione di materie plastiche “tradizionali” non biodegradabili, che si accumulano costantemente, e dare pertanto un contributo alla risoluzione di tali problematiche ambientali, il continuo progresso della scienza e della tecnologia dei materiali ha permesso lo sviluppo di biopolimeri completamente biodegradabili prodotti da risorse rinnovabili. Esempi di questi materiali sono polimeri derivati da amido, acido polilattico, polimeri cellulosici e poliidrossialcanoati (*PHA*) [93].

#### **1.4.1 Cosa si intende per bioplastiche?**

Le bioplastiche non sono una sola sostanza, ma comprendono un'intera famiglia di materiali con proprietà e applicazioni diverse. Secondo la *European Bioplastics*, un materiale plastico viene definito bioplastica se è a base biologica (*bio-based*), biodegradabile o presenta entrambe le proprietà.[94]

Il termine, “*bio-based*” sta ad indicare che il materiale è stato prodotto totalmente o parzialmente da fonti biologiche. Esempi di biomassa utilizzata per produrre bioplastiche sono mais, canna da zucchero o cellulosa.

Il termine, “biodegradabile” indica una caratteristica del materiale dettata dalla presenza nell'ambiente di microorganismi decompositori quali funghi, alghe, batteri in grado di ridurre le macromolecole organiche costituenti il composto in molecole più semplici, fino a riportarle ad uno stadio inorganico, cioè in acqua e anidride carbonica. Attraverso la biodegradazione il materiale organico, giunto al suolo, tende progressivamente a decomporsi, fino a sparire. Questo fenomeno è molto importante per l'ambiente che deve smaltire i rifiuti e le scorie per far posto alla nuova vita. L'anidride carbonica così prodotta viene poi utilizzata dagli alberi, piante e alghe mediante fotosintesi per sintetizzare zuccheri e da questi tutte le altre numerose sostanze presenti in natura.

La proprietà della biodegradazione non dipende dalla base delle risorse di un materiale ma è piuttosto legata alla sua struttura chimica. In altre parole, il 100% di materie plastiche a base biologica può essere non biodegradabile e il 100% di materie plastiche a base fossile può biodegradare. [94]

La European Bioplastics classifica la famiglia delle bioplastiche in tre gruppi:

1. Bioplastiche “*bio-based*” o “*parzialmente bio-based*” non biodegradabili come PE, PP o PET (i cosiddetti drop-in) e polimeri per prestazioni tecniche come PTT o TPC-ET;
2. Bioplastiche “*bio-based*” e biodegradabili come PLA, PHA, PBS.
3. Bioplastiche a “*fossil-based*” biodegradabili come PBAT.

C'è molta confusione nel mercato internazionale, perché i processi di standardizzazione sono avanzati a ritmi diversi in tutto il mondo; le domande sono sempre le stesse:

Come si può misurare il contenuto “*bio-based*” delle bioplastiche? Quale standard, metodologia, termine ed etichette dovrebbero essere applicati?

#### **1.4.2 Standard per bioplastiche “*bio-based*”**

Le aziende produttrici di bioplastiche “*bio-based*” possono indicare: *il contenuto di carbonio* o *il contenuto in massa* su base biologica. Una metodologia consolidata per misurare il contenuto di carbonio a base biologica in materiali o prodotti è il metodo 14C (norma UE: CEN / TS 16137, corrispondente norma USA: ASTM 6866). Sono disponibili schemi di certificazione ed etichette di prodotti derivati, basati sullo standard europeo e statunitense, ad esempio dal certificatore belga Vinçotte o dal certificatore tedesco DIN CERTCO. Un materiale o prodotto può anche essere specificato come a base biologica indicando il suo contenuto di massa a base biologica. Questo metodo è complementare al 14C e tiene conto di elementi chimici diversi dal carbonio a base biologica, come ossigeno, azoto e idrogeno. L'Associazione francese Chimie du Végétal (ACDV) ha introdotto un corrispondente schema di certificazione e il Comitato europeo di normalizzazione (CEN) sta attualmente sviluppando uno standard per questo particolare metodo.[94]

DIN CERTCO:



TÜV AUSTRIA Belgium:





			
<p>between 20 and 40% biobased</p>	<p>between 40 and 60% biobased</p>	<p>between 60 and 80% biobased</p>	<p>more than 80% biobased</p>

Figura 16: Etichette certificate per plastiche "bio-based", DIN CERTCO, Vinçotte

### 1.4.3 Standard per bioplastiche biodegradabili

Il termine biodegradabile perde di significato se l'ambiente ed il tempo di biodegradazione non vengono specificati. Se un materiale o un prodotto viene pubblicizzato come biodegradabile, dovrebbero essere fornite anche ulteriori informazioni sui tempi, il livello di biodegradazione e le condizioni circostanti richieste. Ove possibile, la bioplastica europea raccomanda di concentrarsi sull'affermazione più specifica della compostabilità e di eseguirne il backup con i corrispondenti riferimenti standard (ISO 17088, EN 13432/14995 o ASTM 6400 o 6868), una certificazione e un'etichetta conforme (Vinçotte o DIN CERTCO, OK compost, Vinçotte). La compostabilità è la caratteristica di un prodotto, che gli consente di biodegradarsi in condizioni specifiche (ad es. una certa temperatura, tempi, ecc.); si distingue:

- il *Compostaggio Industriale*, il quale consente di raggiungere alte temperature (55 – 65°C) è in grado di velocizzare i processi di degradazione. Queste condizioni specifiche sono descritte nelle norme, come la norma europea sul compostaggio industriale EN

13432 (per imballaggi) o EN 14995 (per materie plastiche in generale). Materiali e prodotti conformi a questo standard possono essere certificati ed etichettati di conseguenza. [95].

- Compostaggio domestico, temperature di processo più basse (30 – 40°C), attualmente manca uno standard europeo per la compostabilità domestica. [96], la risposta TÜV AUSTRIA a questa sfida è “OK Compost Home” ancora in fase sperimentale.

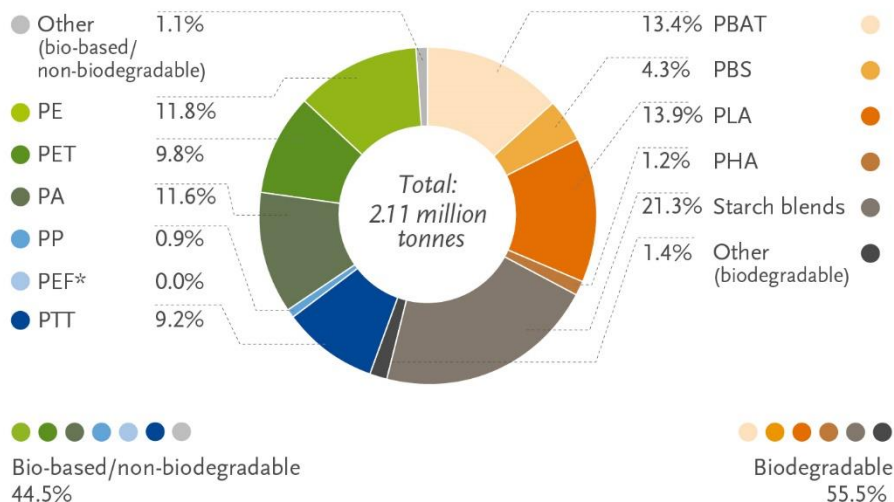


Figura 17: Etichette certificate per plastiche biodegradabili.

#### 1.4.4 Produzione Globale

Le bioplastiche rappresentano circa l'1% degli oltre 359 milioni di tonnellate di plastica prodotta ogni anno. Ma con l'aumento della domanda e con l'emergere di applicazioni e prodotti più sofisticati, il mercato delle bioplastiche è in continua crescita e diversificazione. La capacità di produzione globale di bioplastiche dovrebbe aumentare da circa 2.11 milioni di tonnellate nel 2019 a circa 2.43 milioni di tonnellate nel 2024 [97].

### Global production capacities of bioplastics 2019 (by material type)

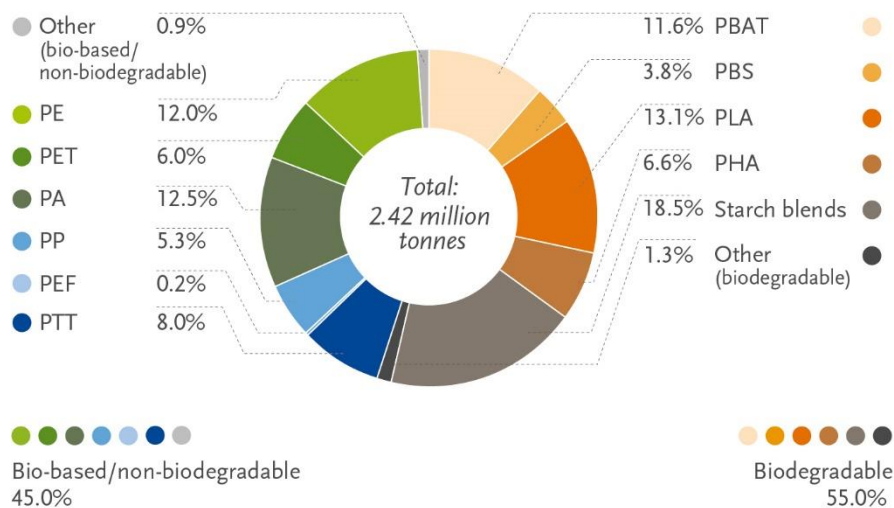


\*PEF is currently in development and predicted to be available in commercial scale in 2023.

Source: European Bioplastics, nova-Institute (2019)  
More information: [www.european-bioplastics.org/market](http://www.european-bioplastics.org/market) and [www.bio-based.eu/markets](http://www.bio-based.eu/markets)

Figura 18: Capacità di produzione globale di bioplastica per tipo di materiale 2019.

### Global production capacities of bioplastics 2024 (by material type)



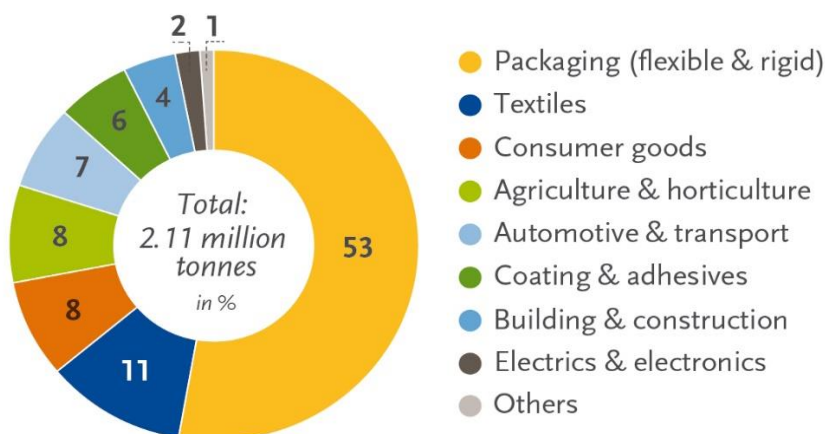
Source: European Bioplastics, nova-Institute (2019)  
More information: [www.european-bioplastics.org/market](http://www.european-bioplastics.org/market) and [www.bio-based.eu/markets](http://www.bio-based.eu/markets)

Figura 19: Capacità di produzione globale di bioplastica per tipo di materiale stimato nel 2024.

Il packaging rimane il più grande campo di applicazione per tali materiali, con circa il 53%, ovvero 1.2 milioni di tonnellate, del mercato totale delle bioplastiche nel 2019. I dati confermano anche che questi materiali sono già utilizzati in molti altri settori, inclusi tessuti,

beni di consumo, applicazioni nel settore automobilistico e dei trasporti, in agricoltura e orticoltura [97].

*Global production capacities of bioplastics in 2019 (by market segment)*



Source: European Bioplastics, nova-Institute (2019). More information: [www.european-bioplastics.org/market](http://www.european-bioplastics.org/market) and [www.bio-based.eu/markets](http://www.bio-based.eu/markets)

Figura 20: Capacità produttive globali di bioplastiche nel 2019.

Nell'ottica dello sviluppo delle capacità regionali, l'Asia rimane un importante centro di produzione con oltre il 55% di bioplastiche attualmente prodotte. Un quarto della capacità produttiva si trova in Europa. Si prevede che questa quota aumenterà fino al 30% entro il 2024 con l'impegno della Commissione Europea per il passaggio a un modello di economia circolare che dovrebbe accelerare il ritmo di crescita e sviluppo dell'industria delle bioplastiche in Europa [97].

### Global production capacities of bioplastics in 2019 (by region)



Source: European Bioplastics, nova-Institute (2019)  
More information: [www.european-bioplastics.org/market](http://www.european-bioplastics.org/market) and [www.bio-based.eu/markets](http://www.bio-based.eu/markets)

Figura 21: Capacità produttive globali di bioplastiche nel 2019 per regione.

### Global production capacities of bioplastics in 2024 (by region)

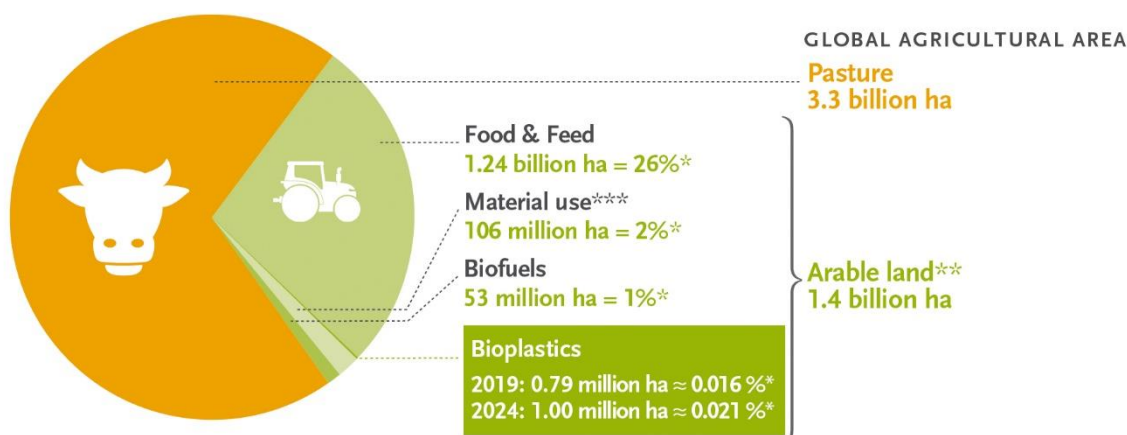


Source: European Bioplastics, nova-Institute (2019)  
More information: [www.european-bioplastics.org/market](http://www.european-bioplastics.org/market) and [www.bio-based.eu/markets](http://www.bio-based.eu/markets)

Figura 22: Stima della Capacità produttive globali di bioplastiche nel 2024 per regione.

Il terreno utilizzato per coltivare le materie prime rinnovabili per la produzione di bioplastiche rimane a circa 0.79 milioni di ettari nel 2019. Ciò rappresenta lo 0.016% della superficie agricola globale di 4.8 miliardi di ettari. Nonostante la crescita del mercato, la quota di utilizzo del suolo per le bioplastiche aumenterà leggermente fino allo 0.021% fino al 2024. Ciò indica ancora una volta che non vi è concorrenza tra le materie prime rinnovabili per alimenti e mangimi e la produzione di bioplastiche [97].

## Land use estimation for bioplastics 2019 and 2024



Source: European Bioplastics (2019), FAO Stats (2017), nova-Institute (2019), and Institute for Bioplastics and Biocomposites (2019). More information: [www.european-bioplastics.org](http://www.european-bioplastics.org)

\* In relation to global agricultural area  
\*\* Including approx. 1% fallow land  
\*\*\* Land-use for bioplastics is part of the 2% material use

Figura 23: Stima dell'uso del suolo per le bioplastiche, 2019 e 2024.

### 1.5 Poliidrossialcanoati (PHA)

I PHA sono una promettente famiglia di bio-poliesteri di origine batterica, caratterizzati da una vasta gamma di proprietà fisiche e meccaniche a seconda della loro composizione chimica. Gli oltre 150 diversi tipi di monomeri conferiscono specifiche proprietà e funzionalità [98]. Nelle applicazioni industriali questa potenzialità è sfruttata producendo in modalità controllata specifici monomeri con catene a diverse lunghezze, attraverso la formazione di una serie di copolimeri "su misura". Tali copolimeri "su misura" possono essere prodotti in condizioni controllate di crescita, in quanto se viene fornita una miscela definita di substrati per un determinato tipo di microrganismi, viene formato un copolimero ben definito e riproducibile [99]. Dal punto di vista ambientale, i PHA sono sia bio-based che biodegradabili in quanto possono essere prodotti da materie prime rinnovabili e sono degradati naturalmente da microrganismi in grado di secernere *depolimerasi* di *poliidrossibutirrato* (PHB), enzimi che idrolizzano i legami esteri in monomeri idrosolubili e oligomeri [100]. Questa caratteristica è diventata di interesse industriale per l'utilizzo dei PHA come materiali plastici naturali, biodegradabili e biocompatibili per un'ampia gamma di possibili applicazioni, come suture chirurgiche o contenitori di imballaggio [99]. I PHA possono essere sintetizzati da più di 90 generi di batteri gram-positivi e gram-negativi, come il *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes/Ralstonia*, *Azotobacter*, *Rhizobium*. Quando le cellule batteriche sono temporaneamente prive di uno o più elementi nutritivi, come azoto (N), zolfo (S), fosforo



(P), magnesio (Mg) oppure ossigeno (O), il loro metabolismo non funziona normalmente ed entrano in uno stato di stress. In tale circostanza la cellula può accumulare delle riserve nutritive: fosforo in forma di polifosfato (poli P) e carbonio nelle forme di PHA; quest'ultimo si accumula nel batterio sotto forma di granuli, di dimensioni comprese tra 0.2 – 0.7  $\mu\text{m}$ , fino ad una quantità che può raggiungere il 90% del peso secco della massa batterica. Tali granuli vengono sfruttati come riserva di carbonio ed energia dalla cellula in mancanza di fonte di carbonio extracellulare.

L'osservazione che la quantità di PHA accumulata nella cellula batterica aumenta al diminuire dell'apporto di nutrienti essenziali, risale agli anni '60, quando si intuì che i batteri producono e accumulano il polimero quando esauriscono le scorte di nutrienti necessari per la divisione cellulare, ma hanno ancora una fonte di carbonio a disposizione. Fin dal primo ritrovamento di PHB nel 1926 [101] più di cento diverse unità monomeriche sono state identificate come costituenti di PHA in più di trecento differenti microrganismi. Quando si progettano le condizioni di coltura per l'ottimizzazione delle rese è importante quindi, tenere in considerazione le diverse esigenze di crescita dei ceppi batterici impiegati.

Sulla base di questa considerazione è possibile distinguere i batteri in due gruppi:

- Batteri che hanno bisogno di una fonte di carbonio in eccesso e di una carenza di nutrienti (P, N, S) in una determinata fase della crescita per avviare la polimerizzazione, ad esempio: *Ralstonia eutropha* e *Pseudomonas oleovorans*.
- Batteri che non richiedono carenza di nutrienti essenziali e polimerizzano PHA durante tutto il ciclo di crescita: *Alcaligenes latus* ed *Escherichia coli*.

Esistono due tipi di microorganismi anaerobici in grado di immagazzinare carbonio: gli accumulatori di fosfato (*polyphosphateaccumulating organisms*, PAO) e gli organismi che accumulano glicogeno (*glycogen-accumulating organisms*, GAO). I PAO hanno la capacità di accumulare polimeri come PHA, glicogeno e polifosfati utilizzando l'energia immagazzinata come poli-P quando non è più disponibile l'ossigeno. I GAO sono i concorrenti dei PAO; utilizzano come substrato il glicogeno, e l'energia rilasciata nel processo di glicolisi è successivamente utilizzata per accumulare prodotti di fermentazione, come acetato, sotto forma di PHB [102]. Il granulo prodotto, che consiste in catene di PHA, è circondato da una membrana costituita da lipidi e proteine, la quale regola le interazioni tra il centro polimerico apolare e i dintorni acquosi. In ogni granulo sono localizzate migliaia di catene di PHA formanti un'elica con due filamenti tenuti insieme dalle forze di Van der Waals e dai legami a idrogeno [103]. Il

numero di granuli per cellula è specifico: *Ralstonia eutropha* accumula da 8 a 12 granuli di grandezza variabile, mentre per la *Pseudomonas oleovorans* si stimano uno o due granuli più grandi [104].

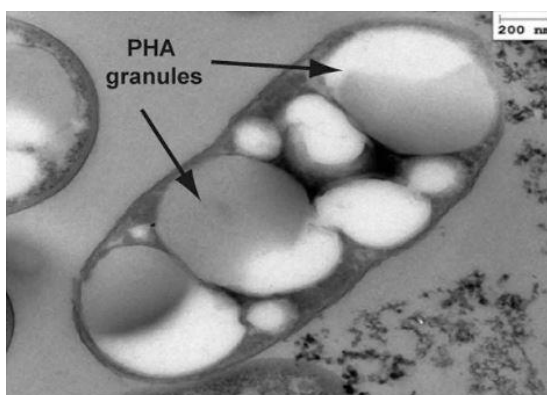
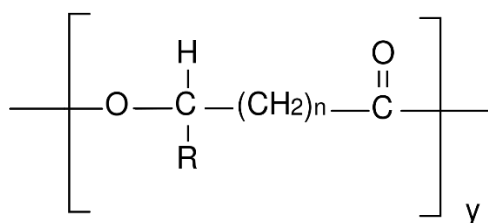


Figura 24: Immagine al TEM di *P.putida* con granuli di PHA [105].

L'esatta composizione dei PHA dipende dal tipo di batterio da cui sono sintetizzati e dalla fonte di carbonio utilizzata durante la fase di produzione; i PHA vengono generalmente classificati come:

- PHA a catena corta, i quali hanno un gruppo R di tipo alchilico con unità monomerica dai 3 ai 5 atomi di carbonio;
- PHA a catena media, caratterizzati da un gruppo R di tipo alchilico con unità monomerica dai 6 ai 14 atomi di carbonio;
- PHA a catena lunga, ottenuti da acidi grassi a lunga catena che contengono una unità monomerica costituita da più di 14 atomi di carbonio.

La formula chimica generale di struttura è la seguente:



L'estrema variabilità della natura chimica delle catene laterali è alla base della notevole varietà delle proprietà dei PHA: si va da polimeri tipicamente termoplastici, come il poliidrossibutirrato (PHB), a gomme come il poliidrossiottanoato (PHO), con possibilità di interventi chimici secondari, ad esempio reticolazioni.

I PHA presentano comunque caratteristiche comuni quali l'insolubilità in acqua ma alta solubilità in cloroformio e altri solventi alogenati, e la resistenza alle radiazioni U.V.; sono tuttavia scarsamente resistenti agli acidi e alle basi. I PHA più comuni sono l'omopolimero PHB e il copolimero poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato) (PHBHV), quest'ultimo identificato come un possibile sostituto biodegradabile delle polioleofine, impiegate nella produzione di bottiglie soffiate, film per imballaggi, contenitori in plastica, posate usa e getta, reti e corde per la pesca industriale. Questi materiali sono poliesteri termoplastici con proprietà meccaniche comparabili con quelle dei tradizionali polimeri a base di petrolio e le loro proprietà sono molto simili a quelle del polietilene (PE) e del polipropilene (PP). Il poliidrossibutirrato (PHB) e il poliidrossivalerato (PHV) sono particolarmente adatti per il confezionamento alimentare, sono meno permeabili all'ossigeno di quanto lo siano le altre plastiche, questo permette di ridurre aggiunte di componenti antiossidanti [106].

### **1.5.1 Produzione PHA**

La produzione industriale dei PHA è basata sulla fermentazione di colture microbiche pure, ovvero popolazioni di microorganismi che derivano da un'unica specie microbica e risultano quindi composte da un unico ceppo batterico, su substrati ad elevato costo quali zuccheri come il glucosio, o composti contenenti carboidrati come il mais. Ciò comporta un elevato costo di produzione di tali materiali, che rende il PHA prodotto non competitivo con le materie plastiche non biodegradabili e sintetizzate da fonti non rinnovabili, questo fattore rappresenta il principale limite alla diffusione su larga scala dei PHA. A causa dei costi elevati di produzione si sta affermando l'uso di colture miste che abbatta la gran parte dei costi di processo, come la strumentazione sterile per le colture singole, la gestione di un personale estremamente specializzato, la selezione di microorganismi e del loro substrato di crescita [107]. Dato il largo utilizzo e diffusione dei fanghi di depurazione e il fatto che gli organismi che producono PHA sono naturalmente presenti in tali bio-processi, gran parte della ricerca per la produzione di PHA da colture microbiche miste (MMC) si è orientata verso il trattamento biologico delle acque reflue. La produzione di PHA per mezzo di MMC rappresenta un'opportunità per il recupero del carbonio organico dalle acque reflue grezze mediante il trattamento biologico [108]. L'uso combinato di colture microbiche miste e materie prime a basso valore è attualmente oggetto di indagine al fine di ridurre i costi operativi. In particolare, il prezzo del substrato ha la maggiore influenza sul costo di produzione. Il substrato più economico costa 0.18 € al kg, rispetto al costo del polipropilene che si aggira ai di 0.15 € al kg [106]. Altri costi sono dovuti alla fase di estrazione, cruciale per poter recuperare il polimero dall'interno della cellula. Per migliorare la produzione di PHA, le colture miste devono essere preliminarmente arricchite in

organismi che accumulano il PHA. Questo di solito viene effettuato sotto l'alimentazione dinamica di opportune fonti di carbonio per creare condizioni alternate di eccesso e mancanza di disponibilità di carbonio, designata come *feast and famine*. Per utilizzare materie prime di scarto e surplus idonee per la produzione di PHA, il processo di fermentazione aerobica può essere accoppiato con una fermentazione acidogenica per convertire la frazione organica in acidi grassi volatili (VFA), precursori necessari per la sintesi di PHA da colture miste.

### 1.5.2 Colture Microbiche Miste (MMC)

Un'alternativa all'impiego di colture singole, come già detto in precedenza, è l'uso di colture microbiche miste (MMC), arricchite a partire da fanghi attivi per la depurazione delle acque reflue. Nei processi a fanghi attivi la biomassa cresce in condizioni non stazionarie, come ad esempio nei casi di alternanza di abbondanza e carenza di substrato, in cui la crescita microbica non è bilanciata e lo stoccaggio del substrato carbonioso come polimero interno, diventa un importante meccanismo di selezione dei microrganismi presenti. Questi fanghi non possono essere però direttamente usati per la produzione di polimeri, a causa della troppo bassa concentrazione di substrato carbonioso in ingresso e del conseguente basso carico organico del processo, e devono essere opportunamente arricchiti in microrganismi con elevata capacità di stoccaggio. La produzione di PHA mediante l'uso di MMC sembra promettente perché non richiede il mantenimento di condizioni sterili e rende più facile l'uso di materie prime a basso costo, come gli effluenti di scarti agroindustriali [106], [109]. Questo processo offre il vantaggio di ridurre il carico inquinante e il flusso di acidi grassi e richiede fasi diverse strettamente interconnesse. Le proprietà fisiche e meccaniche del PHA finale, come già detto, dipendono anche dalla sua composizione monomerica, che a sua volta è influenzata dal tipo di acidi organici ottenuti durante la fermentazione acidogenica [21], [110]. Il flusso fermentato ricco di VFA viene immesso nelle due fasi successive finalizzate alla produzione e alla selezione di microrganismi che immagazzinano il PHA e al successivo accumulo del polimero. La selezione della coltura può essere raggiunta in condizioni di *feast and famine*. La ricerca oggi mira allo studio e all'ottimizzazione di un processo a più stadi per la produzione di PHA mediante MMC a partire da substrati organici di scarto. Le colture miste, che potenzialmente sono in grado di accumulare PHA, vengono tipicamente esposte in condizione cicliche di *feast and famine* in cui una fonte di carbonio organico prontamente biodegradabile è resa alternativamente abbondante e scarsa, cosicché popolazioni di specie diverse di microrganismi, che compongono la biomassa, devono adattarsi per sopravvivere e crescere con la mancanza ciclica di un substrato organico disponibile, *famine*, e competere nelle brevi occasioni in cui viene reso disponibile il substrato organico esterno, *feast*.

Quando i periodi di carenza dei nutrienti sono relativamente lunghi, i batteri diminuiscono l'espressione degli enzimi che sono importanti per la crescita cellulare. Se il substrato organico diventa improvvisamente disponibile, quelle popolazioni di specie di batteri che possono assimilare la fonte di carbonio più rapidamente, hanno un vantaggio competitivo rispetto a tutte le altre specie presenti. La rapida assimilazione del substrato organico esterno mediante stoccaggio intracellulare di PHA è una strategia competitiva comune a molte specie di batteri. Il rapporto tra la durata di *feast* e la fase *famine* è un parametro cruciale che influenza le prestazioni della fase di selezione; un basso rapporto garantisce la selezione nel MMC di microrganismi che sono maggiormente in grado di immagazzinare il PHA e il loro adattamento fisiologico verso la sintesi di PHA nella fase di festa [111]. In generale, se la fase di accumulo viene eseguita in condizioni di limitazione dei nutrienti, si raggiungerà un livello di saturazione del PHA. Al contrario, se la biomassa è continuamente esposta a nutrienti e substrati di carbonio, quindi in condizioni ricche di sostanze nutritive, aumenterà progressivamente la risposta di crescita, mentre la risposta allo stoccaggio diminuirà progressivamente e, di conseguenza, il contenuto massimo di PHA, sarà inferiore alla capacità massima di stoccaggio dei microrganismi [112]. Il PHA accumulato dal batterio, infine, può anche essere usato come substrato organico interno durante i periodi di carenza per l'energia e la crescita; quindi si arricchiscono nel tempo quelle popolazioni di specie di batteri che esprimono il fenotipo di conservazione del PHA [106], [113]. Accoppiato con i sistemi MMC, è stata prestata particolare attenzione all'uso di fonti di carbonio a costo zero, come le acque di scarico di cartiera [21], le acque di scarico dei conservifici di pomodoro [114], scarti del frantoio [115], melassa di canna da zucchero [116], scarti alimentari [117] e acque reflue [118]. La maggior parte di queste materie prime disponibili richiede una fase preliminare di fermentazione acidogenica per convertire il loro contenuto organico in acidi grassi volatili, i substrati più adatti per la produzione di PHA quando si utilizzano i processi MMC. Inoltre, la selezione MMC e gli stadi di accumulo di PHA vengono generalmente eseguiti in fasi separate, perché le condizioni ottimali sono diverse per ogni fase [108].

## 1.6 Scopo della tesi

Lo scopo del seguente lavoro di tesi è la produzione di poliidrossialcanoati partendo dalla frazione organica dei rifiuti solidi urbani. Quest'ultima viene utilizzata come substrato per una fermentazione acidogenica, con lo scopo di produrre acidi grassi volatili (VFA). I VFA vengono recuperati dal brodo della fermentazione attraverso la tecnica di stripping. Successivamente i VFA vengono utilizzati in sistemi di colture microbiche miste per la produzione di PHA.

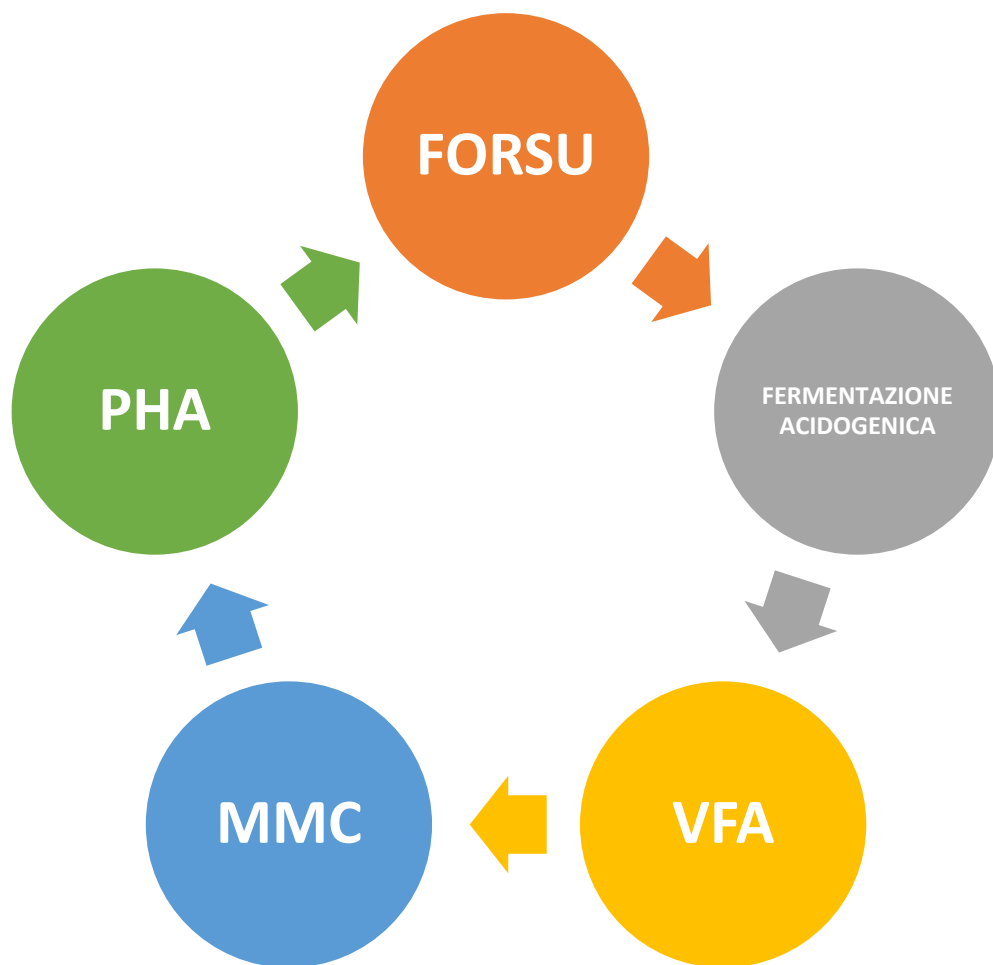


Figura 25: Scopo della tesi nell'ottica dell'economia circolare.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Caratterizzazione della FORSU

Come substrato della fermentazione acidogenica, per la produzione dei VFA, è stata utilizzata la frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU). Composta da: 250 g di *gnocchi di verdura*; 200 g di *bucce di patate, cipolla, carote*; 300 g di *farro condito*; 50 g di *carne di coniglio*.

La FORSU è stata pretrattata meccanicamente attraverso un frullatore ad immersione. Successivamente è stata congelata in porzioni semi sferiche di circa  $9 \pm 2$ g per una maggiore praticità di uso e standardizzazione dei test.



Figura 26: F.O.R.S.U.

#### 2.1.1 Liofilizzatore

Per la determinazione delle successive analisi (*analisi elementare, contenuto di ceneri, lipidi totali*) la FORSU è stata liofilizzata attraverso il liofilizzatore Alpha 1-2 1d Plus e successivamente macinata con un mortaio.



Figura 27: Liofilizzatore Alpha 1-2 1d Plus, FORSU liofilizzata e macinata.

#### 2.1.2 Analisi elementare

La composizione elementare della FORSU è stata determinata utilizzando un analizzatore elementare configurato per la determinazione CHNS-O (Thermo Scientific, Flash 2000, Organic Elemental Analyzer) attraverso una tecnica di combustione flash [119]. Le analisi hanno fornito i valori percentuali di C, H, N.

### 2.1.3 Analisi del contenuto di ceneri

Il contenuto in ceneri è stato determinato secondo il metodo standard (NREL / TP-510-42622). Sono stati posti circa 100 mg di FORSU in dei crogiuoli precedentemente tarati. I crogiuoli con la FORSU sono stati posti in muffola e portati ad una temperatura di 600°C per 5 ore. Trascorso un breve tempo di raffreddamento le ceneri sono state pesate. Il contenuto di ossigeno nei campioni viene infine calcolato per differenza:

$$O = 100 - \sum(CHNS + ceneri).$$

### 2.1.4 Proteine totali

Dall'analisi elementare, ottenuto il valore di N (%) è stato possibile risalire al contenuto di proteine totali attraverso il *Protein Factor* (6.25) [120]:

$$\text{Proteine totali (\%)} = N(\%) \times \text{Protein Factor (6.25)}$$

### 2.1.5 Lipidi totali

La determinazione del contenuto di lipidi totali della FORSU è stata eseguita secondo il metodo di Bligh et Dyer (1959) [121], ma apportando qualche modifica. Nel caso dei campioni liofilizzati, un'aliquota di 100 mg di FORSU è stata posta in *vials* di vetro Pyrex. Sono stati aggiunti ai campioni 3 ml di una miscela 2:1 composta rispettivamente da diclorometano e metanolo. Successivamente i campioni sono stati posti in un bagno termostatico con silicone, ad una temperatura di 60 °C per 120 minuti. Lasciando raffreddare per qualche minuto, i campioni hanno subito centrifugazione al fine di separare la frazione lipidica. Tale procedura è stata ripetuta due volte. Ogni volta è stato recuperato il surnatante, è stato seccato sotto flusso di azoto in *vials* di vetro per ricavare la tara dopo la seconda estrazione. La concentrazione dei lipidi è stata determinata in rapporto percentuale al peso secco del campione preso in analisi.

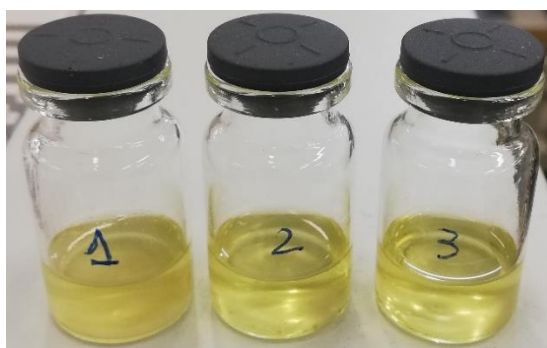


Figura 28: Lipidi totali (surnatante).



### 2.1.6 Carboidrati totali

È stato utilizzato il metodo di Myklestad (1972) per estrarre i polisaccaridi cellulari [122]. 10 mg di campione in forma liofilizzata sono stati posti all'interno di provette di vetro provviste di tappo e sono stati incubati con 1 ml di  $H_2SO_4$  (12 M) a 37 °C per 60 minuti. Successivamente ogni campione è stato portato ad un volume totale di 11 ml aggiungendo acqua distillata, gli stessi sono stati mescolati su vortex per 30 secondi e posti ad incubare in bagno termostatico a 100 °C per 120 minuti. I campioni sono stati posti in ghiaccio per 30 minuti e centrifugati a 3000x per 10 minuti a 4° C per separare il surnatante contenente i polisaccaridi estratti dai residui cellulari rimasti nel pellet. Sul surnatante sono state effettuate le determinazioni dei polisaccaridi. Il metodo si basa su una reazione colorimetrica data da fenolo e acido solforico, la cui intensità nella colorazione gialla viene messa in relazione lineare con la quantità di polisaccaridi attraverso analisi spettrofotometrica. Tale metodo è stato descritto da Dubois et., (1956) ed è stato applicato al surnatante [123]. Il procedimento ha previsto il prelievo di 0,1 ml di surnatante ponendolo all'interno di provette di vetro. Sono state effettuate tre repliche analitiche per ciascun campione. Alle provette sono stati aggiunti 1 ml di soluzione di fenolo al 2.5% e 2.5 ml di  $H_2SO_4$  al 96%. È seguita incubazione per 30 minuti al termine della quale è proseguita una misurazione spettrofotometrica. La lettura di assorbanza è stata eseguita alla lunghezza d'onda di 490 nm. La concentrazione dei polisaccaridi nel campione è stata ricavata sulla base di una curva di calibrazione precedentemente costruita con uno standard di glucosio.

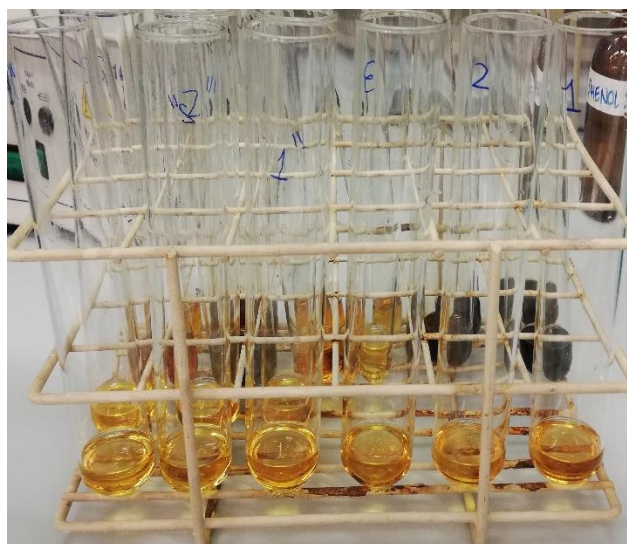


Figura 29: Determinazione dei carboidrati totali.

## 2.2 Strippaggio di soluzioni standard

Tutti i reagenti ed i solventi usati in questo lavoro sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, con un grado di purezza  $\geq 99\%$  e sono stati utilizzati senza ulteriori trattamenti o purificazioni.

In particolare:

Acido acetico, acido propionico, acido butirrico, idrossido di sodio, carbonato di calcio, ossido di calcio.

Le prove di strippaggio sono state fatte utilizzando due soluzioni.

Una soluzione standard di 30 g COD/L di VFA, chiamata *mix* formata da:

- 10 g /L di acido acetico;
- 10 g /L di acido propionico;
- 10 g /L di acido butirrico.

Una soluzione alcalina con lo scopo di recuperare i VFA, chiamata *trappola*. Sono state sperimentate diverse *trappole*:

- Soluzione di Idrossido di sodio (NaOH) 1 M;
- Slurry di Carbonato di Calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) 1 M;
- Slurry di Calcio Ossido (CaO) 1 M.

Le configurazioni sono le seguenti:

- 1) La prima, per lo strippaggio è formata da un *vial* (volume max 2 ml) contenente 0.2 ml di soluzione *trappola*, NaOH 1 M, immerso in un boccino (volume max 25 ml) contenente 0.5 ml di soluzione *mix* a 30 g/L di VFA. Una volta chiuso il *vial* con un tappo, il sistema è stato posto in stufa a 70° C.



Figura 30: Prima configurazione per lo strippaggio.

- 2) La seconda, è uguale alla precedente ad esclusione dell'aggiunta di una fettuccia di carta da filtro immersa nella trappola, con lo scopo di aumentare l'area superficiale, per la "cattura" dei VFA.

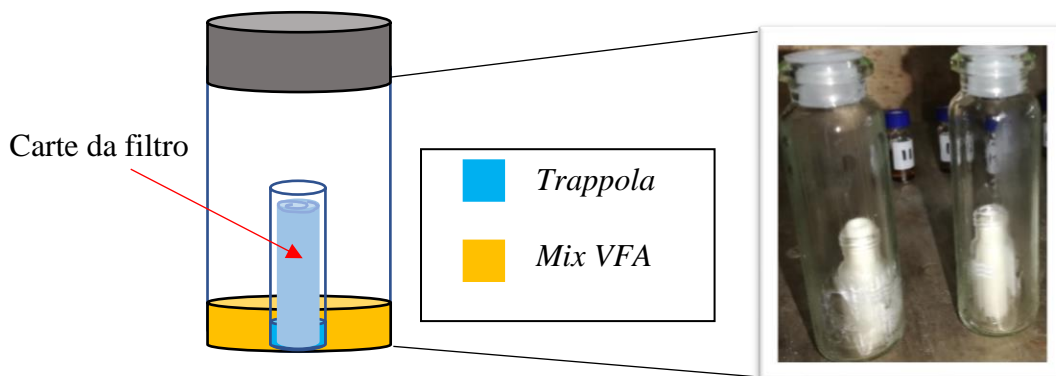


Figura 31: Seconda configurazione, con l'aggiunta di carta da filtro per aumentare l'area superficiale.

- 3) La terza. prevede l'utilizzo di due bottiglie in Pyrex (con volume max 100 ml). Nella prima bottiglia è stata inserita la soluzione *mix* (30 g/L di VFA); nella seconda, la soluzione *trappola* (NaOH 1M). Entrambe le bottiglie erano collegate con dei tubi in una pompa peristaltica con portata di 60 ml/min utilizzata per muovere l'aria all'interno delle due bottiglie. Queste sono state scaldate con un bagno termostatico ad olio di silicone ad una temperatura di 70°C, regolata da un termostato.

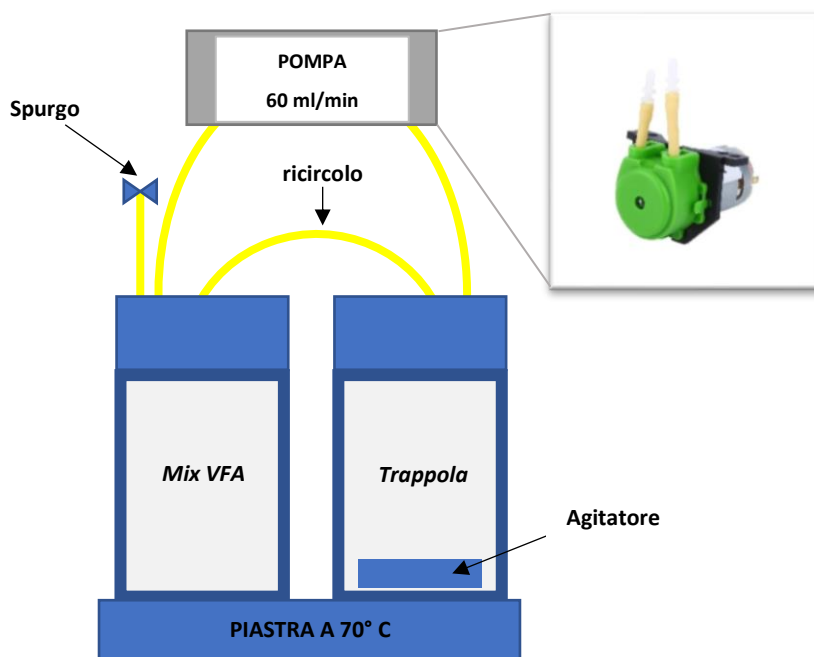
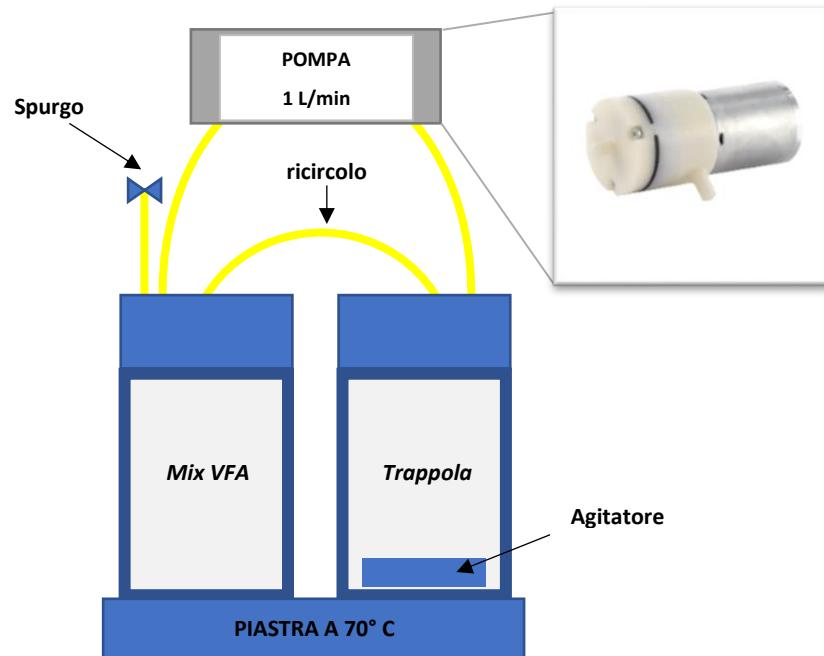


Figura 32: Terza configurazione, utilizzo di una pompa peristaltica.

- 4) La quarta, è uguale alla precedente ad eccezione della pompa. In questo caso non si tratta di una pompa peristaltica ma di una pompa ad aria con una portata di 1 L/min. Scaldate da un bagno termostatico ad olio di silicone ad una temperatura di 70°C, regolata da un termostato.



*Figura 33: Quarta configurazione, utilizzo di una pompa ad aria.*

### 2.3 Fermentazione acidogenica accoppiata a strippaggio

La fermentazione acidogenica accoppiata a strippaggio è stata eseguita secondo il metodo di Li et al. (2015) [72] con alcune modifiche. Sono stati costruiti dei reattori in batch (scala da laboratorio) attraverso bottiglie in Pyrex da 100ml.



Figura 34: Costruzione del sistema di fermentazione acidogenica accoppiata a strippaggio.

Il bioreattore è composto da FORSU e inoculo batterico di digestato solido proveniente dall'azienda Agrisfera Soc. Coop. Agr. p.a. Il sistema di recupero è formato da una soluzione di NaOH 2M.

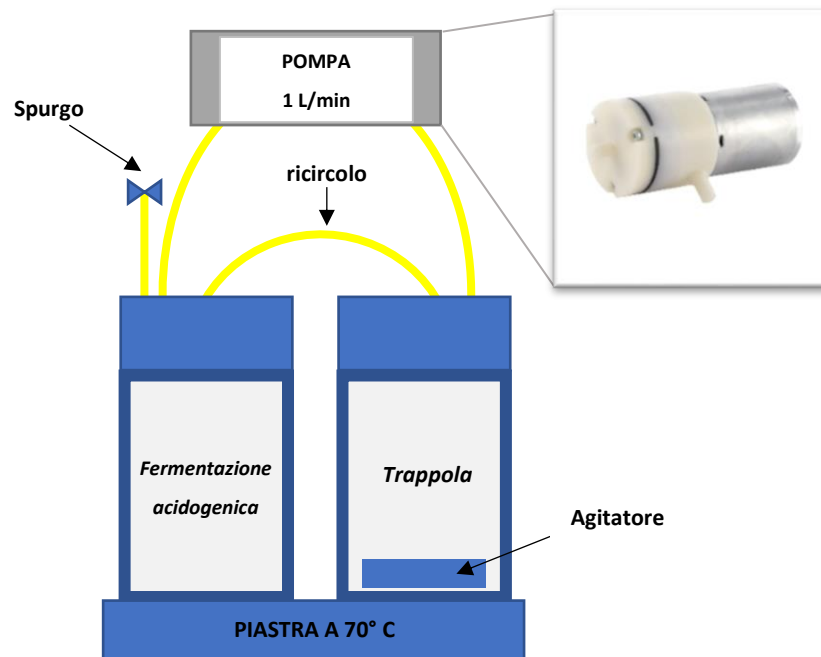
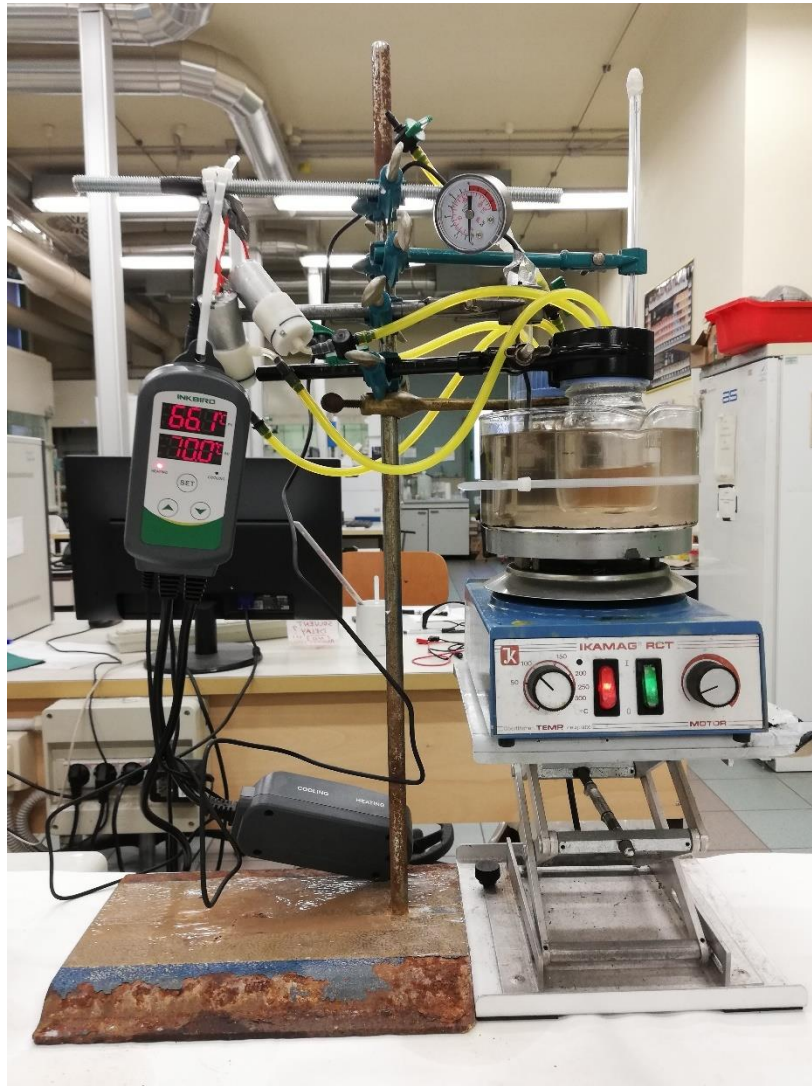


Figura 35: Schema del sistema di fermentazione e strippaggio.

Entrambi i reattori sono stati mantenuti in ipertermofilia (70°C) tramite un bagno termostatico ad olio di silicone, controllato da un apposito termostato. Prima di avviare il sistema, entrambi i reattori sono stati flussati con azoto per rimuovere l'ossigeno al loro interno. Una volta raggiunta la temperatura stabilita, è stato avviato lo stripping.



*Figura 36: Fermentazione acidogenica, accoppiata a stripping.*

### 2.3.1 Analisi dei VFA (GC-MS)

Attraverso un gascromatografo accoppiato a spettrometro di massa (GC-MS) sono stati quantificati gli acidi grassi volatili prodotti dalla fermentazione, secondo il metodo di M. Ghidotti, et al. (2018) [124].

Sono stati aggiunti 100 µl di campione in un *vial* da 2 ml; a questo sono stati addizionati 100 µl di KHSO<sub>4</sub> (solfato di potassio) saturo e 100 µl di standard interno (2-etilbutirrato ad una concentrazione di 1000 mg/L) disciolto in acqua distillata. Alla soluzione acquosa risultante sono stati aggiunti 1 ml di DMC (dimetilcarbonato) ottenendo un sistema bifasico che è stato agitato e lasciato separare in una fase acquosa e una fase organica. La fase organica è stata analizzata in GC-MS.

Il gascromatografo utilizzato è un Agilent HP 7820A con autocampionatore, collegato ad uno spettrometro di massa a quadrupolo Agilent HP 5977E con una temperatura dell'iniettore di 250°C.

Gli analiti sono stati separati con una colonna capillare DBFFAP (glicole polietilenico modificato con acido nitro tereftalico, 30 m, 0.25mm, i.d., 0.25µm di spessore), con elio come gas di trasporto (pressione costante, velocità lineare 33 cm/s a 200°C).

Gli spettri di massa sono stati registrati attraverso ionizzazione elettronica (70 eV) alla frequenza di 1 scan/s nel range 33-600 m/z. Programmata termica: da 50°C (per 5 min) a 250°C (per 12 min) a 10°C min<sup>-1</sup>.

L'identificazione dei composti è stata effettuata in base al loro tempo di eluizione dal cromatografo mentre l'analisi quantitativa è stata effettuata tramite il metodo dello standard interno (2-etilbutirrato):

$$C_x = \frac{y_x}{y_{SI}} * \frac{C_{SI}}{Fr}$$

Eq. 12: Quantificazione dei VFA.

C<sub>x</sub>: concentrazione incognita del VFA considerato;

Y<sub>x</sub>: segnale del VFA;

Y<sub>SI</sub>: segnale standard interno;

Fr: fattore di risposta;

C<sub>SI</sub>: Concentrazione dello standard interno.

I fattori di risposta degli acidi grassi volatili sono stati determinati tramite l'analisi di miscele standard e sono riportati in Tabella 2:

*Tabella 2: Fattori di risposta degli acidi grassi volatili utilizzati per l'analisi quantitativa.*

<b>VFA</b>	<b>Fattore di risposta</b>
<i>Acido acetico</i>	0.237
<i>Acido propionico</i>	0.297
<i>Acido isobutirrico</i>	0.485
<i>Acido Butirrico</i>	0.544
<i>Acido isovalerico</i>	0.625
<i>Acido valerico</i>	0.666
<i>Acido esanoico</i>	0.860



*Figura 37: GC-MS, Agilent HP 7820A con autocampionatore - Agilent HP 5977E.*



### 2.3.2 Domanda chimica di ossigeno (COD)

L'analisi del COD è stata effettuata seguendo il metodo ASTM D6238-98. Il campione è stato iniettato direttamente nello strumento utilizzando una siringa di precisione. All'interno dell'analizzatore la misura è stata effettuata attraverso l'ossidazione termica del campione con successiva rilevazione del consumo di ossigeno, utilizzando azoto (purezza 99.5) e aria come gas di trasporto. La fornace in ceramica lavora a 1200°C permettendo l'ossidazione di tutti i composti organici. L'analisi del COD, espresso in [gO/L], è stata determinata attraverso l'utilizzo di un detector e le aree del segnale sono state confrontate con quelle della curva di calibrazione, costruita usando concentrazioni note di glucosio.

L'analisi è molto rapida (circa 3 min) permettendo di effettuare almeno tre repliche per ogni campione.



Figura 38: Strumento utilizzato per l'analisi del COD.

## 2.4 ProBiotipo - Produzione di PHA

Per la produzione di PHA è stato utilizzato il ProBiotipo, un prototipo di B-PLAS DEMO, che si trova nei laboratori del CIRSA (Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali).

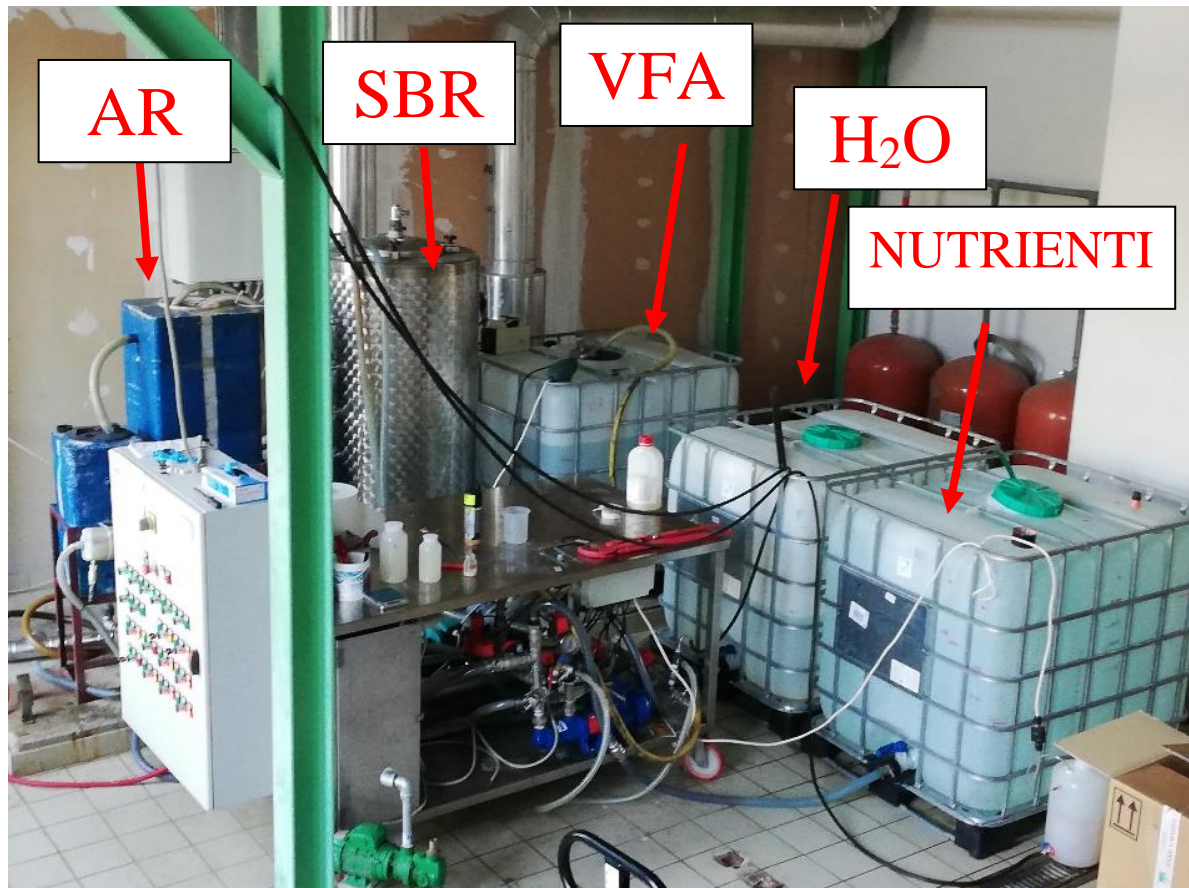


Figura 39: Probiotipo (presso Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali).

L'impianto per la produzione di PHA è composto da due Bioreattori (R1 e R2) e tre serbatoi IBC (Intermediate Bulk Container):

- SBR (Sequencing Batch Reactor) o R1, con un volume di 465 L, ha lo scopo di accrescere le colture microbiche miste;
- AR (Accumulation Reactor) o R2, con un volume di 140 L, sono stati attuati cicli di *feast and famine*, per l'accumulo di PHA da parte dei batteri;
- 1° IBC da 500 L di H<sub>2</sub>O di rete;
- 2° IBC da 500 L contenente i VFA;
- 3° IBC da 500 L contenente i nutrienti.

## NUTRIENTI

I nutrienti per la crescita delle comunità biotiche sono stati preparati secondo Villano et al. (2014) [111] ma con qualche modifica.

Tabella 3: Ricetta dei nutrienti per l'accrescimento di MMC.

	mg/l	g/l	g/gCOD	kg/m3
<b>COD</b>	<b>8500</b>	<b>8.50</b>	<b>1.00</b>	<b>10.00</b>
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	1205	1.20	0.14	1.42
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	334	0.33	0.04	0.39
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	259	0.26	0.03	0.30
<b>CaCl<sub>2</sub> x2 H<sub>2</sub>O</b>	50	0.05	0.01	0.06
<b>MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O</b>	100	0.10	0.01	0.12
<b>FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O</b>	2	0.00	0.00	0.0024
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	3	0.00	0.00	0.0035
<b>ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O</b>	0.1	0.00	0.00	0.0001
<b>MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O</b>	0.03	0.00	0.00	0.0000
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	0.3	0.00	0.00	0.0004
<b>CoCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O</b>	0.2	0.00	0.00	0.0002
<b>NiCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O</b>	0.02	0.00	0.00	0.0000
<b>CuCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O</b>	0.01	0.00	0.00	0.0000
<b>NaMoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</b>	0.03	0.00	0.00	0.0000

## VFA

I VFA sono stati preparati ad una concentrazione e composizione che simula i VFA prodotti dalla fermentazione acidogenica accoppiata a stripping, della frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU).

VFA	g COD/L
Acido Acetico	3.56
Acido Propionico	2.1
Acido Butirrico	4.5

## P&ID PROBIOTIPO

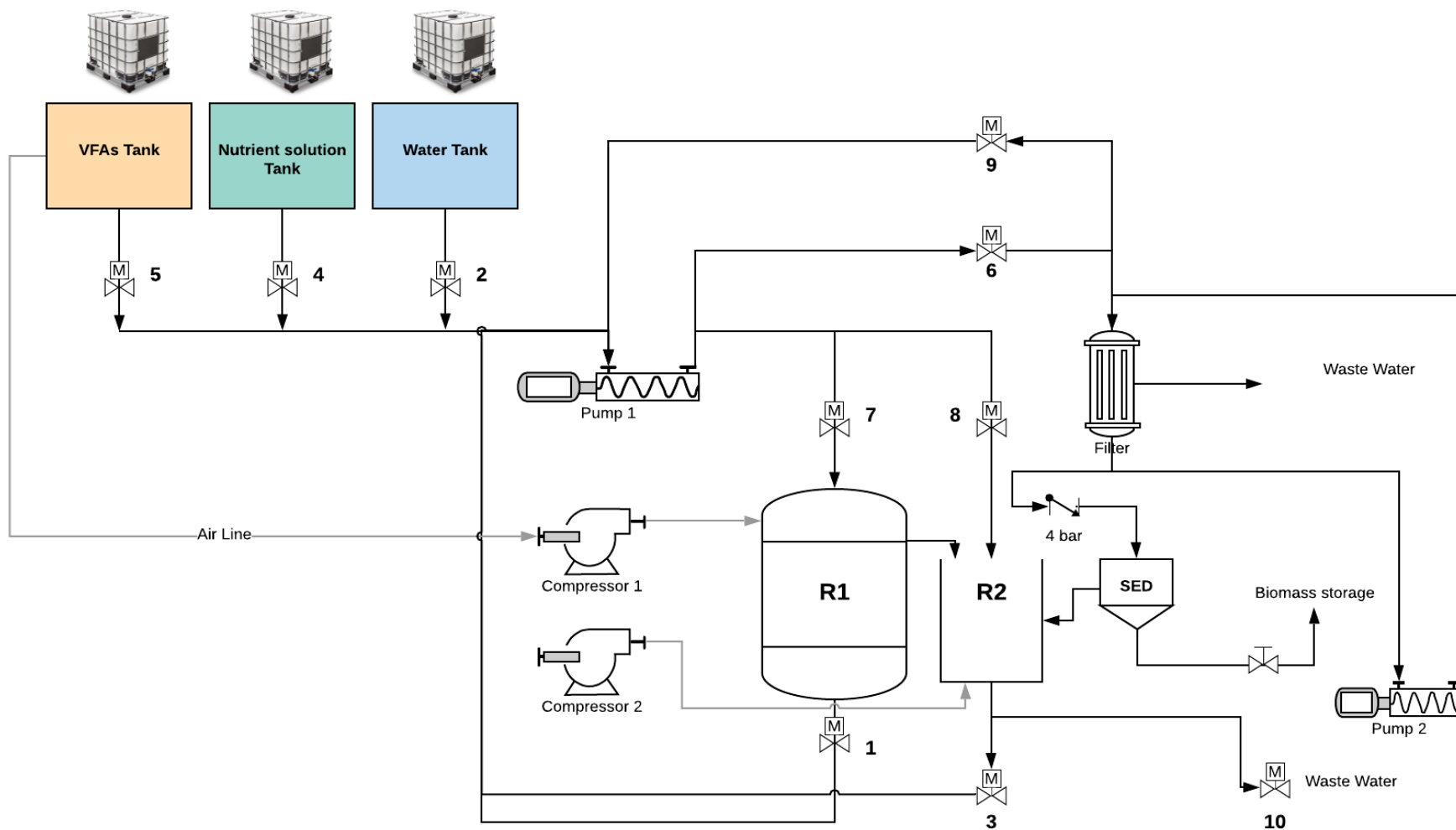


Figura 40: Schema d'impianto del ProBiotipo.

N	short name	description	action	durata stato (min)	durata stato (s)	tempo assoluto (h)	azionamento pompa 1	azionamento compressorio (R1)	azionamento compressore	azionamento ausiliario 2	comando valvola 1 apre (asp R1)	comando valvola 2 apre (asp. Da rete)	comando valvola 3 apre (asp da R2)	comando valvola 4 apre (asp da Nutr)	comando valvola 5 apre (asp da VFA)	comando valvola 6 apre (to filter)	comando valvola 7 apre (to R1)	comando valvola 8 apre (to R2)	comando valvola 9 apre (asp da filtro)	valvola 10
1	VFA dosing R1	dosing VFA to R1 (SBR)	Open: VFA suction, R1 supply	1.3	75	0.0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
2	Nutrients Feed	dosing N to R1 (SBR)	Nutrient suction, R1 supply	1.3	75	0.0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
3	Water Feed	dosing water to R1 (SBR) from R1 to R2 by overflow	Water suction, R1 supply	2	106	0.1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
4	Mix1	mix R1	R1 suction , R1 supply	51	3064	0.9	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
5	Mix1&2	mix R2 and R1	R2 suction , R1 supply	5	280	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
6	VFA dosing R2	dosing VFA to accumulation reactor	VFA dosing to R2 intermittent R2 suction and R2 supply.	1.0	66.0	1.0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
7	Mix2	mixi R2	intermittent R2 suction and R2 supply.	10	600	1.2	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
8	Mix1	mix R1	R1 suction , R1 supply intermittent R2 suction and R2 supply.	10	600	1.4	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
9	Mix2	mixi R2	intermittent R2 suction and R2 supply.	10	600	1.5	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
10	Mix1	mix R1	R1 suction , R1 supply intermittent R2 suction and R2 supply.	10	600	1.7	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
11	Mix2	mixi R2	intermittent R2 suction and R2 supply.	10	600	1.9	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
12	Mix1	mix R1	R1 suction , R1 supply	10	600	2.0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
13	opzionale		add flocculant+mixr2	1	60	2.0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
14	MIX R2	mix R2	R2 suction , R2 supply	3.92	235	2.1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
15	sedimentazione stop		all stopped	180.25	10815	5.1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
16	collection	Collection of bacteria	R2 suction and filter supply+recirculation	140.3	8415	7.4	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
17	OutSupernat	fast filtration	R2 suction and filter supply	0.8	45	7.5	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
18	Fclean	clean filter by backflush	Filter suction and R2 supply	0.2	10	7.5	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
19	svuotamento R2	prepare R2 for next cycle	svuotaMENTPO	18.0	1080	7.8	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
20	Standby with R1	prepare R2 for next cycle	SOLA AREAZIONE R1	5.0	300	7.8	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
21	Standby		R1 suction, R1 supply	5.0	300	7.9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
22	mix r R1	prepare R1 for next cycle	R1 suction, R1 supply	244.7	14680	12.0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Figura 41: PLC Programmable Logic Controller, ProBiotipo.

Il ProBiotipo è stato controllato da un PLC (Programmable Logic Controller) programmato da 22 cicli della durata totale di 12 h (Figura 41), riportanti in un pannello di controllo (Figura 42).



Figura 42: ProBiotipo, Pannello di controllo.

I cicli iniziali sono stati programmati con la somministrazione di 30 L di VFA e 30 L di nutrienti nell'SBR, attraverso un ciclo il bioreattore è stato portato a volume con acqua di rete proveniente dall'IBC. Una volta che i due bioreattori sono stati portati a volume, sono stati inseriti due cicli di mescolamento dell'SBR con l'AR. A questo punto, attraverso un ciclo, sono stati somministrati i VFA nell'AR, come substrato per le fasi di *Feast and Famine*. Una volta somministrati i VFA nell'AR sono stati previsti sei cicli di mescolamento per i due bioreattori. Nel PLC (Figura 41) è stata inserita una fase opzionale, l'aggiunta di flocculante nell'AR, altrimenti il bioreattore è stato fatto sedimentare naturalmente. Una volta sedimentata la biomassa, è stato previsto un ciclo di filtrazione con un filtro ceramico, il quale ha lo scopo di separare il solido e concentrarlo. A questo punto, la biomassa è stata recuperata e conservata in freezer all'interno di un barattolo di vetro per le successive analisi.

Tabella 4: Costanti di impianto.

<b>portata pompa 1</b>	30	L/min
<b>portata pompa 2</b>	0.10	L/min
<b>velocità sedimentazione</b>	0.0083	m/min
<b>portata filtrato solido 2 bar</b>	0.10	L/min
<b>portata concentrato 2 bar</b>	6	L/min
<b>altezza R2</b>	1.5	m
<b>volume Acqua a SBR</b>	50	L
<b>volume VFA in SBR</b>	30	L
<b>volume VFA in AR</b>	30	L
<b>volume Nutrienti</b>	30	L
<b>tempo raccolta biomassa</b>	120	min
<b>tempo VFA a AR</b>	60	min
<b>flocculante</b>	0	L
<b>volume filtro da pulire</b>	3	L
<b>volume SBR</b>	465	L
<b>volume AR</b>	140	L
<b>volume fango dopo la sedimentazione</b>	14	L
<b>volume AR dopo filtrazione</b>	126	L
<b>durata ciclo (check)</b>	12.0	h
<b>delay minimo</b>	0.1	min

### 2.4.1 Quantificazione del PHA Metapirolisi-GC-MS

La quantificazione del PHA è stata determinata sull'analisi in GC-MS dei prodotti di termolisi ottenuti dal trattamento termico chiamato “metapirolisi” dei batteri; questo metodo consente in maniera rapida e poco costosa di determinare la quantità di PHA presente nella biomassa [125]. Per la metapirolisi sono stati prelevati 5 mg di biomassa batterica liofilizzata e sono stati inseriti in un *vial* da 4 ml. I *vial* sono stati chiusi con dei tappi e posizionati sopra una piastra preriscaldata a 350°C per 30 min. Trascorsi 30 min e un breve tempo di raffreddamento ai *vial*, sono stati aggiunti 100 µl di standard interno, ovvero di 2-etilbutirrato ad una concentrazione di 5000 mg/L in acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN), e 4 ml di CH<sub>3</sub>CN. Da ogni fiala è stato prelevato 1 ml di soluzione, successivamente inserito in un *vial* da 2 ml al fine di determinare la quantità di PHA presente attraverso GC-MS.

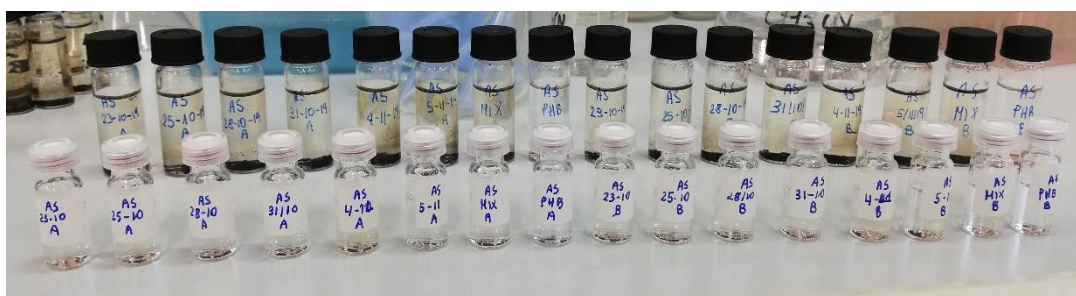


Figura 43: Vials pronti per l'analisi in GC-MS per la quantificazione del PHA.

La determinazione del PHA è stata effettuata in base alla percentuale di acido crotonico che è stata formata a seguito della metapirolisi:

$$Q_x = \frac{\left(\frac{Y_x}{Y_{SI}} - b\right) * Q_{SI}}{a}$$

Eq. 13: Quantificazione dell'acido crotonico.

$Q_x$ : Quantità di acido crotonico;

$Y_x$ : segnale acido crotonico;

$Y_{SI}$ : segnale standard interno (2-etilbutirrato 5000 mg/L);

$b$ : intercetta della retta di calibrazione;

$Q_{SI}$ : quantità di standard interno;

$a$ : coefficiente angolare della retta di calibrazione (fattore di risposta).



Una volta determinata la quantità di acido crotonico nel campione ( $Q_x$ ), è stato calcolato il rapporto con la quantità di acido crotonico prodotto dal PHB puro a seguito della metapirólisi. La determinazione del PHA è stata così effettuata.

Per fare ciò è stata creata una retta di calibrazione interna dell'acido crotonico.

2-ethylbutyrate				
Points	$\mu$	mg	ppm	Corr.Area
1	100	0.5	500	434054160
2	100	0.5	500	345951688
3	100	0.5	500	454065589
4	100	0.5	500	382713651
5	100	0.5	500	375138140
6	100	0.5	500	393327409
7	100	0.5	500	376619043

Crotonic Acid				
Points	$\mu$	mg	ppm	Corr.Area
1	10	0.05	50	84354498
2	20	0.1	100	78709202
3	30	0.15	150	105359127
4	50	0.25	250	127620071
5	100	0.5	500	202893639
6	200	1	1000	393070960
7	400	2	2000	610542795

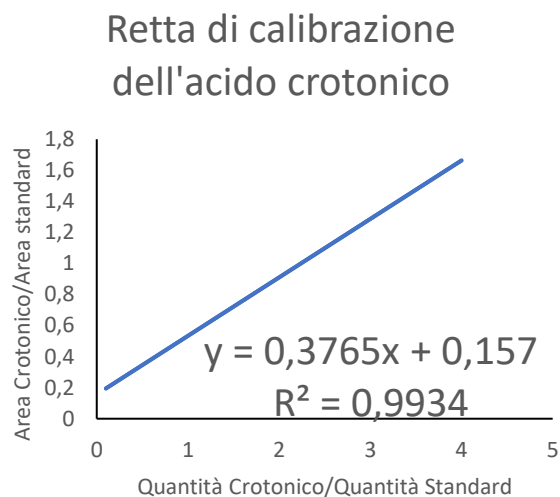


Figura 44: Retta di calibrazione per l'acido crotonico.

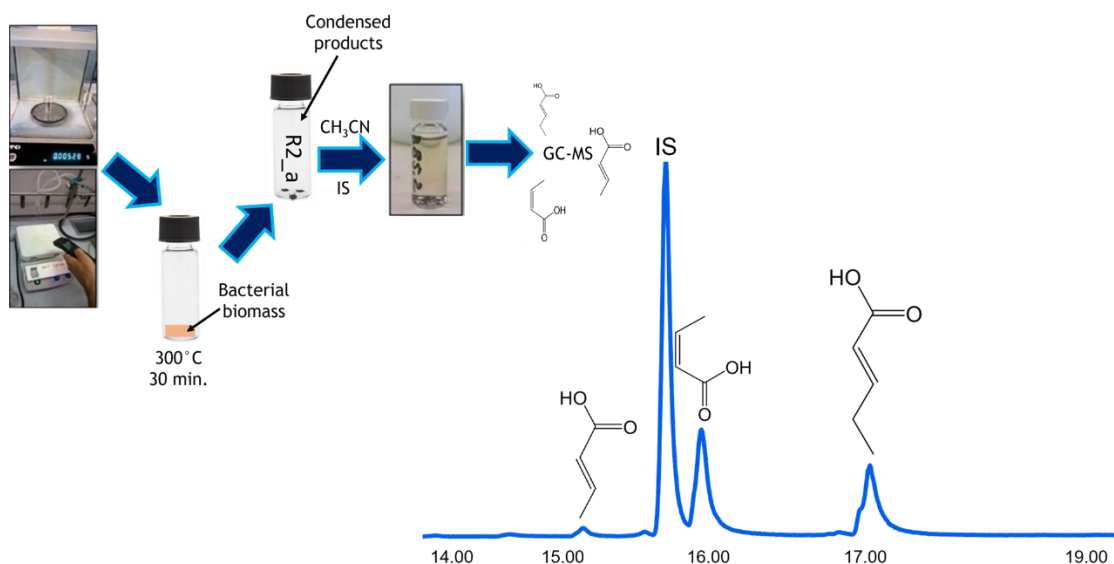


Figura 45: Metapirólisi-GC-MS [125].

### 2.4.2 Estrazione del PHA dalla biomassa batterica

Per l'estrazione del PHA sono stati pesati 100 mg di campione liofilizzato, posti dentro una provetta in Pyrex insieme a 4 ml di H<sub>2</sub>O e 500 mg di SDS (Sodio dodecil solfato) un tensioattivo utilizzato come componente per lisare le cellule durante l'estrazione del DNA [126]. Nella provetta è stato posto un agitatore magnetico che ha mescolato i tre componenti per 24 h.

Passate le 24 h è stato tolto l'agitatore magnetico e centrifugato il tutto a 3000x per 5 minuti. Con una pipetta Pasteur è stato prelevato il surnatante giallastro contenente l'SDS (primo lavaggio).

Per l'estrazione; sono stati aggiunti al solido rimasto in provetta, 3-4 ml di diclorometano (DMC) e un agitatore; successivamente la provetta è stata posta in un bagno termostatico ad olio con una T= 90°C per 1 ora. Passata l'ora e rimosso l'agitatore magnetico, il tutto è stato centrifugato a 3000x per 1 min. Il surnatante contenente PHA disciolto in DMC è stato versato in un boccino attraverso una Pasteur e successivamente flussato sotto azoto così da far evaporare il DMC ed ottenere il PHA.



Figura 46: Estrazione del PHA.

### 3 RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Caratterizzazione della FORSU

La FORSU è il materiale raccolto dalla raccolta differenziata dell'organico (altrimenti detto umido). Si tratta di residui di cibo o preparazioni alimentari e frazioni assimilabili, come carta per alimenti sporca di residui alimentari.

##### 3.1.1 Analisi elementare

Tabella 5: Analisi elementare della FORSU.

Analisi elementare		Contenuto (%) su peso secco						
Campione	Peso secco (mg)	N	C	H	S	O	Ceneri	C/N
FORSU_1	2.79	1.2	39.4	6.3	0	49.1	4.0	38.8
FORSU_2	2.71	1.2	40.3	6.5	0	48.0	4.0	39.4
FORSU_3	2.33	1.3	39.9	6.4	0	48.7	3.7	36.2
FORSU_4	2.1	1.3	42.8	6.8	0	45.5	3.7	38.3
FORSU_5	2.44	1.3	40.2	6.3	0	48.4	3.8	37.4
FORSU_6	2.42	1.2	41.1	6.5	0	47.4	3.8	38.7
<b>Media</b>	<b>2.47</b>	<b>1.24</b>	<b>40.62</b>	<b>6.45</b>	-	<b>47.85</b>	<b>3.8</b>	<b>38.1</b>
<b>Dev. Std</b>	0.25	0.05	1.21	0.18	-	1.32	0.1	1.2
<b>RSD %</b>	10%	4%	3%	3%	-	3%	4%	3%

In Tabella 5 sono stati riportati i valori percentuali dell'analisi elementare, l'elemento più abbondante è stato il carbonio 40.6 %, seguito dall'ossigeno 47.8%, l'idrogeno con il 6.4%, le ceneri con il 3.8 % ed infine l'azoto con circa l'1.2 %.

##### 3.1.2 Carboidrati, lipidi e proteine totali

Tabella 6: Contenuto totale su peso secco di lipidi, carboidrati e proteine.

Campione	Lipidi (%)	Carboidrati (%)	Proteine (%)
<b>Forsu 1</b>	32.6	53.3	7.4
<b>Forsu 2</b>	34.7	54.3	7.5
<b>Forsu 3</b>	31.3	53.4	8.0
<b>Media</b>	<b>32.9</b>	<b>53.7</b>	<b>7.6</b>
<b>dev. Std</b>	0.02	0.01	0.36
<b>RSD%</b>	6%	1%	5%

In Tabella 6 sono stati riportati i risultati del contenuto totale (%) su peso secco della FORSU di lipidi, carboidrati e proteine. I valori sono stati determinati su tre repliche. Dalle analisi, la composizione maggiore è stata dei carboidrati con il 53.7 %, i lipidi 32.9 % ed infine le proteine con il 7.6 % su peso secco.

### 3.1.3 Domanda chimica di ossigeno (COD)

Di seguito sono stati riportati i valori della domanda chimica di ossigeno, totale e solubile:

Il COD<sub>tot</sub> medio risultante è stato di 223.27 gCODt/L mentre il COD<sub>sol</sub> di 115.35 gCODs/L.

Tabella 7: Domanda chimica di ossigeno (COD), solubile e totale.

COD	g CODs/L	g CODt/L
FORSU 1	112.6	223.6
FORSU 2	116.8	221.8
FORSU 3	115.6	226.8
FORSU 4	114.7	222.7
FORSU 5	115.2	220.1
FORSU 6	117.2	224.6
<b>Media</b>	<b>115.35</b>	<b>223.27</b>
<b>dev. Std</b>	1.65	2.32
<b>RSD%</b>	1%	1%

Tabella 8: Altri riferimenti della caratterizzazione della FORSU.

g/L		% su peso secco									
CODt	CODs	Carboidrati	Lipidi	Proteine	C	H	N	O	S	C/N	Rif.
<u>223.27</u>	<u>115.35</u>	<u>53.7</u>	<u>32.9</u>	<u>7.6</u>	<u>40.62</u>	<u>6.45</u>	<u>1.24</u>	<u>47.85</u>	<u>0</u>	<u>38.1</u>	<u>questo studio</u>
n.d.	136.59	35.47	24.11	14.42	48.35	n.d.	0.76	n.d.	n.d.	63.62	[34]
n.d.	n.d.	33.28	28.85	14.71	30.25	n.d.	2.63	n.d.	n.d.	11.50	[127]
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	51.4	6.1	3.5	38.9	0.1	17.13	[128]
166.18	53.18	69.3	10.6	16.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	49.9	[26]
368.4	n.d.	59	8	33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	[9]

In Tabella 8 sono stati riportati altri studi della caratterizzazione della FORSU presenti in letteratura; si evince che la FORSU è un materiale molto eterogeneo.

### 3.2 Strippaggio di soluzioni standard

I risultati sono stati riportati in valori di percentuale di recupero di VFA nella trappola, partendo dalla soluzione standard di VFA (*MIX* 30g/L):

#### 3.2.1 Prima configurazione



Figura 47: Prima configurazione: 0.2 ml di soluzione trappola (NaOH 1 M) e 0.5 ml di soluzione Mix VFA 30 g/L.

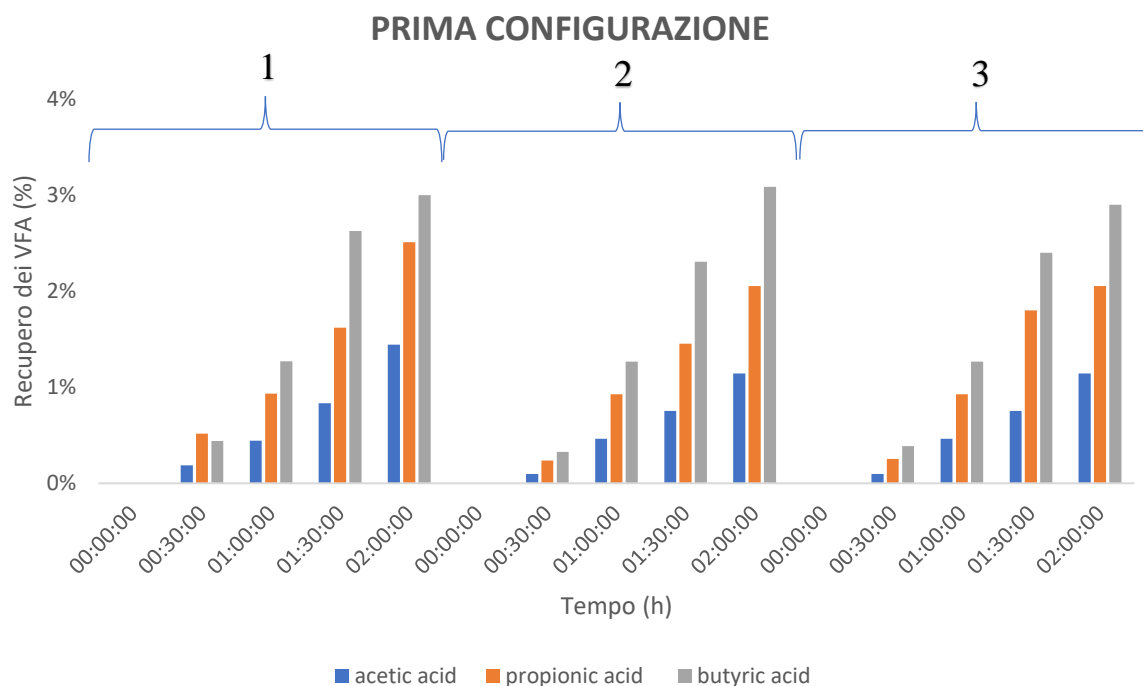


Figura 48: Risultati dello strippaggio nella prima configurazione; tre repliche 1, 2 e 3.

Il grafico mostra il recupero (%) della soluzione *MIX* dopo 2 ore di strippaggio. Le tre repliche non hanno riportato differenze significative tra loro; la prima cosa che si può notare, è che lo strippaggio attraverso questa configurazione ha favorito la “cattura” dell’acido butirrico, il più volatile, restituendo la percentuale di recupero più alta in tutti gli intervalli di tempo fino ad un

massimo del 3% dopo 2 ore di strippaggio. La prima mezz'ora di strippaggio (Figura 48, 1) ha recuperato l'acido propionico in percentuale maggiore, con un valore che resta comunque sotto l'1%. L'acido acetico, a differenza del butirrico è stato recuperato in percentuale minore, al di sotto del 2 % (Figura 48, 1) dopo 2 ore di strippaggio.

### 3.2.2 Seconda configurazione

In questo caso la *trappola* contenente 0.2 ml di NaOH 1 M e carta da filtro, è stata analizzata dopo 1 ora e dopo 2 ore dall'avvio dello strippaggio.

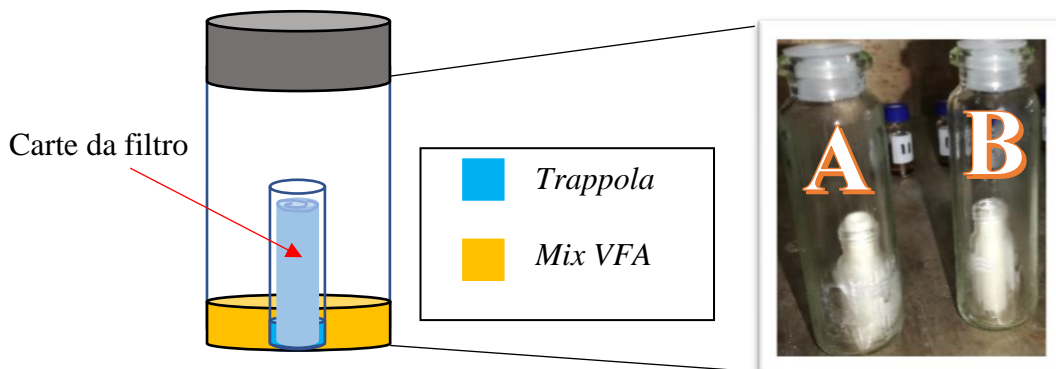


Figura 49: Seconda configurazione: 0.2 ml di soluzione trappola (NaOH 1 M) e 0.5 ml di soluzione Mix VFA 30 g/L

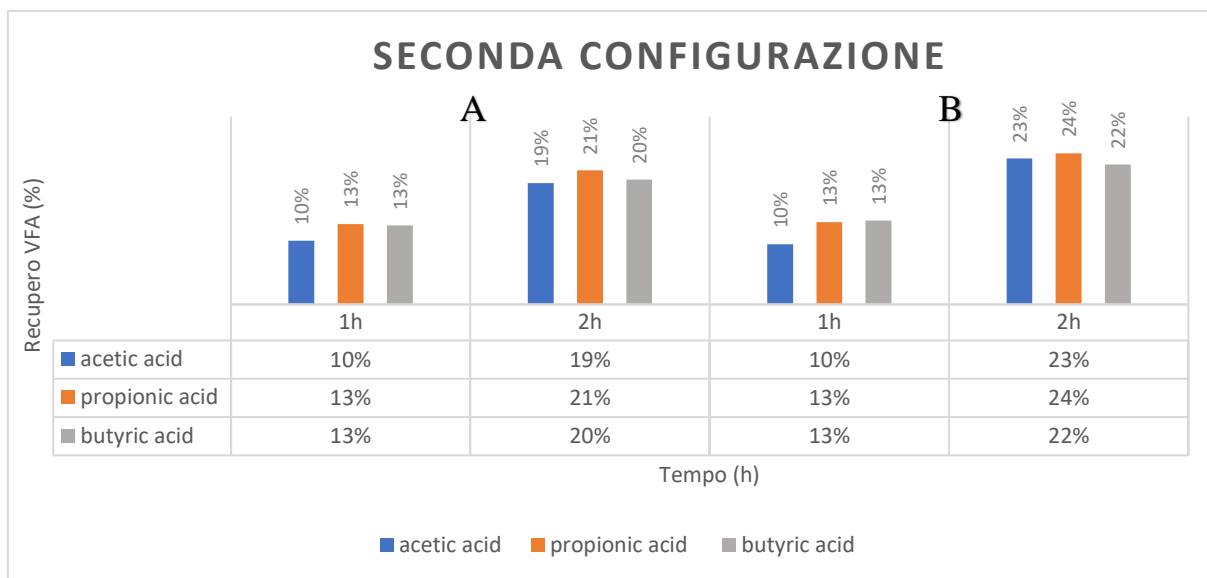


Figura 50: Seconda configurazione di strippaggio con carta da filtro, due repliche A) e B).

Dal grafico sopra riportato si evince che, rispetto alla prima configurazione le rese sono state nettamente superiori. L'inserimento di una carta da filtro imbevuta di soluzione trappola, con lo scopo di aumentare l'area superficiale di strippaggio, ha avuto successo (Figura 50). Dopo 1 ora di strippaggio, la trappola ha recuperato il:

- 10 % di acido acetico;
- 13 % di acido propionico;
- 13 % di acido butirrico.

Dopo 2 ore:

- 21%  $\pm$  2% di acido acetico;
- 22.5%  $\pm$  1.5% di acido propionico;
- 21%  $\pm$  1% di acido butirrico.

In Tabella 9 è stato riportato un confronto tra la prima e la seconda configurazione, si può notare che dopo 1 ora, le rese sono state di circa 20 volte alte per l'acido acetico, 14 volte per l'acido propionico e 10 volte per l'acido butirrico nella seconda configurazione.

Tabella 9: Confronto tra la prima e la seconda configurazione, valori mediati.

Tempo	Prima configurazione		Seconda configurazione	
	1 h	2 h	1 h	2 h
Acido Acetico	0.5 %	1.2 %	10 %	21 %
Acido Propionico	0.9 %	2.2 %	13 %	22.5 %
Acido Butirrico	1.3 %	3.3 %	13 %	21 %

Rispetto alla prima configurazione, i risultati che ha portato la seconda, sono stati interessanti e per questo è stato deciso effettuare altre due repliche (Figura 51, C e D), questa volta analizzando la trappola ogni mezz'ora fino a 3 ore e 30 minuti.

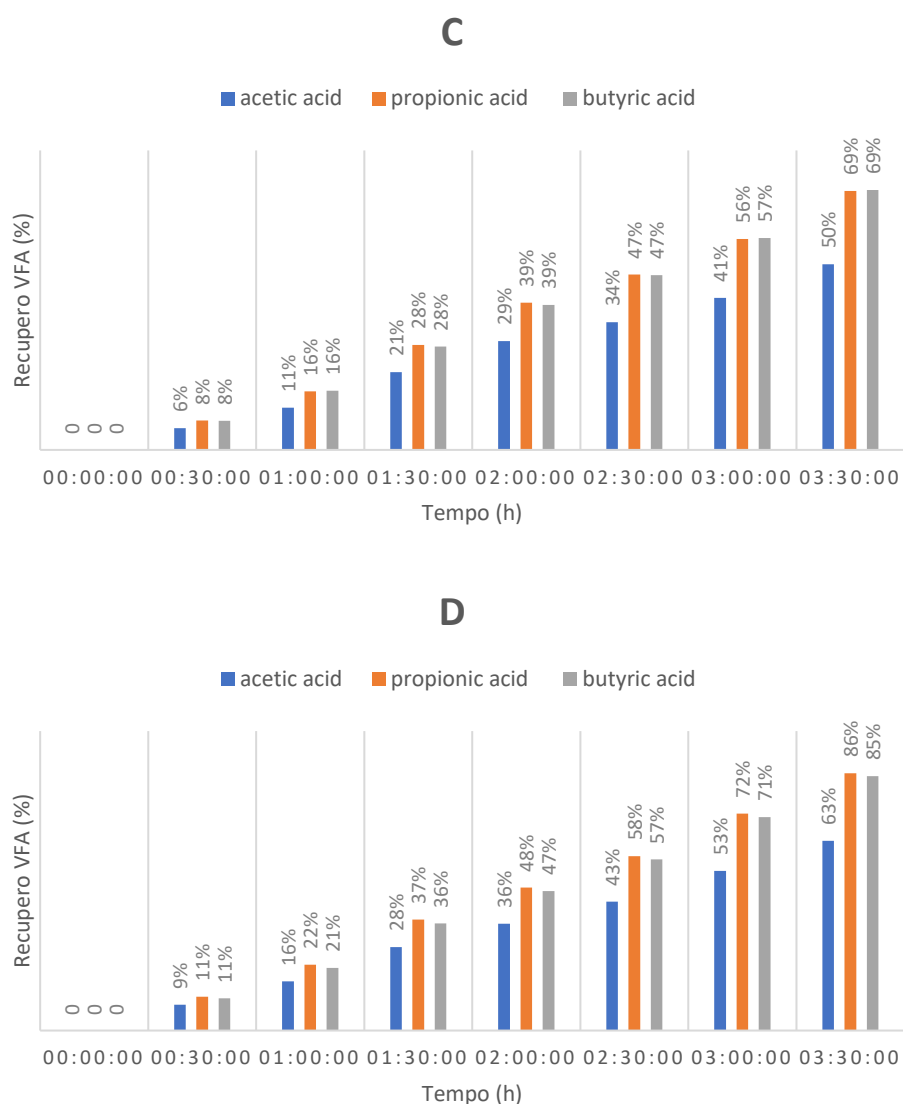


Figura 51: Seconda configurazione di strippaggio (C e D) con carta da filtro, la trappola cambiata ogni mezz'ora, le percentuali sono cumulate in 3 h e 30 min dall'avvio dello strippaggio.

Le due repliche C e D (Figura 51) hanno riportato differenze di cattura significative tra loro, riportate in dettaglio nella Tabella 10. La sostituzione della trappola (contenente un nuovo filtro di carta) ad intervalli di 30 minuti, ha portato con sé delle differenze significative nelle rese di “cattura”, probabilmente dovute alla variazione dell’area superficiale dei diversi filtri di carta.



Tabella 10: Analisi statistica tra le repliche C e D.

Tempo	Acido Acetico			Acido Propionico			Acido Butirrico		
	media	dev.std.	RSD (%)	media	dev.std.	RSD (%)	media	dev.std.	RSD (%)
00:00:00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
00:30:00	7%	0.0195	27%	9.6%	0.0239	25%	9.3%	0.0210	23%
01:00:00	14%	0.0368	27%	18.8%	0.0452	24%	18.3%	0.0363	20%
01:30:00	24%	0.0504	21%	32.6%	0.0637	20%	31.7%	0.0580	18%
02:00:00	32%	0.0465	14%	43.5%	0.0597	14%	42.7%	0.0555	13%
02:30:00	39%	0.0629	16%	52.5%	0.0806	15%	51.9%	0.0736	14%
03:00:00	47%	0.0903	19%	64.4%	0.1133	18%	64.0%	0.1038	16%
03:30:00	56%	0.0976	17%	77.6%	0.1188	15%	77.2%	0.1098	14%

Si può notare in Tabella 10 come l'RSD (%) varia nei diversi intervalli di tempo, seguendo lo stesso andamento per tutti e tre gli acidi grassi volatili. Dopo 3 ore e 30 minuti dallo strippaggio, l'acido butirrico è stato recuperato al 69 % in C ed all'85 % in D (Figura 51). Questa variabilità di recupero è stata procurata dalla differenza dell'area superficiale nel creare le diverse trappole con la carta da filtro. Di seguito è stato riportato l'andamento dell'RSD (%) delle rese di cattura dei tre VFA durante l'intero strippaggio. L'andamento dell'RSD (%) è stato lo stesso per tutti e tre i VFA, questo sta a significare che le differenze (%) di cattura sono determinate dalla variabilità della carta da filtro.

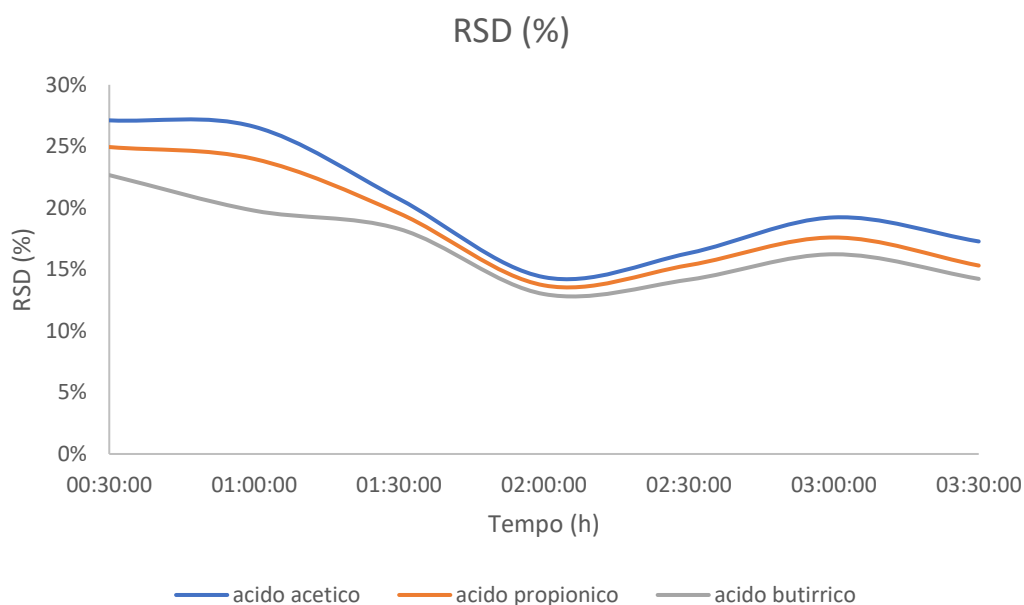


Figura 52: Andamenti dell'RSD (%) delle rese nel tempo nelle repliche C e D.

### 3.2.3 Terza configurazione

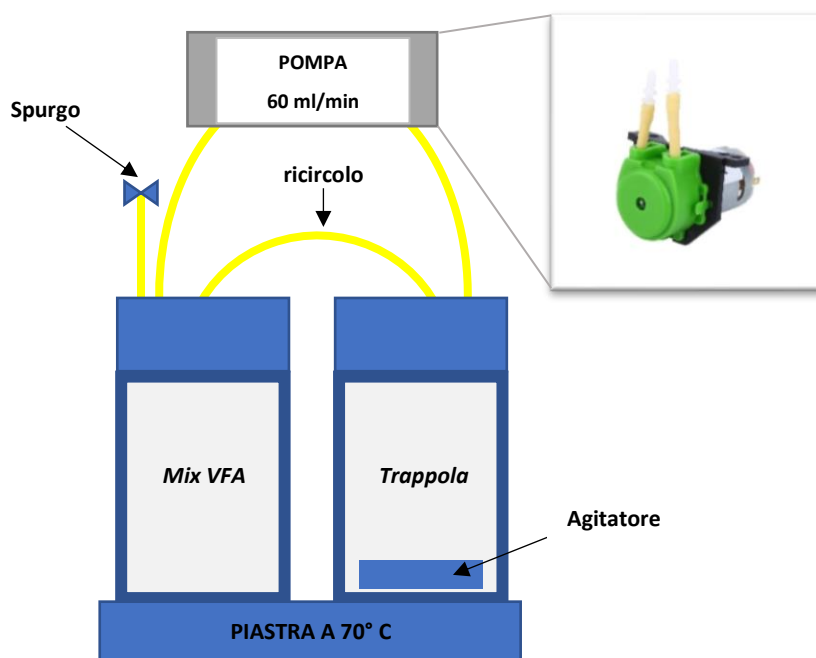


Figura 53: Terza configurazione, strippaggio con pompa peristaltica (60ml/min) per muovere lo spazio di testa.

La terza configurazione ha riportato risultati che seguono l'ordine di grandezza della prima (Figura 48). Dopo 1 ora di strippaggio, le percentuali di recupero sono state intorno all'1%, questo probabilmente è stato dovuto alla bassa portata della pompa.

## TERZA CONFIGURAZIONE

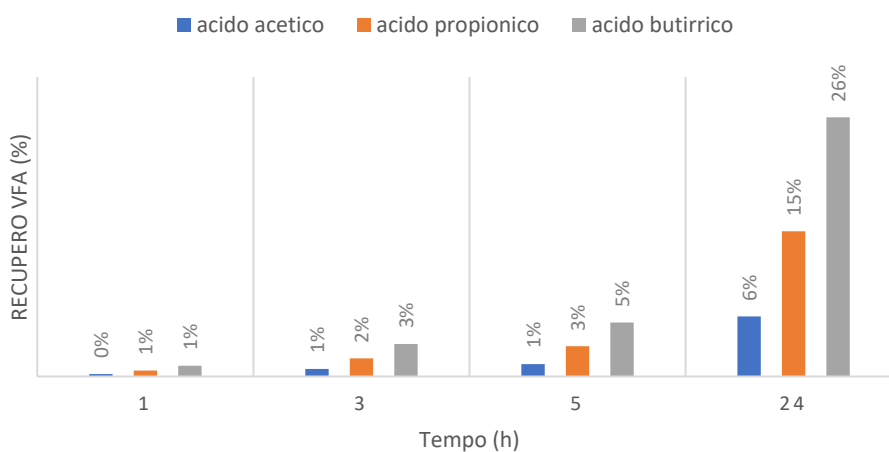


Figura 54: Terza configurazione, con pompa da 60 ml/min.

Dopo 24 ore, le percentuali il test di strippaggio ha recuperato il 26 % di acido butirrico, il 15% di acido propionico ed il 6 % di acido acetico.

### 3.2.4 Quarta configurazione

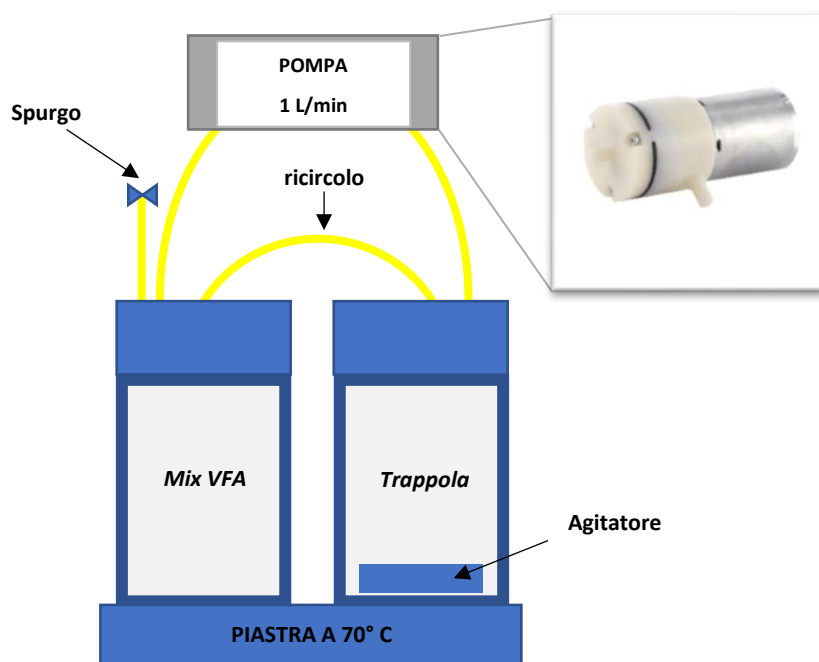


Figura 55: Quarta configurazione con pompa ad aria (portata 1 L/min)

L'utilizzo di una pompa ad aria per muovere lo spazio di testa dei due barattoli in Pyrex, con una portata significativamente maggiore rispetto alla configurazione precedente (60ml/min), ha portato ai seguenti risultati:

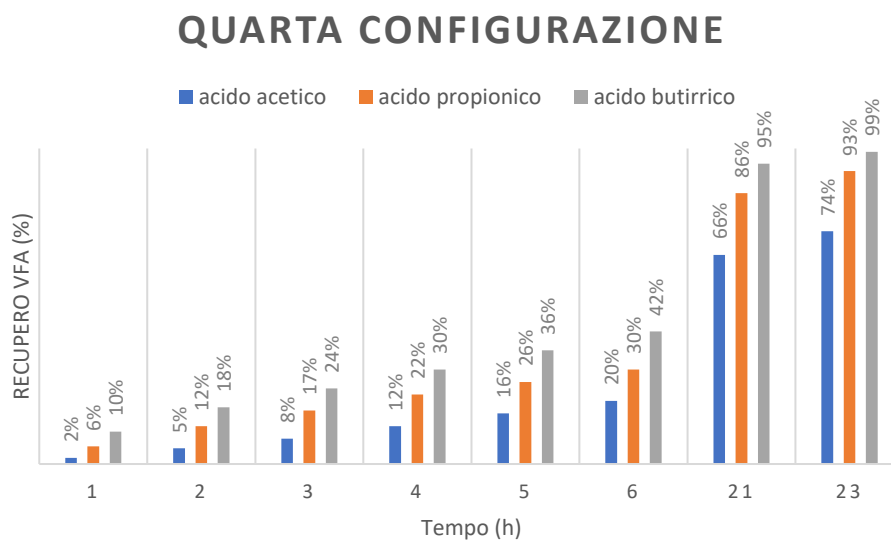
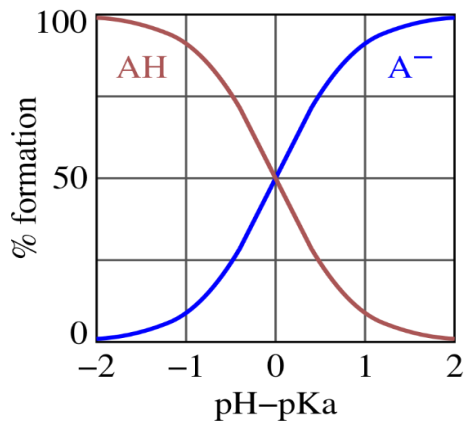


Figura 56: Quarta configurazione, utilizzo di una pompa ad aria con portata da 1 L/min.

L'acido butirrico ha raggiunto una percentuale di recupero pari al 99%, l'acido propionico 93% e l'acido acetico il 74% dopo 23 ore.

Successivamente, è stato svolto un secondo test con la stessa configurazione, in cui la *soluzione MIX* (30 g/L di VFA) è stata precedentemente titolata con NaOH e portata ad un pH di circa 5.6, con lo scopo di simulare il pH di una fermentazione. A partire dalla teoria dei sistemi tampone, la percentuale di acido volatile in forma neutra (in questo caso acido acetico) è stata ricavata dalla seguente equazione (con annessa figura):

$$\frac{AcOH}{AcO^- + AcOH} = 1/(1 + 10^{(pKa-pH)})$$



Con un pH di 5.6 ed una pKa (calcolata a temperatura ipertermofila) i VFA catturabili pari al 14%.

### TEST a pH 5,6

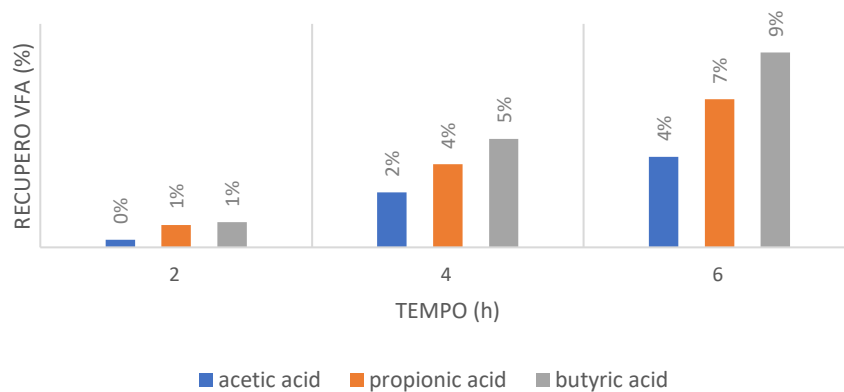


Figura 57: Quarta configurazione di strippaggio effettuata con una soluzione MIX a pH 5.6

In questo caso lo strippaggio a pH 5.6 ha portato rese significativamente più basse. Dopo 6 ore, la percentuale di recupero dell'acido butirrico è stata più bassa di circa 5 volte. Tale calo di resa è compatibile con l'effetto derivante dalla parziale dissociazione dell'acido carbossilico, derivante dall'equilibrio acido base sopra riportato. Risulta quindi possibile estrapolare le velocità di strippaggio mostrate dai sistemi modello sulla base del semplice equilibrio acido base.

### 3.3 Fermentazione acidogenica accoppiata a strippaggio

Sono state effettuate diverse prove di fermentazione accoppiate a strippaggio. In base ai test di strippaggio con le soluzioni standard, è stato scelto il modello della quarta configurazione (pompa da 1L/min) come strutturalmente il più idoneo.



Figura 58: Fermentazione accoppiata a strippaggio.

#### 3.3.1 Primo test

La prima prova ha portato i seguenti risultati:

Tabella 11: Prima fermentazione accoppiata a strippaggio, rese globali.

<b>Fermentazione acidogenica accoppiata a strippaggio</b>		
<b>Primo Test</b>	<b>gCOD/L</b>	<b>Resa (%)</b>
CODt gCOD/L iniziale del fermentatore	50	-
Produzione totale di VFA (acidogenesi)	32.42	65
VFA recuperati con lo strippaggio	6.32	19
<b>Resa globale VFA prodotti nel sistema accoppiato</b>	<b>6.32</b>	<b>13</b>

Dalla Tabella 11 si può notare che la produzione di totale di VFA nel processo fermentativo accoppiato a strippaggio è stata pari a 32.42 gCOD/L rispetto ad un COD iniziale di 50 gCOD/L, con una resa del 65 % di conversione della FORSU in VFA. Dei 32.42 gCOD/L di VFA prodotti ben 6.32 sono stati recuperati nella trappola, con una resa dello strippaggio pari al 19.5 %.

Di seguito in Figura 59 si può notare l'andamento della composizione e concentrazione dei VFA nel fermentatore. Al primo giorno la produzione totale di VFA è stata circa 9 gCOD/L di cui 5.6 gCOD/L di acido acetico. Nel quarto giorno la concentrazione totale è stata di 26 gCOD/L di cui: 17 gCOD/L di acido acetico, 6.6 gCOD/L di acido butirrico che rappresentano i principali acidi prodotti insieme al propionico con una concentrazione di 1.6 gCOD/L.

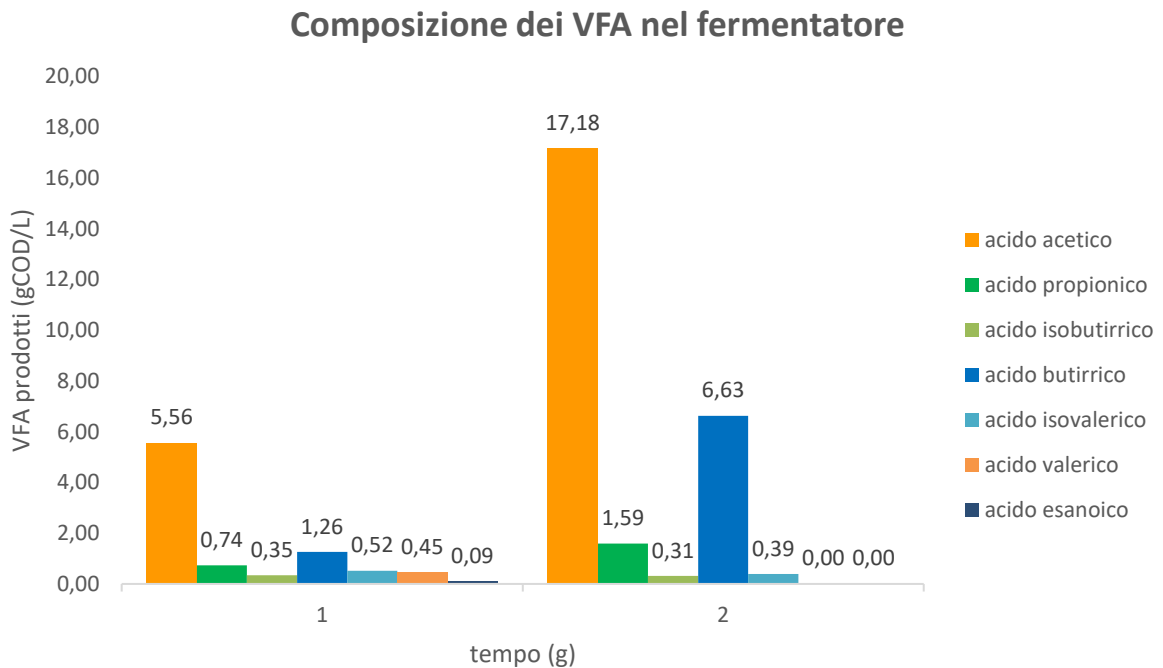


Figura 59: Composizione dei VFA nel fermentatore.

In Tabella 12, si può notare che la fermentazione acidogenica ha acidificato il substrato presente nel fermentatore, variando il pH da 8.2 nel primo giorno a 5.3 nel quarto.

Tabella 12: Andamento del pH nel fermentatore.

<b>Andamento del pH nel fermentatore</b>		
	Giorno 1	Giorno 4
pH	8.2	5.3

In Figura 60: Composizione dei VFA nella trappola. Si nota che il recupero tramite lo strippaggio è stato pari a 6.32 gCOD/L. La composizione maggiore è stata restituita dall'acido acetico pari al 41 % con 2.62 gCOD/L e dall'acido butirrico 40 % con 2.50 gCOD/L. Tale concentrazione corrisponde ad un recupero del 19 % dei VFA totali prodotti.

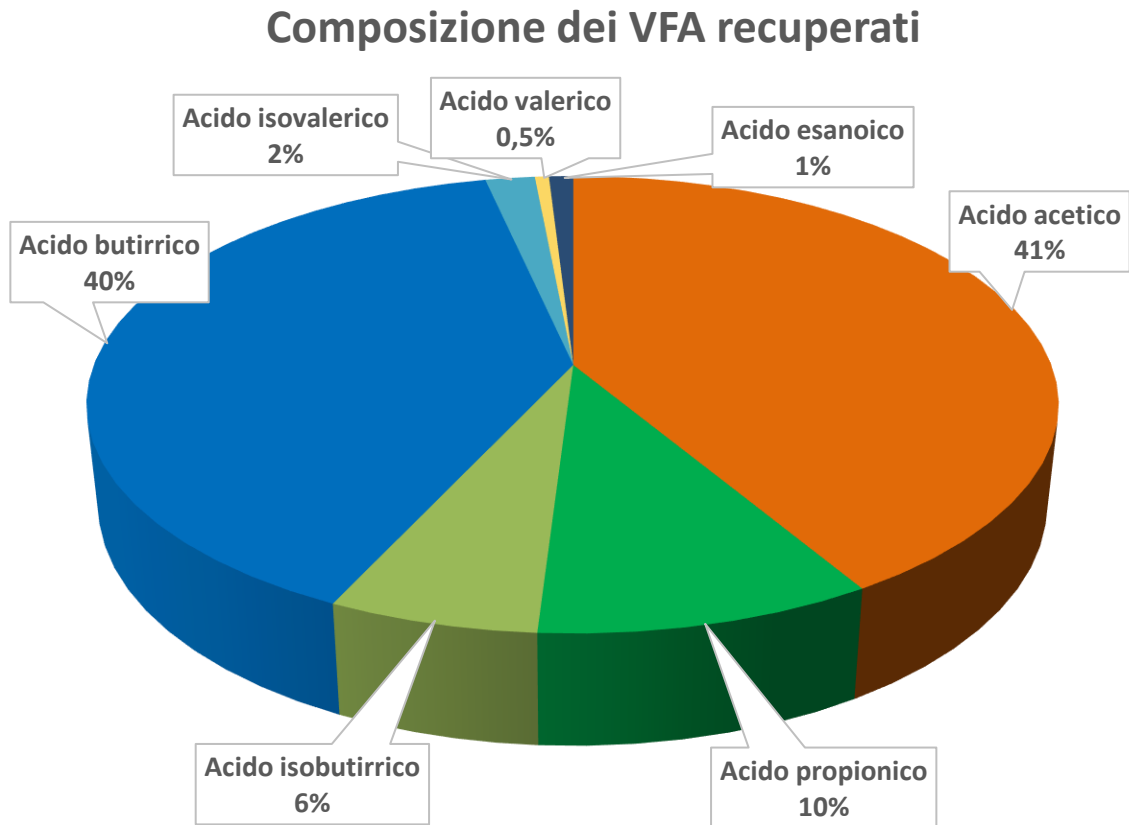


Figura 60: Composizione dei VFA nella trappola.

Complessivamente il sistema accoppiato: fermentazione acidogenica e strippaggio ha prodotto il 13% di VFA in 4 giorni, il restante 52% (26.10 g COD/L) è rimasto nel fermentatore.

## Acidogenesi e strippaggio - Primo test

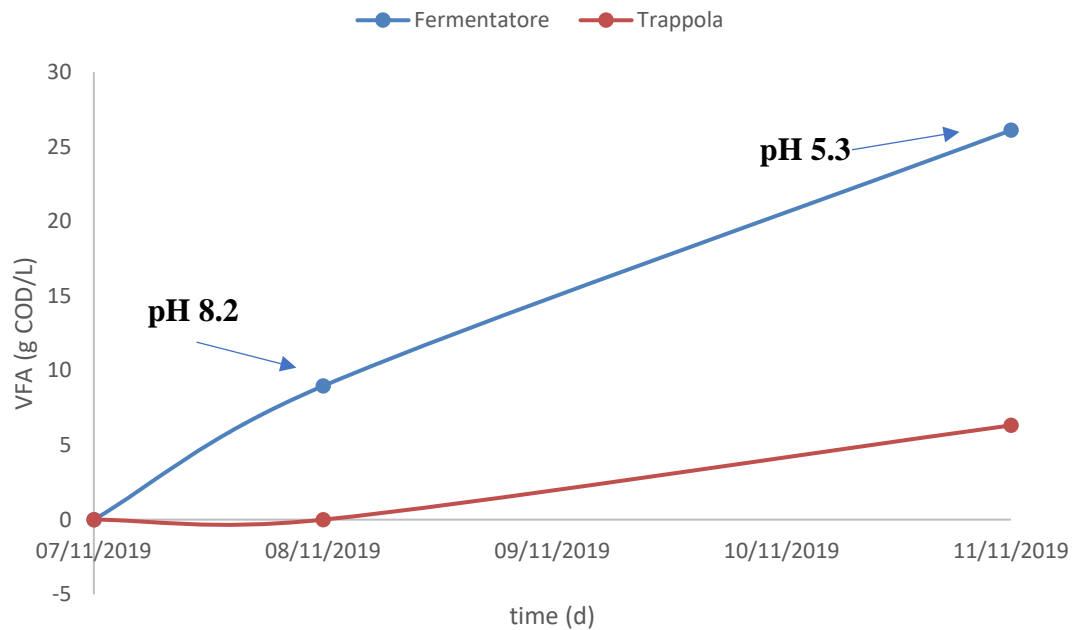
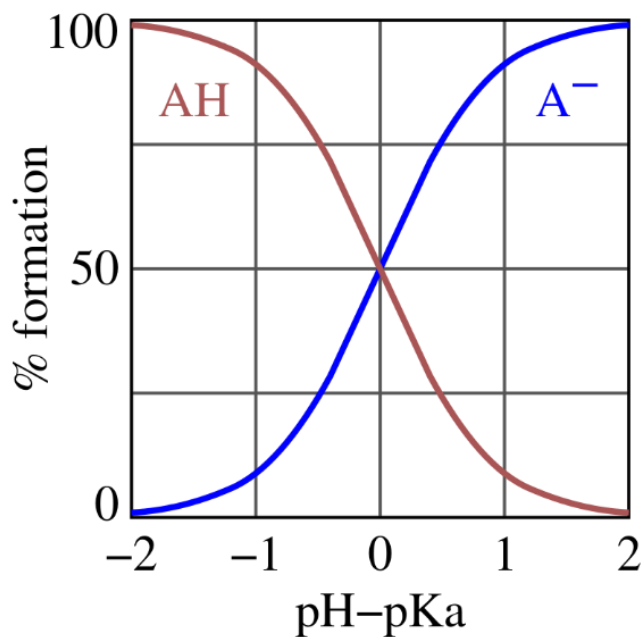


Figura 61: Fermentazione acidogenica accoppiata a strippaggio, andamento della concentrazione dei VFA nel tempo.

In Figura 51 si può notare che, l'acidogenesi è stata più veloce rispetto al recupero tramite lo strippaggio, questo è stato determinato dal pH del fermentatore. Con un pH alcalino pari a 8.2, considerando la costante di dissociazione acida dell'acido acetico a temperatura ipertermofila [129]  $pK_a = 4.81$ ; è stato possibile determinare la percentuale di acido acetico disponibile:

$$\% \text{ acido acetico dissociato} = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} = \frac{1}{1 + 10^{8.2 - 4.81}} = \frac{1}{1 + 10^{3.39}} \approx 0\%$$



$$pH - pK_a = 8.2 - 4.81 = 3.39$$

Nel grafico il valore 3.39 vuol dire che il pH favorisce la base coniugata (curva blu) mentre per quanto riguarda la dissociazione dell'acido (curva rossa) è intorno allo 0 %.

Figura 62: Percentuale di acido dissociato in funzione del pH e  $pK_a$ .



### 3.3.2 Secondo test (Inoculo e FORSU liofilizzati)

Il secondo test di fermentazione accoppiata a strippaggio consiste nell'utilizzo di inoculo e FORSU, entrambi in forma liofilizzata ed i risultati sono stati i seguenti:

Tabella 13: Seconda fermentazione accoppiata a strippaggio, rese globali.

<b>Fermentazione acidogenica accoppiata a strippaggio</b>		
<b>Secondo Test</b>	<b>gCOD/L</b>	<b>Resa (%)</b>
CODt gCOD/L iniziale del fermentatore	180	-
Produzione totale di VFA (acidogenesi)	2.02	1
VFA recuperati con lo strippaggio	1.59	79
<b>Resa globale VFA prodotti nel sistema accoppiato</b>	<b>1.59</b>	<b>1</b>

Dalla Tabella 13 si può notare che la produzione di VFA (acidogenesi) è stata scarsa, solo l'1% rispetto al valore iniziale di COD di 180 gCOD/L. Dei 2.02 gCOD/L di VFA prodotti, sono stati recuperati 1.59 gCOD/L che corrisponde al 79 %. La resa globale è risultata comunque bassa con l'1% dei VFA prodotti e recuperati.

#### Acidogenesi e strippaggio - Secondo test

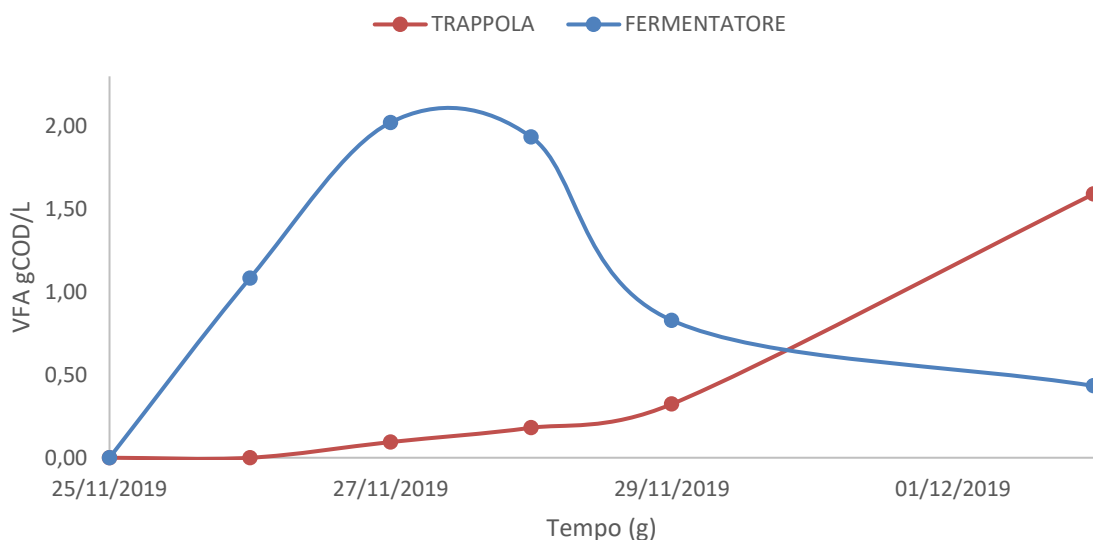


Figura 63: Andamento dei VFA (gCOD/L) nel secondo test di fermentazione accoppiata a strippaggio.

Dal grafico in Figura 63 si può notare che dopo 7 giorni la trappola ha mostrato una concentrazione pari a 1.59 g COD/L raggiungendo la resa del 79 %. La bassa velocità di recupero nei primi giorni è stata determinata dal pH (intorno a 7.5) e dalla bassa concentrazione iniziale dei VFA prodotti durante l'acidogenesi.

### 3.3.3 Terzo test

La terza fermentazione accoppiata a strippaggio ha portato i seguenti risultati:

Tabella 14: Terza fermentazione accoppiata a strippaggio, rese globali.

<b>Fermentazione acidogenica accoppiata a strippaggio</b>		
<b>Terzo Test</b>	<b>gCOD/L</b>	<b>Resa (%)</b>
CODt gCOD/L iniziale del fermentatore	130	-
Produzione totale di VFA (acidogenesi)	25.9	20
VFA recuperati con lo strippaggio	23.2	90
<b>Resa globale VFA prodotti nel sistema accoppiato</b>	<b>23.2</b>	<b>18</b>

Il terzo test (Tabella 14) ha prodotto ben 25.9 gCOD/L di VFA che corrisponde ad una resa del 20 %, inoltre il recupero dei VFA nella trappola è stato pari a 23.2 gCOD/L con una resa del 90 % di VFA catturati. La resa globale del sistema accoppiato per la produzione dei VFA è stata del 18 %.

## Acidogenesi e Strippaggio - Terzo test

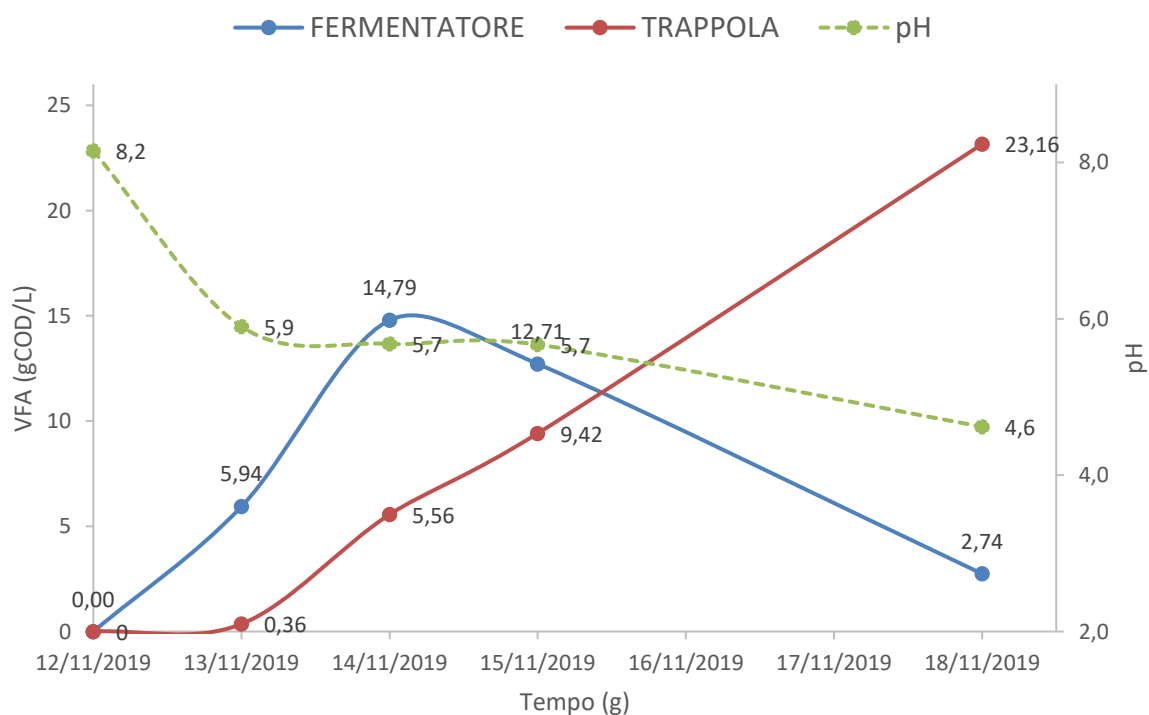


Figura 64: Andamento dei VFA (gCOD/L) nel terzo test di fermentazione accoppiata a strippaggio, ed andamento del pH durante la fermentazione.

Dalla Figura 64 si può notare che nel primo giorno la fermentazione ha prodotto complessivamente 6.3 gCOD/L di VFA, di cui 0.36 gCOD/L sono stati recuperati nella trappola ed i restanti 5.94 gCOD/L sono rimasti nel fermentatore. Questa bassa resa di recupero durante il primo giorno è dovuta al pH che è passato da un valore pari a 8.2 a 5.9. Dopo il primo giorno con la diminuzione del pH, la velocità di recupero è stata maggiore, si può apprezzare infatti un cambiamento di pendenza della curva in rosso riferita alla trappola.

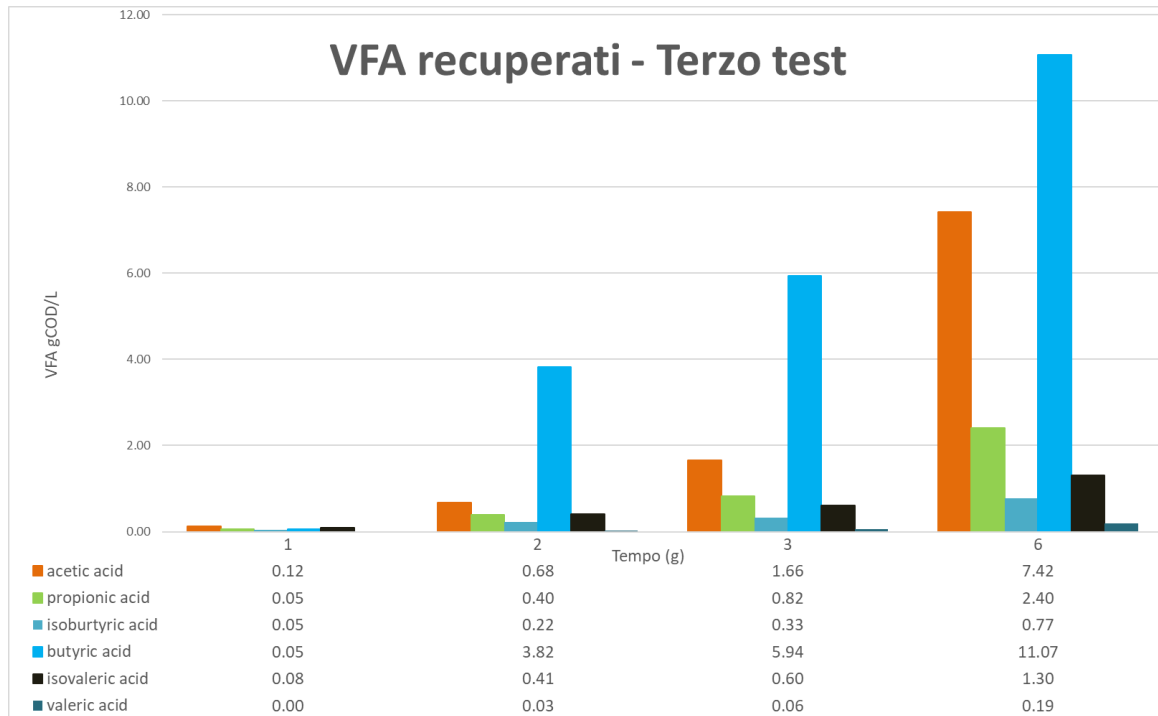


Figura 65: VFA recuperati dal terzo test di fermentazione accoppiata a stripping.

In Figura 65 è riportata la composizione dei VFA recuperati nella trappola e la loro concentrazione; si può notare al giorno 6, l'acido butirrico corrisponde al 47% rispetto al totale, seguito dall'acido acetico con il 32% e dall'acido propionico con il 10 %.

### 3.3.4 Quarto Test

La quarta fermentazione accoppiata a strippaggio ha portato i seguenti risultati:

Tabella 15: Quarta fermentazione accoppiata a strippaggio, rese globali.

Fermentazione acidogenica accoppiata a strippaggio		
Quarto Test	gCOD/L	Resa (%)
CODt gCOD/L iniziale del fermentatore	150	-
Produzione totale di VFA (acidogenesi)	14.7	10
VFA recuperati con lo strippaggio	9.13	62
<b>Resa globale VFA prodotti nel sistema accoppiato</b>	<b>9.13</b>	<b>6</b>

Il quarto test (Tabella 15) ha prodotto complessivamente 14.7 gCOD/L di VFA pari al 10 % del COD iniziale. Lo strippaggio ha recuperato 9.1 gCOD/L pari al 62 % dei VFA prodotti dal sistema. La resa globale è stata del 6 %.

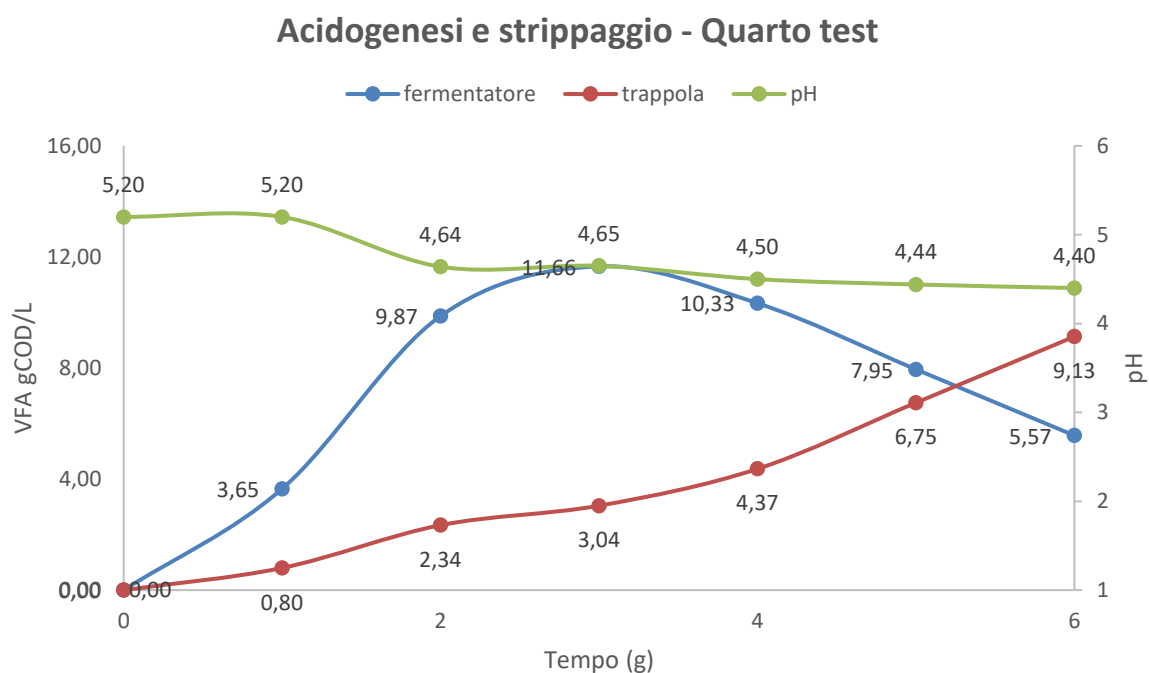


Figura 66: Fermentazione accoppiata a strippaggio, quarto test.

In Figura 66 si può notare che, il primo giorno il sistema accoppiato ha prodotto complessivamente 4.45 gCOD/L di VFA, il recupero nella trappola è stato di circa il 22 % pari a 0.80 g COD/L. Il pH ha riportato un andamento decrescente, da 5.2 del primo giorno, a 4.4 nel sesto, si può notare che la curva in rosso riferita alla concentrazione dei VFA presenti nella

trappola, segue in simmetria l'andamento del pH. In seguito all'abbassamento del pH, i VFA vengono volatilizzati e la concentrazione nella trappola aumenta progressivamente.

In questo caso la composizione dei VFA catturati è stata la seguente:

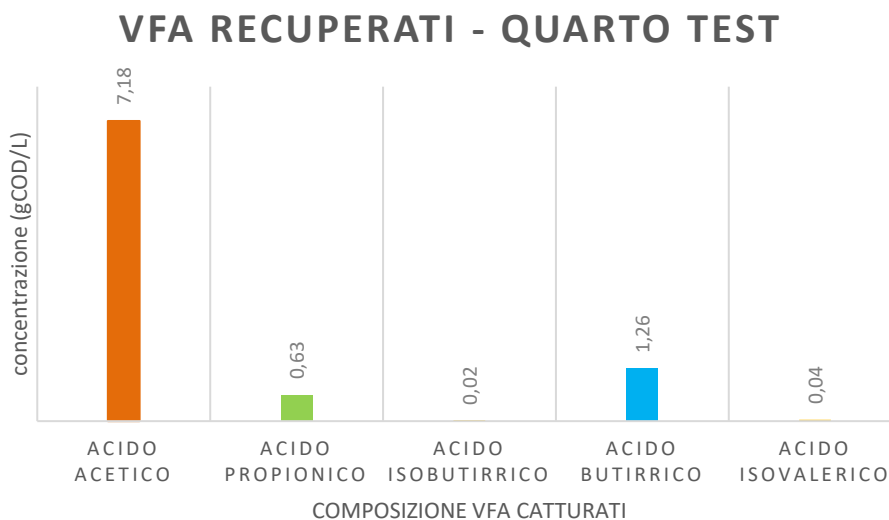


Figura 67: Composizione e concentrazione dei VFA recuperati durante il quarto test.

L'acido acetico è stato il prodotto in composizione maggiore, circa il 79 % rispetto al totale, seguito l'acido butirrico 14% e l'acido propionico 7 %.

Di seguito, in Tabella 16 è stato riportato un riepilogo dei risultati dei test di fermentazione accoppiati a strippaggio.

Tabella 16: Riepilogo dei test di fermentazione accoppiate a strippaggio, rese globali.

	Primo test		Secondo test		Terzo test		Quarto test	
	gCOD/L	Resa	gCOD/L	Resa	gCOD/L	Resa	gCOD/L	Resa
		%		%		%		%
CODt g/L iniziale del fermentatore	50	-	180	-	130	-	150	-
Produzione totale di VFA (acidogenesi)	32.42	65	2.02	1	25.9	20	14.7	10
VFA recuperati con lo strippaggio	6.32	19	1.59	79	23.2	90	9.13	62
Resa globale VFA prodotti nel sistema accoppiato	6.32	13	1.59	1	23.2	18	9.13	6

La produzione totale di VFA o acidogenesi maggiore è stata nel primo test con una conversione pari al 65 %, la più scarsa è stata nel secondo test, con circa 1 % di conversione, dovuto all'utilizzo di inoculo e FORSU liofilizzati.

Il recupero dei VFA tramite lo strippaggio ha portato buone rese, la più alta nel terzo test pari al 90 %, seguito dal secondo test con il 79 % di recupero ed il quarto con il 62 %, la minima del 19 % nel primo test.

In termini di resa globale del sistema accoppiato, le percentuali maggiori sono state del terzo test con il 18% della FORSU convertita e recuperata in VFA, seguiti dal primo test con il 13 %, il quarto con il 6 % ed infine il secondo test con l'1%.

### 3.4 Produzione di PHA – ProBiotipo

Il monitoraggio del ProBiotipo, alimentato con VFA di sintesi è stato effettuato in due periodi dell'anno:

- Il periodo che va da febbraio 2019 a maggio 2019;
- Il periodo che va da ottobre 2019 a dicembre 2019.

Sono stati riportati gli andamenti della domanda chimica di ossigeno insolubile ( $\Delta\text{COD}$ ) che corrisponde alla concentrazione della biomassa delle colture microbiche miste (MMC).

#### 3.4.1 Primo periodo

Di seguito sono stati riportati gli andamenti del  $\Delta\text{COD}$  nei due reattori SBR (Sequencing Batch Reactor) ed AR (Accumulation Reactor). I valori di  $\Delta\text{COD}$ , corrispondenti al COD della biomassa batterica (solidi sospesi volatili) sono stati calcolati nel seguente modo:

$$\Delta\text{COD} = \text{COD}_{\text{Totale}} - \text{COD}_{\text{Solubile}}$$

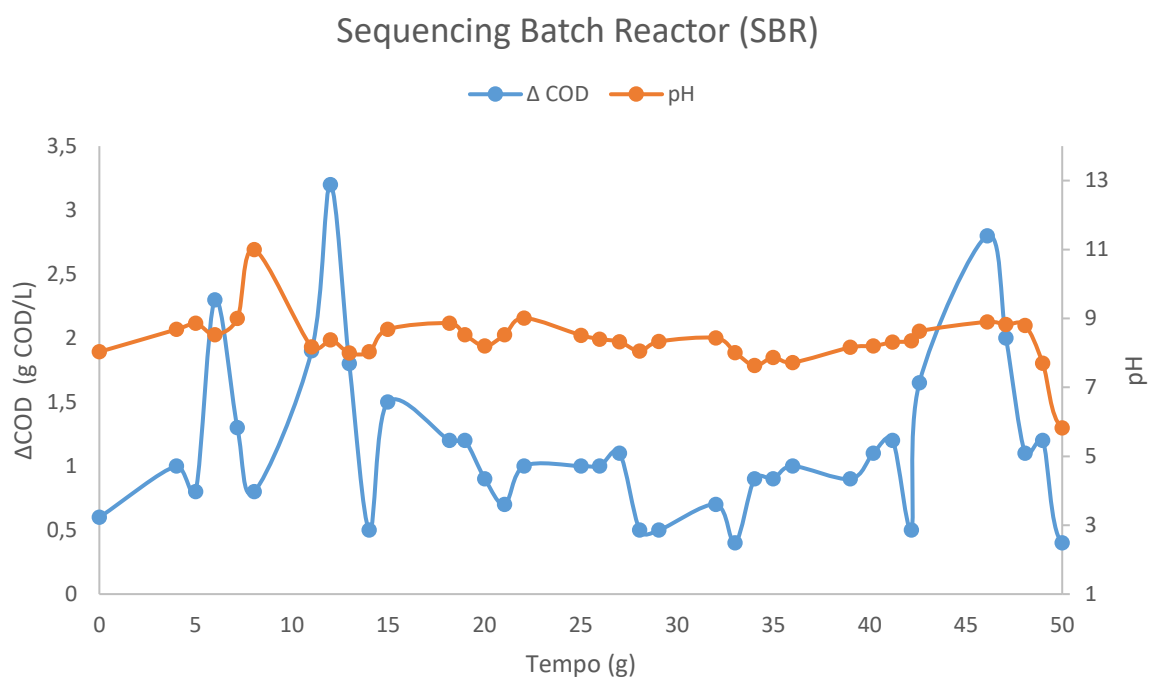


Figura 68: Monitoraggio SBR, andamento del pH e della domanda chimica di ossigeno.

L'andamento del  $\Delta\text{COD}$  non è costante, poiché la crescita delle MMC varia in relazione a diversi fattori, tra i quali, il pH e la somministrazione dei nutrienti. Si può osservare in Figura 68 una piccola correlazione fra il  $\Delta\text{COD}$  e l'andamento del pH. Il picco di COD raggiunto nel giorno 6, pari a 2.3 gCOD/L scende ad un valore di 0.8gCOD/L nel giorno 8. Questo è stato determinato dal pH, infatti si può notare che nei medesimi giorni, il pH sale da 9 fino ad 11

causando molto probabilmente la solubilizzazione delle MMC. Nei giorni successivi il pH è stato riportato ad un valore che segue la media (tra 8 e 9). Tra il giorno 10 e 15, l'SBR è stato svuotato e ripopolato, poiché i valori di pH raggiunti nei giorni precedenti hanno favorito la crescita di organismi antagonisti. Dal giorno 15 in poi, l'andamento del  $\Delta\text{COD}$  è stato comunque "altalenante", tipico di una crescita microbica ed il pH è stato pressoché costante. Dopo giorno il 46 si può notare che il valore di  $\Delta\text{COD}$  ha raggiunto il suo valore massimo pari a 2.8 gCOD/L.

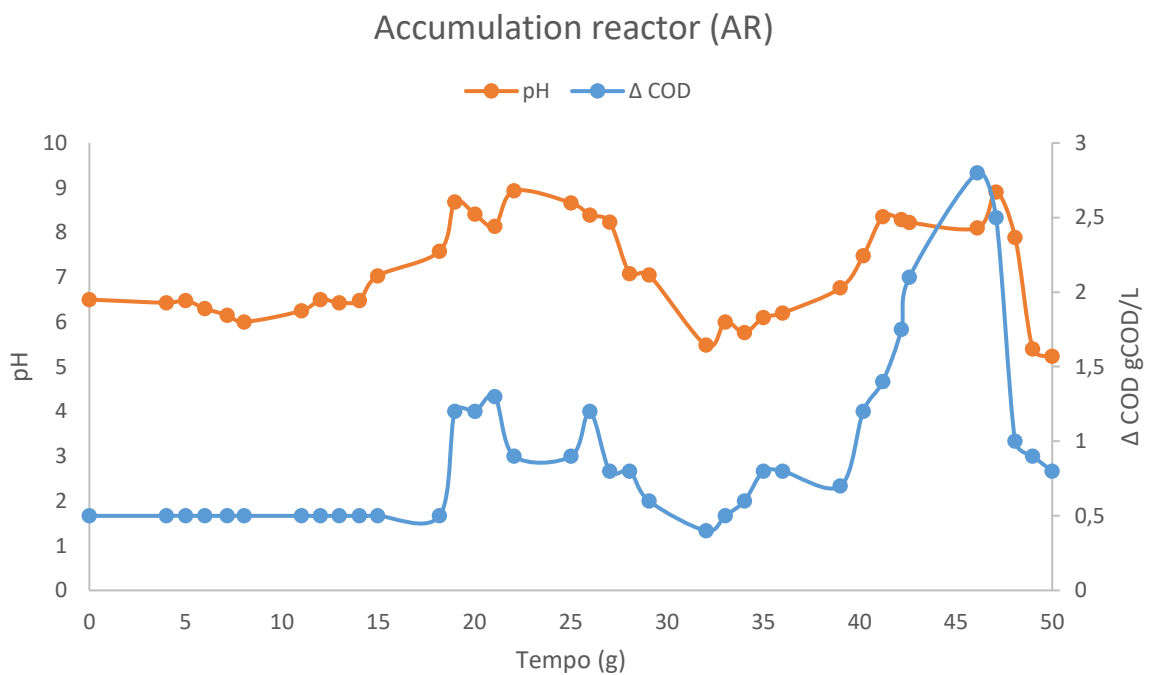


Figura 69: Monitoraggio AR, andamento del pH e della domanda chimica di ossigeno.

Durante i primi giorni i valori di  $\Delta\text{COD}$  sono stati costanti a 0.5 gCOD/L questo perché le colture microbiche presenti nell'SBR hanno subito la selezione. Dopo il giorno 20 le MMC hanno iniziato a crescere. In questo caso i valori medi di pH sono risultati senz'altro più bassi rispetto all'SBR, perché nell'AR i VFA somministrati come substrato di alimentazione per le fasi di *feast and famine* non sono stati del tutto consumati dalle MMC, così da abbassare ulteriormente il pH nella somministrazione di VFA successiva. Si può osservare che, ogni abbassamento di pH ha portato un innalzamento del  $\Delta\text{COD}$  nei giorni successivi. L'andamento del pH in Figura 69 scende con la somministrazione dei VFA, ma le MMC hanno consumato i VFA, il pH tende a salire. Il valore massimo di  $\Delta\text{COD}$  è stato raggiunto dopo il giorno 46 con un valore di 4 gCOD/L.



## Produzione di PHA da MMC

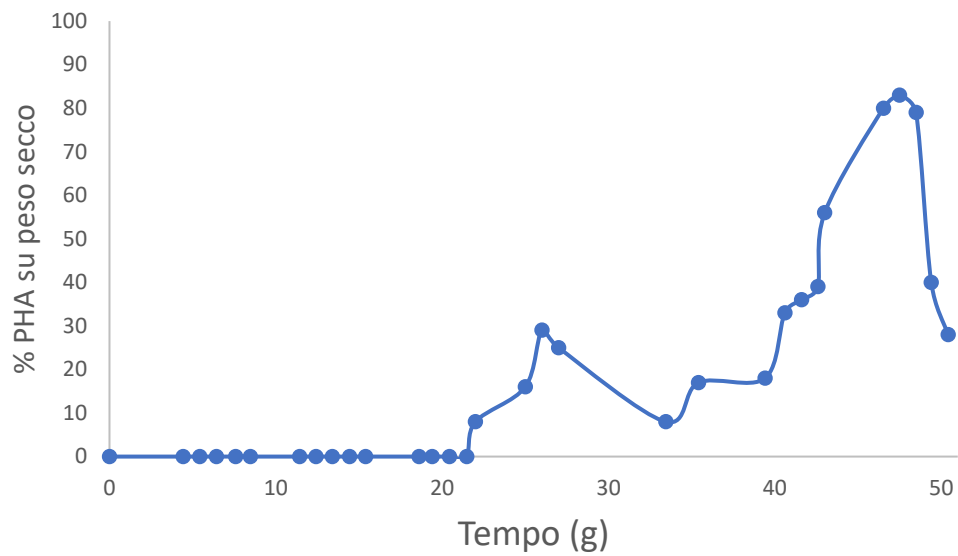


Figura 70: Produzione di PHA da MMC, primo periodo.

Nei primi venti giorni non ci sono state produzioni PHA dovuto alla prima fase di adattamento. Dopo l'adattamento, in questo caso di 20 giorni, si inizia a notare l'accumulo di PHA. Nell'intervallo tra il giorno 20 e 30, la produzione di PHA su peso secco della biomassa è stata del 30%. La resa massima di accumulo di PHA (% su secco) è stata raggiunta nel giorno 47 con l'83%.

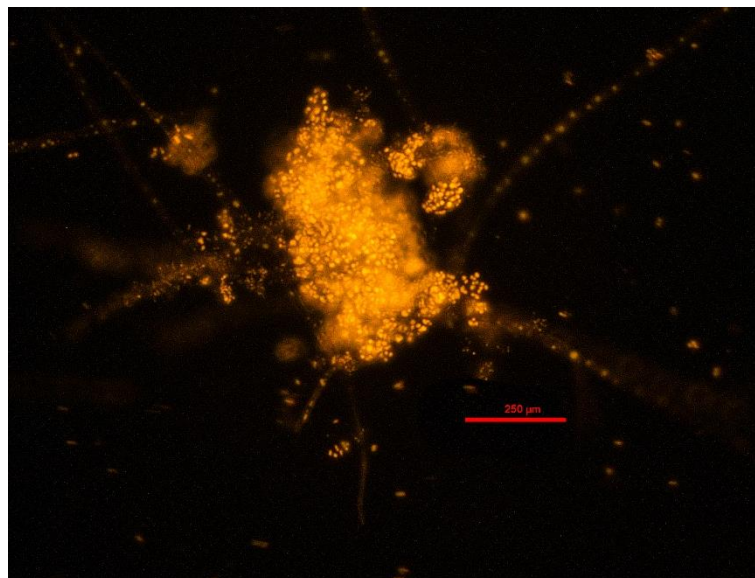


Figura 71: PHA da MMC al microscopio ottico a fluorescenza.

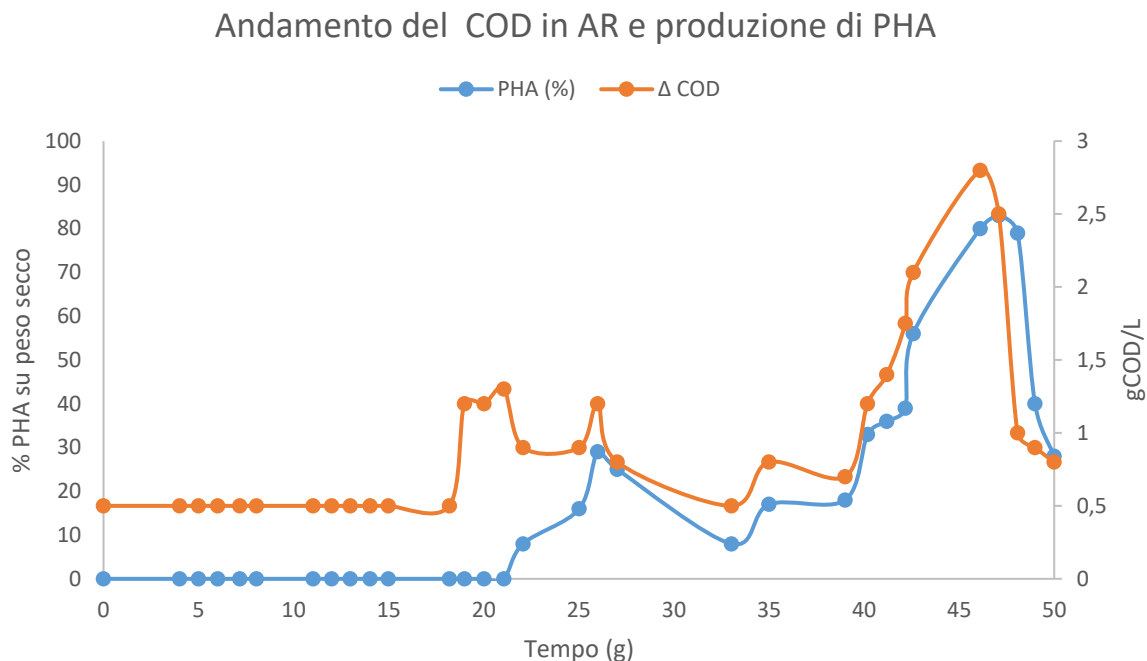


Figura 72: Monitoraggio AR, andamento del COD ed accumulo di PHA da MMC.

In Figura 72 è stato riportato l'andamento del  $\Delta$ COD nell'AR con la produzione di PHA. Si può notare che l'andamento del PHA (%) segue fedelmente quello del  $\Delta$ COD. Tale aumento è in linea con la teoria che prevede che, essendo i nutrienti carenti nell'AR, di osservi un incremento di  $\Delta$ COD soli laddove l'MMC sia in grado di accumulare PHA. Nei primi venti giorni la biomassa non essendo ancora adattata non ha accumulato PHA. Al picco massimo di PHA pari all' 83%, corrisponde il massimo valore di  $\Delta$ COD nell'AR.

### 3.4.2 Secondo periodo

Durante il secondo periodo sono stati montati dei pH-metri in grado di registrare automaticamente il valore del pH in SBR ed in AR ogni 30 minuti. La Figura 73 mostra un campione di tali misure, che ha fornito informazioni sui cicli di *feast and famine*.

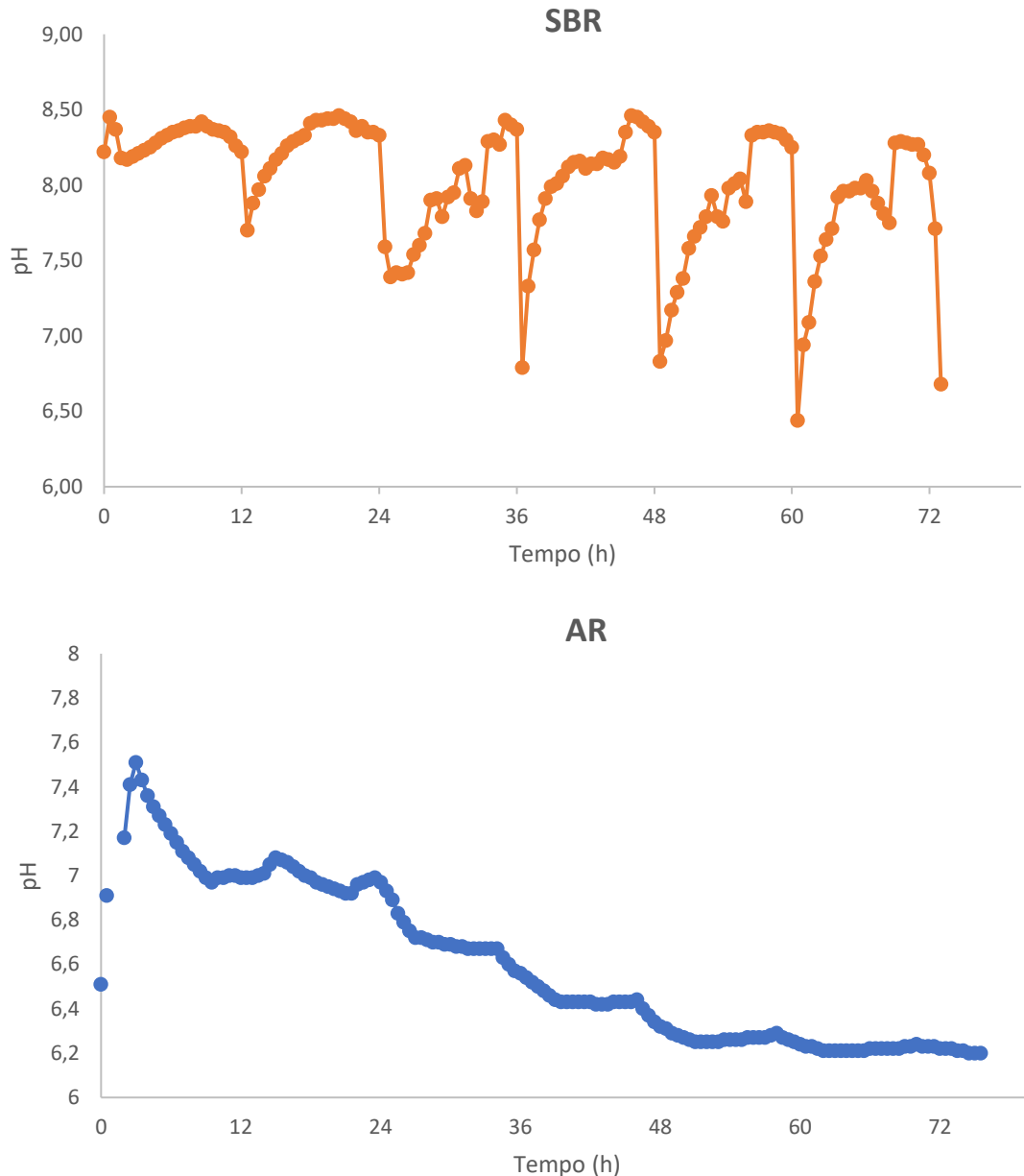


Figura 73: Andamento del pH in SBR ed AR durante sei cicli.

In SBR si può notare un andamento “altalenante” del pH che scende ogni ciclo. Questo perché all’inizio di ogni ciclo sono stati somministrati i VFA all’interno del reattore e successivamente, questi VFA vengono consumati dalle MMC, riportando il pH all’equilibrio. In AR succede pressoché la stessa cosa, solo che i VFA non vengono del tutto consumati, rimane un eccesso che ad ogni ciclo fa scendere ulteriormente il pH.

## Produzione di PHA da MMC

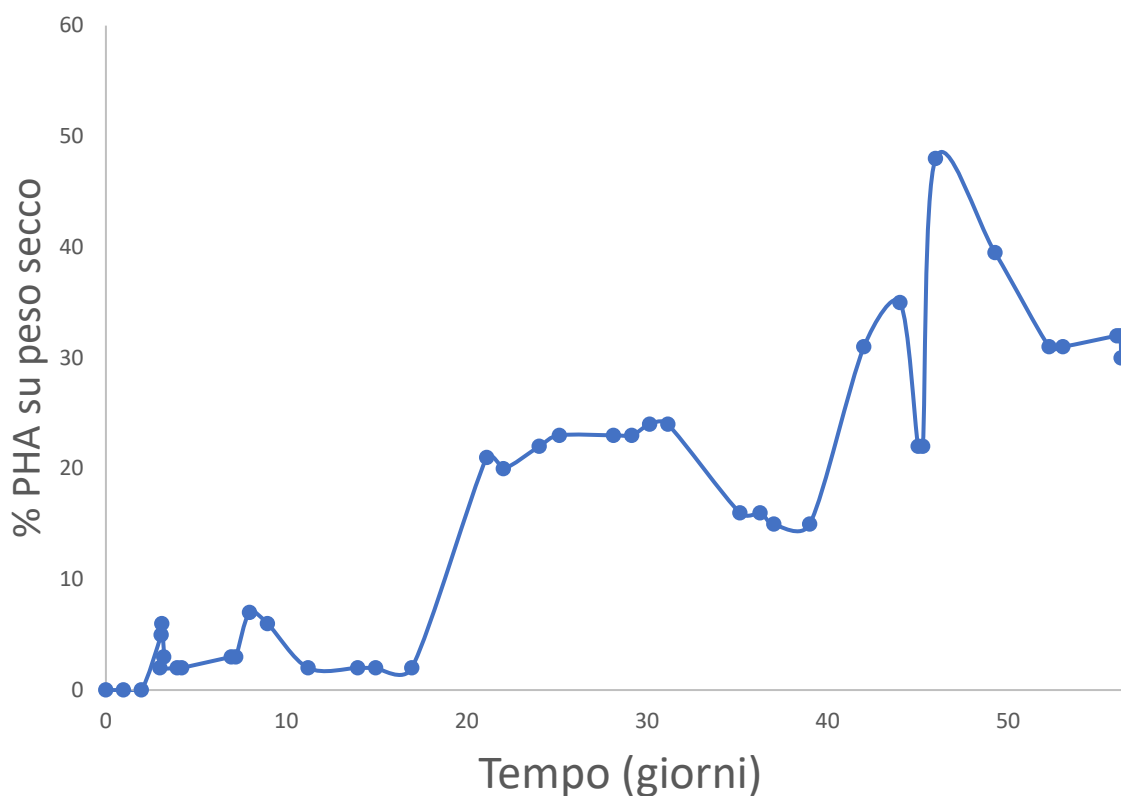


Figura 74: Produzione di PHA da MMC, secondo periodo.

Durante i primi giorni i valori di PHA raggiunti dalle MMC sono risultati più bassi, con valori al di sotto del 10 %, dovuto all'adattamento ai cicli di *feast and famine* e alla scarsa capacità iniziale di accumulare PHA. Dal giorno 20 al 32 le MMC hanno accumulato costantemente un valore di PHA pari al 20 %. Nei giorni successivi si notano altri due picchi di accumulo di PHA, 35 % durante il giorno 44 e 48 % come valore massimo, raggiunto nel giorno 48.

### 3.4.3 Estrazione del PHA dalla biomassa batterica

Le prove di estrazione del PHA dalla biomassa batterica sono state effettuate al campione contenente l'83% di PHA. Sono state effettuate tre repliche:

Tabella 17: Estrazione PHA, tre repliche.

Estrazione	Prima	Seconda	Terza
Peso campione (mg)	100.2	100.0	101.2
PHA recuperato (mg)	77.8	77.1	78.1
Resa recupero (%)	94 %	93 %	94 %

L'estrazione media è stata pari al 94 % seguendo gli stessi valori di Strazzullo et al. (2008) [130] con valori di estrazione pari al 95 %.



Figura 75: Estrazione di PHA da MMC.

## 4 Conclusioni

L'obiettivo principale affrontato in questo lavoro di tesi è stato sviluppare un processo originale, economico, e competitivo a livello industriale per ottenere PHA in sistemi di colture microbiche miste, partendo dalla frazione organica dei rifiuti solidi urbani. La tecnica dello strippaggio come recupero dei VFA ha raggiunto i risultati desiderati; le prove di strippaggio con le soluzioni standard hanno raggiunto percentuali di recupero del 99%. Il pH e la temperatura sono stati i parametri fondamentali ad influenzare il processo. A pH alcalini lo strippaggio è risultato essere più lento, perché la dissociazione degli acidi grassi volatili diminuisce. L'esperimento reale, il sistema di fermentazione acidogenica accoppiata a strippaggio a temperatura ipertermofila, ha raggiunto i risultati desiderati, dimostrando di poter produrre acidi grassi volatili e di recuperarli dalla fermentazione. Sono state valutate diverse rese, la resa dell'acidogenesi, la resa dello strippaggio e la resa globale. La resa dell'acidogenesi più alta è stata del 65 % di conversione della frazione organica dei rifiuti solidi urbani in VFA, pari a 32 gCOD/L. La resa di strippaggio più alta è stata del 90 % con un recupero di 23.2 gCOD/L di VFA, nella seguente composizione: acido butirrico 11.1 gCOD/L, acido acetico 7.4 gCOD/L, acido propionico 2.4 gCOD/L, acido isovalerico 1.3 gCOD/L, acido isobutirrico 0.8 gCOD/L, acido valerico 0.2 gCOD/L. La resa globale del sistema accoppiato (acidogenesi + strippaggio) più alta, è stata del 18 % che corrisponde alla conversione della FORSU in VFA recuperati. L'utilizzo di FORSU e di inoculo, entrambi liofilizzati ha avuto le rese globali più basse, l'1 % di VFA prodotti di cui il 79% recuperati, con una resa globale del sistema accoppiato pari all'1 %. La produzione di poliidrossialcanoati partendo dalla frazione organica dei rifiuti solidi urbani in sistemi a colture microbiche miste, rende tali biopolimeri competitivi in termini di prezzi con le altre plastiche presenti nel mercato [131], abbattendo i costi dell'utilizzo di materie prime come il substrato, il mantenimento di una forte sterilità dei sistemi a colture singole, l'utilizzo di solventi *green* per l'estrazione. Il ProBiotipo come impianto di produzione di PHA ha raggiunto i risultati desiderati, con una produzione pari all'83 % su peso secco. L'estrazione con DMC (dimetilcarbonato) ha raggiunto una percentuale di recupero del 94 %. Sarebbe interessante sviluppare un sistema automatico di estrazione del PHA dalle colture batteriche riducendo ulteriormente i costi del personale; migliorare l'efficienza della produzione attraverso strategie di gestione adattate alla naturale variabilità delle condizioni del substrato e dei batteri; migliorare l'efficienza di produzione di VFA attraverso il sistema di fermentazione accoppiato a strippaggio, facendo studi più mirati, aumento dell'area superficiale dei due reattori, utilizzare

un gas di trasporto dei VFA dal fermentatore alla trappola, studi a pH controllato, pretrattamenti e tipologia di inoculo, tempo di ritenzione, miglioramento del tasso di idrolisi, temperatura.

**BIBLIOGRAFIA**

- [1] M. Atasoy, I. Owusu-Agyeman, E. Plaza, and Z. Cetecioglu, “Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges,” *Bioresour. Technol.*, vol. 268, no. May, pp. 773–786, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.042.
- [2] Y. Ren, M. Yu, C. Wu, Q. Wang, M. Gao, Q. Huang, and Y. Liu, “A comprehensive review on food waste anaerobic digestion: Research updates and tendencies,” *Bioresour. Technol.*, vol. 247, no. September 2017, pp. 1069–1076, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.109.
- [3] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), *Food wastage footprint*. 2013.
- [4] C. M. Braguglia, A. Gallipoli, A. Gianico, and P. Pagliaccia, “Anaerobic bioconversion of food waste into energy: A critical review,” *Bioresour. Technol.*, vol. 248, pp. 37–56, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.145.
- [5] N. Lucifero, “Food Loss and Waste in the EU Law between Sustainability of Well-being and the Implications on Food System and on Environment,” *Agric. Agric. Sci. Procedia*, vol. 8, pp. 282–289, 2016, doi: 10.1016/j.aaspro.2016.02.022.
- [6] A. Stenmark, C. Jensen, and T. Quested, *IVL-report C 186: Estimates of European food waste levels*. 2016.
- [7] European Commission, *Esempi di successo sul compostaggio e la raccolta differenziata Direzione generale Ambiente*. 2000.
- [8] B. H. Yan, A. Selvam, and J. W. C. Wong, “Application of rumen microbes to enhance food waste hydrolysis in acidogenic leach-bed reactors,” *Bioresour. Technol.*, vol. 168, pp. 64–71, 2014, doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.085.
- [9] R. Li, S. Chen, and X. Li, “Biogas production from anaerobic co-digestion of food waste with dairy manure in a two-phase digestion system,” in *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, vol. 160, no. 2, pp. 643–654, doi: 10.1007/s12010-009-8533-z.
- [10] S. Begum, G. R. Anupoju, S. Sridhar, S. K. Bhargava, V. Jegatheesan, and N. Eshtiaghi, “Evaluation of single and two stage anaerobic digestion of landfill leachate: Effect of pH and initial organic loading rate on volatile fatty acid (VFA) and biogas production,”



- Bioresour. Technol.*, vol. 251, no. December 2017, pp. 364–373, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.12.069.
- [11] D. L. Fortela, R. Hernandez, W. T. French, M. Zappi, E. Revellame, W. Holmes, and A. Mondala, “Extent of inhibition and utilization of volatile fatty acids as carbon sources for activated sludge microbial consortia dedicated for biodiesel production,” *Renew. Energy*, vol. 96, pp. 11–19, 2016, doi: 10.1016/j.renene.2016.04.068.
- [12] M. Venkateswar Reddy, K. Amulya, M. V. Rohit, P. N. Sarma, and S. Venkata Mohan, “Valorization of fatty acid waste for bioplastics production using *Bacillus tequilensis*: Integration with dark-fermentative hydrogen production process,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 39, no. 14, pp. 7616–7626, 2014, doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.09.157.
- [13] J. C. Fradinho, A. Oehmen, and M. A. M. Reis, “Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake,” *J. Biotechnol.*, vol. 185, pp. 19–27, 2014, doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.05.035.
- [14] E. B. Sydney, A. C. Novak, D. Rosa, A. B. Pedroni Medeiros, S. K. Brar, C. Larroche, and C. R. Soccol, “Screening and bioprospecting of anaerobic consortia for biohydrogen and volatile fatty acid production in a vinasse based medium through dark fermentation,” *Process Biochem.*, vol. 67, no. January, pp. 1–7, 2018, doi: 10.1016/j.procbio.2018.01.012.
- [15] X. Zheng, Y. Chen, X. Wang, and J. Wu, “Using Mixed Sludge-derived Short-chain Fatty Acids Enhances Power Generation of Microbial Fuel Cells,” *Energy Procedia*, vol. 105, pp. 1282–1288, 2017, doi: 10.1016/j.egypro.2017.03.458.
- [16] M. Zhou, B. Yan, J. W. C. Wong, and Y. Zhang, “Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways,” *Bioresour. Technol.*, vol. 248, pp. 68–78, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.121.
- [17] S. Kant Bhatia Yung-Hun Yang, “Microbial production of volatile fatty acids: current status and future perspectives,” doi: 10.1007/s11157-017-9431-4.
- [18] Z. Xu, Z. Shi, and L. Jiang, “Acetic and Propionic Acids,” in *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, vol. 3, Elsevier Inc., 2011, pp. 189–199.
- [19] S. Kumar and B. V Babu, “Propionic Acid Production via Fermentation Route using

- Renewable Sources Reactive Extraction View project Reactive Extraction of Carboxylic Acid View project Propionic Acid Production via Fermentation Route using Renewable Sources,” 2014.
- [20] M. P. Zacharof and R. W. Lovitt, “Recovery of volatile fatty acids (VFA) from complex waste effluents using membranes,” *Water Sci. Technol.*, vol. 69, no. 3, pp. 495–503, 2014, doi: 10.2166/wst.2013.717.
- [21] S. Bengtsson, J. Hallquist, A. Werker, and T. Welander, “Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 40, no. 3, pp. 492–499, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.bej.2008.02.004.
- [22] P. Weiland, “Biogas production: Current state and perspectives,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, no. 4. Springer Verlag, pp. 849–860, 2010, doi: 10.1007/s00253-009-2246-7.
- [23] A. J. M. Stams, F. A. M. De Bok, C. M. Plugge, M. H. A. Van Eekert, J. Dolfing, and G. Schraa, “Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities,” *Environ. Microbiol.*, vol. 8, no. 3, pp. 371–382, 2006, doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.00989.x.
- [24] H. Liu, J. Wang, X. Liu, B. Fu, J. Chen, and H. Q. Yu, “Acidogenic fermentation of proteinaceous sewage sludge: Effect of pH,” *Water Res.*, vol. 46, no. 3, pp. 799–807, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.watres.2011.11.047.
- [25] E. Neyens, J. Baeyens, R. Dewil, and B. De Heyder, “Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 106, no. 2–3, pp. 83–92, Jan. 2004, doi: 10.1016/j.jhazmat.2003.11.014.
- [26] B. Zhang, L.-L. Zhang;, S.-C. Zhang;, H.-Z. Shi;, and W.-M. Cai;, “The influence of pH on hydrolysis and acidogenesis kitchen wastes,” *Environ. Technol.*, vol. 26, no. 3, pp. 329–340, 2005.
- [27] H. Chen, H. Meng, Z. Nie, and M. Zhang, “Polyhydroxyalkanoate production from fermented volatile fatty acids: Effect of pH and feeding regimes,” *Bioresour. Technol.*, vol. 128, pp. 533–538, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.121.
- [28] J. Jiang, Y. Zhang, K. Li, Q. Wang, C. Gong, and M. Li, “Volatile fatty acids production from food waste: Effects of pH, temperature, and organic loading rate,” *Bioresour. Technol.*, vol. 143, pp. 525–530, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.025.

- [29] K. Min, A. Khan, M. Kwon, Y. Jung, Z. Yun, and Y. Kiso, "Acidogenic fermentation of blended food-waste in combination with primary sludge for the production of volatile fatty acids," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 80, no. 8, pp. 909–915, Aug. 2005, doi: 10.1002/jctb.1261.
- [30] K. Wang, J. Yin, D. Shen, and N. Li, "Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: Effect of pH," *Bioresour. Technol.*, vol. 161, pp. 395–401, 2014, doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.088.
- [31] D. H. Kim, S. H. Kim, K. W. Jung, M. S. Kim, and H. S. Shin, "Effect of initial pH independent of operational pH on hydrogen fermentation of food waste," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 18, pp. 8646–8652, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.030.
- [32] J. Garcia-Aguirre, E. Aymerich, J. González-Mtnez. de Goñi, and M. Esteban-Gutiérrez, "Selective VFA production potential from organic waste streams: Assessing temperature and pH influence," *Bioresour. Technol.*, vol. 244, pp. 1081–1088, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.07.187.
- [33] P. Zhang, Y. Chen, and Q. Zhou, "Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: Effect of pH," *Water Res.*, vol. 43, no. 15, pp. 3735–3742, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.watres.2009.05.036.
- [34] M. He, Y. Sun, D. Zou, H. Yuan, B. Zhu, X. Li, and Y. Pang, "Influence of Temperature on Hydrolysis Acidification of Food Waste," *Procedia Environ. Sci.*, vol. 16, pp. 85–94, 2012, doi: 10.1016/j.proenv.2012.10.012.
- [35] E. Jankowska, J. Chwiałkowska, M. Stodolny, and P. Oleskowicz-Popiel, "Effect of pH and retention time on volatile fatty acids production during mixed culture fermentation," *Bioresour. Technol.*, vol. 190, pp. 274–280, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.biortech.2015.04.096.
- [36] B. H. Yan, A. Selvam, S. Y. Xu, and J. W. C. Wong, "A novel way to utilize hydrogen and carbon dioxide in acidogenic reactor through homoacetogenesis," *Bioresour. Technol.*, vol. 159, pp. 249–257, 2014, doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.014.
- [37] S. R. Chaganti, D. H. Kim, and J. A. Lalman, "Flux balance analysis of mixed anaerobic microbial communities: Effects of linoleic acid (LA) and pH on biohydrogen

- production,” in *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, vol. 36, no. 21, pp. 14141–14152, doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.04.161.
- [38] H. Liu, J. Wang, A. Wang, and J. Chen, “Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 89, no. 5, pp. 1333–1340, Mar-2011, doi: 10.1007/s00253-010-3066-5.
- [39] Y. Chen, X. Li, X. Zheng, and D. Wang, “Enhancement of propionic acid fraction in volatile fatty acids produced from sludge fermentation by the use of food waste and *Propionibacterium acidipropionici*,” *Water Res.*, vol. 47, no. 2, pp. 615–622, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.watres.2012.10.035.
- [40] D. Jin, J. Chen, and S. Lun, “Production of poly(hydroxyalkanoate) by a composite anaerobic acidification-fermentation system,” *Process Biochem.*, vol. 34, no. 8, pp. 829–833, Oct. 1999, doi: 10.1016/S0032-9592(99)00009-6.
- [41] F. C. Silva, L. S. Serafim, H. Nadais, L. Arroja, and I. Capela, “Acidogenic fermentation towards valorisation of organic waste streams into volatile fatty acids,” *Chem. Biochem. Eng. Q.*, vol. 27, no. 4, pp. 467–476, 2013.
- [42] J. Yin, X. Yu, Y. Zhang, D. Shen, M. Wang, Y. Long, and T. Chen, “Enhancement of acidogenic fermentation for volatile fatty acid production from food waste: Effect of redox potential and inoculum,” *Bioresour. Technol.*, vol. 216, pp. 996–1003, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2016.06.053.
- [43] K. Kuruti, S. Nakkasunchi, S. Begum, S. Juntupally, V. Arelli, and G. R. Anupaju, “Rapid generation of volatile fatty acids (VFA) through anaerobic acidification of livestock organic waste at low hydraulic residence time (HRT),” *Bioresour. Technol.*, vol. 238, pp. 188–193, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.04.005.
- [44] N. Bermúdez-Penabad, C. Kennes, and M. C. Veiga, “Anaerobic digestion of tuna waste for the production of volatile fatty acids,” *Waste Manag.*, vol. 68, pp. 96–102, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.wasman.2017.06.010.
- [45] Y. Chen, J. Luo, Y. Yan, and L. Feng, “Enhanced production of short-chain fatty acid by co-fermentation of waste activated sludge and kitchen waste under alkaline conditions and its application to microbial fuel cells,” *Appl. Energy*, vol. 102, pp. 1197–1204, 2013, doi: 10.1016/j.apenergy.2012.06.056.
- [46] S. Zhang, M. Liu, Y. Chen, and Y. T. Pan, “Achieving ethanol-type fermentation for

- hydrogen production in a granular sludge system by aeration,” *Bioresour. Technol.*, vol. 224, pp. 349–357, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2016.11.096.
- [47] N. Müller, P. Worm, B. Schink, A. J. M. Stams, and C. M. Plugge, “Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms,” *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 2, no. 4, pp. 489–499, Mar. 2010, doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00147.x.
- [48] H. S. Shin and J. H. Youn, “Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis,” *Biodegradation*, vol. 16, no. 1, pp. 33–44, 2005, doi: 10.1007/s10531-004-0377-9.
- [49] N. M. C. Saady, “Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge,” *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 38, no. 30, pp. 13172–13191, 08-Oct-2013, doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.07.122.
- [50] H.-S. Lee, M. B. Salerno, and B. E. Rittmann, “Thermodynamic Evaluation on H<sub>2</sub> Production in Glucose Fermentation,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, no. 7, pp. 2401–2407, Apr. 2008, doi: 10.1021/es702610v.
- [51] R. Martínez-Campos and M. De la Torre, “Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 24, no. 6, pp. 427–431, 2002, doi: 10.1023/A:1014562504882.
- [52] Y. Feng, Y. Zhang, X. Quan, and S. Chen, “Enhanced anaerobic digestion of waste activated sludge digestion by the addition of zero valent iron,” *Water Res.*, vol. 52, pp. 242–250, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.watres.2013.10.072.
- [53] M. Vital, A. C. Howe, and J. M. Tiedje, “Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data,” *MBio*, vol. 5, no. 2, Apr. 2014, doi: 10.1128/mBio.00889-14.
- [54] C. Riondet, R. Cachon, Y. Waché, G. Alcaraz, and C. Diviès, “Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*,” *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 3, pp. 620–626, Feb. 2000, doi: 10.1128/JB.182.3.620-626.2000.
- [55] H. Zhu, W. Parker, R. Basnar, A. Proracki, P. Falletta, M. Béland, and P. Seto, “Buffer requirements for enhanced hydrogen production in acidogenic digestion of food wastes,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 21, pp. 5097–5102, Nov. 2009, doi:

- 10.1016/j.biortech.2009.02.066.
- [56] F. A. Castillo Martinez, E. M. Balciunas, J. M. Salgado, J. M. Domínguez González, A. Converti, and R. P. de S. Oliveira, “Lactic acid properties, applications and production: A review,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 30, no. 1. pp. 70–83, Mar-2013, doi: 10.1016/j.tifs.2012.11.007.
- [57] Y. J. Wee, J. N. Kim, and H. W. Ryu, “Biotechnological production of lactic acid and its recent applications,” *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 44, no. 2, pp. 163–172, 2006.
- [58] S. Liang, A. G. McDonald, and E. R. Coats, “Lactic acid production with undefined mixed culture fermentation of potato peel waste,” *Waste Manag.*, vol. 34, no. 11, pp. 2022–2027, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.wasman.2014.07.009.
- [59] V. Siritwongrungsom, R. J. Zeng, and I. Angelidaki, “Homoacetogenesis as the alternative pathway for H<sub>2</sub> sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis,” *Water Res.*, vol. 41, no. 18, pp. 4204–4210, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.watres.2007.05.037.
- [60] T. Eggeman and D. Verser, “Recovery of Organic Acids from Fermentation Broths BT - Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals,” B. H. Davison, B. R. Evans, M. Finkelstein, and J. D. McMillan, Eds. Humana Press, 2005, pp. 605–618.
- [61] P. Gluszczyk, T. Jamroz, B. Sencio, and S. Ledakowicz, “Equilibrium and dynamic investigations of organic acids adsorption onto ion-exchange resins,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 26, no. 3, pp. 185–190, Apr. 2004, doi: 10.1007/s00449-003-0348-7.
- [62] Z. Wang, Y. Luo, and P. Yu, “Recovery of organic acids from waste salt solutions derived from the manufacture of cyclohexanone by electrodialysis,” *J. Memb. Sci.*, vol. 280, no. 1–2, pp. 134–137, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.memsci.2006.01.015.
- [63] C. Huang, T. Xu, Y. Zhang, Y. Xue, and G. Chen, “Application of electrodialysis to the production of organic acids: State-of-the-art and recent developments,” *Journal of Membrane Science*, vol. 288, no. 1–2. pp. 1–12, 01-Feb-2007, doi: 10.1016/j.memsci.2006.11.026.
- [64] Y. Weng, H. Wei, T. Tsai, T. Lin, ... T. W.-B., and undefined 2010, “Separation of furans and carboxylic acids from sugars in dilute acid rice straw hydrolyzates by nanofiltration,” *Elsevier*.

- [65] M. P. Zacharof, S. J. Mandale, P. M. Williams, and R. W. Lovitt, "Nanofiltration of treated digested agricultural wastewater for recovery of carboxylic acids," *J. Clean. Prod.*, vol. 112, pp. 4749–4761, 2016, doi: 10.1016/j.jclepro.2015.07.004.
- [66] F. Zhou, C. Wang, and J. Wei, "Separation of acetic acid from monosaccharides by NF and RO membranes: Performance comparison," *J. Memb. Sci.*, vol. 429, pp. 243–251, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.memsci.2012.11.043.
- [67] H. G. Joglekar, I. Rahman, S. Babu, B. D. Kulkarni, and A. Joshi, "Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid," *Separation and Purification Technology*, vol. 52, no. 1, pp. 1–17, Nov-2006, doi: 10.1016/j.seppur.2006.03.015.
- [68] E. Alkaya, S. Kaptan, L. Ozkan, S. Uludag-Demirer, and G. N. Demirer, "Recovery of acids from anaerobic acidification broth by liquid-liquid extraction," *Chemosphere*, vol. 77, no. 8, pp. 1137–1142, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.08.027.
- [69] C. B. Rasrendra, B. Girisuta, H. H. Van de Bovenkamp, J. G. M. Winkelman, E. J. Leijenhurst, R. H. Venderbosch, M. Windt, D. Meier, and H. J. Heeres, "Recovery of acetic acid from an aqueous pyrolysis oil phase by reactive extraction using tri-n-octylamine," *Chem. Eng. J.*, vol. 176–177, pp. 244–252, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.cej.2011.08.082.
- [70] R. R. Singhanian, A. K. Patel, G. Christophe, P. Fontanille, and C. Larroche, "Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation," *Bioresour. Technol.*, vol. 145, pp. 166–174, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.137.
- [71] R. Kertész and Š. Schlosser, "Design and simulation of two phase hollow fiber contactors for simultaneous membrane based solvent extraction and stripping of organic acids and bases," in *Separation and Purification Technology*, 2005, vol. 41, no. 3, pp. 275–287, doi: 10.1016/j.seppur.2004.09.007.
- [72] X. Li, J. E. Swan, G. R. Nair, and A. G. Langdon, "Preparation of volatile fatty acid (VFA) calcium salts by anaerobic digestion of glucose," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 62, no. 4, pp. 476–482, 2015, doi: 10.1002/bab.1301.
- [73] H. Strathmann, "Electrodialysis, a mature technology with a multitude of new applications," *Desalination*, vol. 264, no. 3, pp. 268–288, Dec. 2010, doi:

- 10.1016/j.desal.2010.04.069.
- [74] R. J. Jones, J. Massanet-Nicolau, A. Guwy, G. C. Premier, R. M. Dinsdale, and M. Reilly, “Removal and recovery of inhibitory volatile fatty acids from mixed acid fermentations by conventional electrodialysis,” *Bioresour. Technol.*, vol. 189, pp. 279–284, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.biortech.2015.04.001.
- [75] L. Masse, D. I. Massé, Y. Pellerin, and J. Dubreuil, “Osmotic pressure and substrate resistance during the concentration of manure nutrients by reverse osmosis membranes,” *J. Memb. Sci.*, vol. 348, no. 1–2, pp. 28–33, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.memsci.2009.10.038.
- [76] I. Owusu-Agyeman, A. Malovanyy, and E. Plaza, “Pre-concentration of ammonium to enhance treatment of wastewater using the partial nitrification/anammox process,” *Environ. Technol. (United Kingdom)*, vol. 36, no. 10, pp. 1256–1264, May 2015, doi: 10.1080/09593330.2014.984770.
- [77] A. R. Rajabzadeh, N. Ruzich, S. Zendejboudi, and M. Rahbari, “Biomass Leachate Treatment and Nutrient Recovery Using Reverse Osmosis: Experimental Study and Hybrid Artificial Neural Network Modeling,” *Energy & Fuels*, vol. 26, no. 12, pp. 7155–7163, Dec. 2012, doi: 10.1021/ef301452s.
- [78] R. Shang, W. B. P. van den Broek, S. G. J. Heijman, S. van Agtmaal, and L. C. Rietveld, “Wastewater reuse through RO: A case study of four RO plants producing industrial water,” *Desalin. Water Treat.*, vol. 34, no. 1–3, pp. 408–415, 2011, doi: 10.5004/dwt.2011.2895.
- [79] B. Xiong, T. L. Richard, and M. Kumar, “Integrated acidogenic digestion and carboxylic acid separation by nanofiltration membranes for the lignocellulosic carboxylate platform,” *J. Memb. Sci.*, vol. 489, pp. 275–283, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.memsci.2015.04.022.
- [80] P. L. Edmiston, A. R. Gilbert, Z. Harvey, and N. Mellor, “Adsorption of short chain carboxylic acids from aqueous solution by swellable organically modified silica materials,” *Adsorption*, vol. 24, no. 1, pp. 53–63, Jan. 2018, doi: 10.1007/s10450-017-9923-0.
- [81] S. Rebecchi, D. Pinelli, L. Bertin, F. Zama, F. Fava, and D. Frascari, “Volatile fatty acids recovery from the effluent of an acidogenic digestion process fed with grape pomace by



- adsorption on ion exchange resins,” *Chem. Eng. J.*, vol. 306, pp. 629–639, 2016, doi: 10.1016/j.cej.2016.07.101.
- [82] L. Bertin, G. Martinez, J. M. B. Domingos, S. Rebecchi, and F. Fava, “Recovery of volatile fatty acids by solid phase extraction and their employment in concentrated feeding solution for polyhydroxyalkanoates production,” *N. Biotechnol.*, vol. 33, p. S18, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.nbt.2016.06.790.
- [83] E. Reyhanitash, S. R. A. Kersten, and B. Schuur, “Recovery of Volatile Fatty Acids from Fermented Wastewater by Adsorption,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 5, no. 10, pp. 9176–9184, Oct. 2017, doi: 10.1021/acssuschemeng.7b02095.
- [84] Z. Li, W. Qin, and Y. Dai, “Liquid–Liquid Equilibria of Acetic, Propionic, Butyric, and Valeric Acids with Trioctylamine as Extractant,” *J. Chem. Eng. Data*, vol. 47, no. 4, pp. 843–848, Jul. 2002, doi: 10.1021/je015526t.
- [85] M. J. Playne and B. R. Smith, “Toxicity of organic extraction reagents to anaerobic bacteria,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 25, no. 5, pp. 1251–1265, May 1983, doi: 10.1002/bit.260250508.
- [86] C. Torri, C. Samorì, V. Ajao, S. Baraldi, P. Galletti, and E. Tagliavini, “Pertraction of volatile fatty acids through biodiesel-based liquid membranes,” *Chem. Eng. J.*, vol. 366, no. January, pp. 254–263, 2019, doi: 10.1016/j.cej.2019.02.081.
- [87] W. de A. Cavalcante, R. C. Leitão, T. A. Gehring, L. T. Angenent, and S. T. Santaella, “Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review,” *Process Biochemistry*, vol. 54. Elsevier Ltd, pp. 106–119, 01-Mar-2017, doi: 10.1016/j.procbio.2016.12.024.
- [88] Š. Schlosser, R. Kertész, and J. Marták, “Recovery and separation of organic acids by membrane-based solvent extraction and pertraction: An overview with a case study on recovery of MPCA,” in *Separation and Purification Technology*, 2005, vol. 41, no. 3, pp. 237–266, doi: 10.1016/j.seppur.2004.07.019.
- [89] M. C. Kavanaugh and R. R. Trussell, “Design of aeration towers to strip volatile contaminants from drinking water,” *J. / Am. Water Work. Assoc.*, vol. 72, no. 12, pp. 684–692, 1980, doi: 10.1002/j.1551-8833.1980.tb04613.x.
- [90] S. P. Singh, R. M. Counce, J. H. Wilson, J. F. Villiers-Fisher, H. L. Jennings, A. J. Lucero, G. D. Reed, R. A. Ashworth, and M. G. Elliott, “Removal of Volatile Organic

- Compounds from Groundwater Using a Rotary Air Stripper,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 31, no. 2, pp. 574–580, Jan. 1992, doi: 10.1021/ie00002a019.
- [91] European Commission, “A European Strategy for Plastics,” *A Eur. Strateg. Plast. a Circ. Econ.*, no. July, p. 24, 2018, doi: 10.1021/acs.est.7b02368.
- [92] J. L. Lavers, L. Dicks, M. R. Dicks, and A. Finger, “Significant plastic accumulation on the Cocos (Keeling) Islands, Australia,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-43375-4.
- [93] S. Chanprateep, “Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 110, no. 6, pp. 621–632, 2010, doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.07.014.
- [94] European Bioplastics, “What are bioplastics?,” 2018. [Online]. Available: <https://www.european-bioplastics.org/news/publications/>.
- [95] European Bioplastics, “Frequently Asked Questions on Bioplastics,” *Eur. Bioplastics*, pp. 4–26, 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-415953-2.00005-4.
- [96] European Bioplastics, “Home Composting,” 2015. [Online]. Available: <https://www.european-bioplastics.org/news/publications/>.
- [97] European Bioplastics, “Bioplastics market development update 2018,” vol. 2019, pp. 2018–2019, 2019.
- [98] A. Steinbüchel and H. E. Valentin, “Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 128, no. 3, pp. 219–228, 1995, doi: 10.1016/0378-1097(95)00125-O.
- [99] R. W. Lenz, R. A. Gross, H. Brandl, and R. C. Fuller, “Poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoates). Natural biocompatible and biodegradable polyesters produced by bacteria,” *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)*, vol. 7, no. 4, pp. 289–298, 1989.
- [100] D. Jendrossek and R. Handrick, “Microbial degradation of poly-beta-hydroxyalkanoates,” *Microbiologia*, vol. 10, no. 1–2, pp. 131–144, 2008, doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160838.
- [101] Lemoigne, “Produits de Deshydratation et de Polymerisation de L’acide  $\beta$ -Oxybutyrique,” *Bull. Soc. Chim. Biol.*, vol. 8, pp. 770–782, 1926.
- [102] J. S. Cech and P. Hartman, “Competition between polyphosphate and polysaccharide

- accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal systems,” *Water Res.*, vol. 27, no. 7, pp. 1219–1225, 1993, doi: 10.1016/0043-1354(93)90014-9.
- [103] M. Koller, H. Niebelschütz, and G. Braunegg, “Strategies for recovery and purification of poly[(*R*)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass,” *Eng. Life Sci.*, vol. 13, no. 6, pp. 549–562, Nov. 2013, doi: 10.1002/elsc.201300021.
- [104] M. Zinn, B. Witholt, and T. Egli, “Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 53, no. 1, pp. 5–21, 03-Dec-2001, doi: 10.1016/S0169-409X(01)00218-6.
- [105] V. Martínez, C. Herencias, E. Jurkevitch, and M. A. Prieto, “Engineering a predatory bacterium as a proficient killer agent for intracellular bio-products recovery: The case of the polyhydroxyalkanoates,” *Sci. Rep.*, vol. 6, Apr. 2016, doi: 10.1038/srep24381.
- [106] H. Salehizadeh and M. C. M. Van Loosdrecht, “Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: Recent trends and biotechnological importance,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 22, no. 3, pp. 261–279, 2004, doi: 10.1016/j.biotechadv.2003.09.003.
- [107] M. Valera, “Poliidrossialcanoati polimeri biodegradabili del futuro?,” *La Chim. e L’industria*, no. Giugno 2001, pp. 1–7, 2001.
- [108] F. Valentino, F. Morgan-Sagastume, S. Fraraccio, G. Corsi, G. Zanaroli, A. Werker, and M. Majone, “Sludge minimization in municipal wastewater treatment by polyhydroxyalkanoate (PHA) production,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 22, no. 10, pp. 7281–7294, May 2015, doi: 10.1007/s11356-014-3268-y.
- [109] M. A. M. Reis, L. S. Serafim, P. C. Lemos, A. M. Ramos, F. R. Aguiar, and M. C. M. Van Loosdrecht, “Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 25, no. 6, pp. 377–385, Jul. 2003, doi: 10.1007/s00449-003-0322-4.
- [110] M. G. E. Albuquerque, V. Martino, E. Pollet, L. Avérous, and M. A. M. Reis, “Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties,” *J. Biotechnol.*, vol. 151, no. 1, pp. 66–76, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.10.070.
- [111] M. Villano, F. Valentino, A. Barbetta, L. Martino, M. Scandola, and M. Majone, “Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: From culture

- selection to polymer recovery in a high-rate continuous process,” *N. Biotechnol.*, vol. 31, no. 4, pp. 289–296, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.nbt.2013.08.001.
- [112] K. Johnson, R. Kleerebezem, and M. C. M. van Loosdrecht, “Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures,” *J. Biotechnol.*, vol. 147, no. 2, pp. 73–79, May 2010, doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.02.003.
- [113] D. Dionisi, G. Carucci, M. Petrangeli Papini, C. Riccardi, M. Majone, and F. Carrasco, “Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers,” *Water Res.*, vol. 39, no. 10, pp. 2076–2084, May 2005, doi: 10.1016/j.watres.2005.03.011.
- [114] H.-Y. Liu, P. V. Hall, J. L. Darby, E. R. Coats, P. G. Green, D. E. Thompson, and F. J. Loge, “Production of Polyhydroxyalkanoate During Treatment of Tomato Cannery Wastewater,” *Water Environ. Res.*, vol. 80, no. 4, pp. 367–372, Apr. 2008, doi: 10.2175/106143007x221535.
- [115] M. Beccari, L. Bertin, D. Dionisi, F. Fava, S. Lampis, M. Majone, F. Valentino, G. Vallini, and M. Villano, “Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 84, no. 6, pp. 901–908, 2009, doi: 10.1002/jctb.2173.
- [116] M. G. E. Albuquerque, C. A. V. Torres, and M. A. M. Reis, “Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection,” *Water Res.*, vol. 44, no. 11, pp. 3419–3433, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.watres.2010.03.021.
- [117] M. Venkateswar Reddy and S. Venkata Mohan, “Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment,” *Bioresour. Technol.*, vol. 114, pp. 573–582, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.127.
- [118] G. Pozo, A. C. Villamar, M. Martínez, and G. Vidal, “Polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis from kraft mill wastewaters: Biomass origin and C:N relationship influence,” *Water Sci. Technol.*, vol. 63, no. 3, pp. 449–455, 2011, doi: 10.2166/wst.2011.242.
- [119] C. Lorenzetti, R. Conti, D. Fabbri, and J. Yanik, “A comparative study on the catalytic effect of H-ZSM5 on upgrading of pyrolysis vapors derived from lignocellulosic and proteinaceous biomass,” *Fuel*, vol. 166, pp. 446–452, Feb. 2016, doi:

- 10.1016/j.fuel.2015.10.051.
- [120] S. Boisen, S. Bech-Andersen, and B. O. Eggum, “A Critical View on the Conversion Factor 6.25 from Total Nitrogen to Protein,” *Acta Agric. Scand.*, vol. 37, no. 3, pp. 299–304, 1987, doi: 10.1080/00015128709436560.
- [121] E. G. Bligh and W. J. Dyer, “A rapid method of total extraction and purification,” *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, 1959.
- [122] S. Mykkestad and A. Haug, “Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium,” *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, vol. 9, no. 2, pp. 125–136, 1972, doi: 10.1016/0022-0981(72)90041-X.
- [123] M. Dubois, K. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, “A colorimetric method for the determination of sugars,” *Nature*, vol. 168, no. 4265, p. 167, 1951, doi: 10.1038/168167a0.
- [124] M. Ghidotti, D. Fabbri, C. Torri, and S. Piccinini, “Determination of volatile fatty acids in digestate by solvent extraction with dimethyl carbonate and gas chromatography-mass spectrometry,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1034, pp. 92–101, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.aca.2018.06.082.
- [125] F. Abbondanzi, G. Biscaro, G. Carvalho, L. Favaro, P. Lemos, M. Paglione, C. Samorì, and C. Torri, “Fast method for the determination of short-chain-length polyhydroxyalkanoates (scl-PHAs) in bacterial samples by In Vial-Thermolysis (IVT),” *N. Biotechnol.*, vol. 39, pp. 29–35, 2017, doi: 10.1016/j.nbt.2017.05.012.
- [126] V. P. Natarajan, X. Zhang, Y. Morono, F. Inagaki, and F. Wang, “A Modified SDS-Based DNA Extraction Method for High Quality Environmental DNA from Seafloor Environments,” *Front. Microbiol.*, vol. 07, Jun. 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00986.
- [127] F. Shen, H. Yuan, Y. Pang, S. Chen, B. Zhu, D. Zou, Y. Liu, J. Ma, L. Yu, and X. Li, “Performances of anaerobic co-digestion of fruit & vegetable waste (FVW) and food waste (FW): Single-phase vs. two-phase,” *Bioresour. Technol.*, vol. 144, pp. 80–85, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.099.
- [128] S. K. Han and H. S. Shin, “Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 29, no. 6, pp. 569–577, May 2004, doi: 10.1016/j.ijhydene.2003.09.001.

- [129] H. S. Harned and R. W. Ehlers, “The dissociation constant of acetic acid from 0 to 60° centigrade,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 55, no. 2, pp. 652–656, Feb. 1933, doi: 10.1021/ja01329a027.
- [130] G. Strazzullo, A. Gambacorta, F. M. Vella, B. Immirzi, I. Romano, V. Calandrelli, B. Nicolaus, and L. Lama, “Chemical-physical characterization of polyhydroxyalkanoates recovered by means of a simplified method from cultures of *Halomonas campaniensis*,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 24, no. 8, pp. 1513–1519, Aug. 2008, doi: 10.1007/s11274-007-9637-7.
- [131] S. Ortelli, A. L. Costa, C. Torri, C. Samorì, P. Galletti, C. Vineis, A. Varesano, L. Bonura, and G. Bianchi, “Innovative and sustainable production of biopolymers,” in *Factories of the Future: The Italian Flagship Initiative*, Springer International Publishing, 2019, pp. 131–148.

## **Ringraziamenti**

Si desidera ringraziare vivamente: l'Alma Mater Studiorum Università di Bologna, in particolare il Magnifico Rettore Francesco Ubertini, per aver permesso di concludere a tutti noi studenti con le adeguate precauzioni e l'utilizzo della tecnologia, questo percorso universitario così di conseguire al titolo, nonostante lo stato di emergenza causato dall'epidemia COVID-19; il relatore prof. Cristian Torri e la correlatrice dott.ssa Eleonora Torricelli per il costante supporto e l'ampia disponibilità dimostrati in tutte le fasi di realizzazione di questa Tesi; il gruppo di B-PLAS DEMO (EIT Climate-Kic) in particolare la prof.ssa Chiara Samorì, la dott.ssa Alisar Kiwan, il dott. Daniele Pirini, la dott.ssa Giorgia Pagliano per il loro supporto e la collaborazione in alcune determinazioni analitiche; il Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali (CIRSA), per la strumentazione necessaria alla preparazione della prova finale, ringrazio i dottorandi e tutti i tecnici, in particolare Stefano Modelli per la sua presenza costante all'interno dei laboratori; la mia famiglia, per i sacrifici fatti e per non aver mai smesso di supportarmi, credendo in me ogni momento; i miei colleghi, coinquilini e tutti gli amici per aver alleggerito il percorso.