



# **POLITECNICO**

## **MILANO 1863**

Scuola di Ingegneria Civile e Ambientale

Laurea magistrale in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio

### **DIGESTIONE ANAEROBICA DI REFLUI DA LAVORAZIONE DEI LUPINI: POTENZIALITÀ E PRETRATTAMENTI**

Relatore: Prof.ssa Francesca Malpei

Correlatore: Ing. Giacomo Bellandi

Tesi di Laurea di: Nicola Taverniti

Matricola: 875684

Anno accademico 2018/2019



## **Ringraziamenti**

*Ringrazio di cuore tutti coloro che mi hanno sostenuto, supportato ed aiutato durante questo lavoro di tesi e, più in generale, durante il periodo universitario.*

*Un grazie alla professoressa Francesca Malpei che mi ha seguito con professionalità durante lo svolgimento del lavoro in qualità di relatrice e all'Ing. Giacomo Bellandi che mi ha invece guidato durante le attività sperimentali dimostrando grandissima disponibilità e pazienza. Grazie anche all'Ing. Silvia Battello che mi ha introdotto al lavoro di tesi, a Nadia Margariti e a tutti gli altri ragazzi del laboratorio Rozzi che in un modo o nell'altro mi hanno dato una mano in questi mesi di lavoro.*

*Desidero poi ringraziare mia madre e mio padre, che hanno sempre creduto in me e che mi hanno sostenuto in ogni modo durante questi anni. Per lo stesso motivo ringrazio Leo e Gianluca, quest'ultimo soprattutto per aver contribuito a piantare lupini nell'orto a Bivongi. Ringrazio zie e zii, cugine e cugini che mi hanno ospitato quando avevo voglia di evadere da Milano, e mangiare e bere qualcosa di diverso come le famose torte rustiche di zia Co o la leggerissima grappa di Ferdi. Per ultimi tra i familiari, ringrazio nonna Immacolata e nonna Maria che mi ricordano che ogni tanto devo mangiare, e un saluto speciale a nonno Leonardo, uomo, per me, di grande esempio.*

*Infine, un sincero grazie a tutti i miei amici. Grazie agli amici di Bivongi, a quelli di Milano, a quelli della residenza e a quelli del Poli, senza di voi questi anni non sarebbero stati gli stessi!*

# Indice

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>8</b>
<b>2 DIGESTIONE ANAEROBICA .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 GENERALITÀ.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 FASI DEL PROCESSO .....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Idrolisi.....	12
2.2.2 Acidogenesi .....	13
2.2.3 Acetogenesi .....	13
2.2.4 Metanogenesi.....	14
<b>2.3 PARAMETRI CHE INFLUENZANO IL PROCESSO .....</b>	<b>14</b>
2.3.1 Temperatura.....	14
2.3.2 pH .....	15
2.3.3 Ammoniaca e zolfo.....	16
2.3.4 Ioni metallici.....	17
2.3.4.1 Sodio .....	17
2.3.4.2 Calcio .....	17
2.3.4.3 Potassio.....	17
2.3.4.4 Magnesio .....	17
<b>2.4 TIPOLOGIE DI PRETRATTAMENTI.....</b>	<b>18</b>
2.4.1 Generalità.....	18
2.4.2 Pretrattamento termico.....	20
2.4.2.1 Trattamento ad alte temperature .....	20
2.4.2.2 Trattamento a basse temperature .....	21
2.4.3 Pretrattamento chimico .....	22
2.4.3.1 Trattamento basico .....	22
2.4.3.2 Trattamento acido.....	23
2.4.4 Pretrattamento enzimatico .....	24
2.4.4.1 Idrolisi enzimatica delle proteine nel lupino .....	25
<b>3 CARATTERISTICHE E USO DEI LUPINI .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 GENERALITÀ SUL LUPINO.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 PROPRIETÀ NUTRITIVE E COMPOSIZIONE DEL LUPINO .....</b>	<b>27</b>
3.2.1 Oli.....	28
3.2.2 Zuccheri .....	28
3.2.3 Alcaloidi .....	29
3.2.4 Acido fitico e uronico .....	30
3.2.5 Saponine e composti fenolici .....	31
<b>3.3 LAVORAZIONE DEI LUPINI PER L'USO ALIMENTARE .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 EFFETTI DEL PROCESSO DI DEAMARIZZAZIONE DEI LUPINI .....</b>	<b>34</b>

<b>3.5</b>	<b>PROBLEMATICHE E OTTIMIZZAZIONE DEL PROCESSO PRODUTTIVO .....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>BIODEGRADABILITÀ DI ACQUE AD ALTO CONTENUTO DI ALCALOIDI.</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>SOSTANZE ASSOCIATE AD ACQUE RICCHE DI ALCALOIDI.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>STUDI PRECEDENTI SULLE ACQUE DEI LUPINI.....</b>	<b>42</b>
4.2.1	Caratterizzazione dei campioni sottoposti a prove di BMP .....	42
4.2.2	Risultati delle precedenti prove di BMP .....	44
<b>5</b>	<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>46</b>
<b>5.1</b>	<b>ORIGINE E PREPARAZIONE DEL SUBSTRATO.....</b>	<b>46</b>
<b>5.2</b>	<b>DESCRIZIONE DEI PRETRATTAMENTI.....</b>	<b>48</b>
5.2.1	Pretrattamento termico.....	48
5.2.2	Pretrattamento termo-basico .....	49
5.2.3	Pretrattamento termo-acido.....	50
5.2.4	Pretrattamento enzimatico .....	51
5.2.4.1	Caratteristiche dell'enzima selezionato .....	51
5.2.4.2	Impostazione del trattamento .....	51
<b>5.3</b>	<b>METODI ANALITICI.....</b>	<b>52</b>
5.3.1	Misure di COD .....	52
5.3.2	Determinazione dell'azoto ammoniacale.....	53
5.3.3	Determinazione dei solidi sospesi totali e solidi sospesi volatili .....	53
5.3.4	Misure svolte da altri operatori.....	54
<b>5.4</b>	<b>STIMA DELLA BIODEGRADABILITÀ DEI REFLUI .....</b>	<b>55</b>
<b>5.5</b>	<b>PROVE DI BMP .....</b>	<b>56</b>
5.5.1	Misura manometrica del BMP .....	56
5.5.1.1	Preparazione della prova .....	56
5.5.1.2	Caratteristiche dell'inoculo .....	57
5.5.1.3	Nutrienti .....	58
5.5.1.4	Rapporto F/M .....	59
5.5.1.5	pH e temperatura .....	59
5.5.1.6	Bianco.....	59
5.5.1.7	Durata della prova .....	60
5.5.1.8	Stima del metano prodotto.....	60
5.5.1.9	Commenti sul metodo manometrico.....	62
5.5.2	Misura volumetrica del BMP.....	63
5.5.3	Impostazione delle prove di BMP svolte .....	64
5.5.4	Specific Methanogenic Activity .....	68
<b>6.</b>	<b>RISULTATI: ESPOSIZIONE E INTERPRETAZIONE .....</b>	<b>69</b>
<b>6.1</b>	<b>PRIMO GRUPPO DI PROVE - TRATTAMENTO TERMICO.....</b>	<b>70</b>
6.1.1	Risultati dei BMP - Gruppo 1 .....	71
<b>6.2</b>	<b>SECONDO GRUPPO DI PROVE - TRATTAMENTO TERMO-BASICO.....</b>	<b>72</b>
6.2.1	Risultati dei BMP - Gruppo 2.....	74
6.2.2	Analisi sul digestato di fine prova .....	75

<b>6.3 TERZO GRUPPO DI PROVE - TRATTAMENTO TERMO -ACIDO .....</b>	<b>76</b>
6.3.1 Risultati delle prove manometriche di BMP - Gruppo 3 .....	77
6.3.2 Risultati delle prove volumetriche di BMP - Gruppo 3 .....	78
6.3.3 Misure di azoto ammoniacale e VFA .....	80
6.3.4 Stima dei solfati apportati dal pretrattamento .....	81
<b>6.4 QUARTO GRUPPO DI PROVE - TRATTAMENTO ENZIMATICO.....</b>	<b>81</b>
6.4.1 Risultati delle prove manometriche di BMP - Gruppo 4 .....	82
<b>6.5 QUINTO GRUPPO DI PROVE – TRATTAMENTI MISTI.....</b>	<b>85</b>
6.5.1 Risultati delle prove manometriche di BMP - Gruppo 5 .....	86
6.5.2 Analisi di COD e BOD sul surnatante .....	87
6.5.3 Stima del BMP con i due metodi - Campione portoghese .....	88
<b>6.6 RIEPILOGO E CONFRONTO DEI RISULTATI.....</b>	<b>90</b>
6.6.1 Confronto dei BMP sui campioni di acqua di cottura non trattata .....	92
<b>7. CONCLUSIONI.....</b>	<b>94</b>
<b>APPENDICE.....</b>	<b>102</b>
<b>1. CURVE CUMULATE DI BIOGAS.....</b>	<b>102</b>
1.1 Primo gruppo di prove – Pretrattamento termico .....	102
1.2 Secondo gruppo di prove- Pretrattamento termo – basico .....	103
1.3 Terzo gruppo di prove- Pretrattamento termo – acido.....	104
1.4 Quarto gruppo di prove- Pretrattamento enzimatico .....	105
1.5 Quinto gruppo di prove- Pretrattamenti misti .....	106
<b>2. STIMA SOLFATI E ACIDO SOLFIDRICO .....</b>	<b>107</b>

## ABSTRACT

Nel presente lavoro si è indagato l'effetto di alcuni pretrattamenti sulla biodegradabilità anaerobica di acque generate dal processo di lavorazione dei lupini. Tali acque contengono diversi composti organici e inorganici tra cui composti azotati e alcaloidi: questi ultimi sono contenuti nei lupini e rimossi per evitare problemi di tossicità nell'essere umano ma, se recuperati, possono essere impiegati in altri ambiti quali quello farmaceutico. Il contenuto organico di tali acque potrebbe essere ridotto tramite una fase di digestione anaerobica che al contempo permetterebbe di generare biogas e dunque produrre energia. A tale scopo già in passato è stata indagata la biodegradabilità di tali reflui mostrando valori piuttosto limitati pertanto in questo lavoro si è deciso di testare l'effetto di pretrattamenti di tipo termico, termo-chimico ed enzimatico per valutare eventuali miglioramenti in termini di biodegradabilità. Le acque utilizzate per i test derivano dalla fase di cottura dei lupini e sono state prodotte in laboratorio seguendo la stessa procedura di cottura effettuate in ditta.

Il pretrattamento termico è avvenuto combinando due temperature (80 °C e 100 °C) con due durate (30 e 60 minuti) mostrando un incremento massimo del BMP pari a + 13.4% per il campione pretrattato a 80 °C per 60 minuti. I trattamenti termo-chimici sono avvenuti con gli stessi parametri di tempo e durata del trattamento termico ma i campioni sono stati prima portati a pH basici (pH= 9.2) o acidi (pH=4.0) tramite uso di NaOH e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'attacco termo-acido non ha mostrato effetti sui valori di BMP rispetto al campione non trattato mentre il trattamento termo-basico ha apportato un incremento massimo pari a +12.5% per il campione trattato 30 minuti a 80 °C. Un ulteriore campione trattato solo chimicamente con NaOH (pH =11) ha mostrato un incremento sulla biodegradabilità pari a +11.2%. Infine, i pretrattamenti enzimatici a base di proteasi, volti a idrolizzare eventuali macromolecole quali le proteine, hanno causato una diminuzione del contenuto proteico dei campioni, mostrando effetti crescenti con la durata del contatto con l'enzima ma senza apportare effetti rilevanti sulla biodegradabilità. Le due dosi utilizzate (11 U/ g COD e 571 U/ g COD) non hanno mostrato differenze di risultato a parità di durata del trattamento.

Nel complesso i massimi valori di biodegradabilità raggiunti non superano il 70% mentre l'acqua di cottura non trattata ha mostrato biodegradabilità variabile tra il 54.4% e il 65.9%. Tali risultati sono più probabilmente attribuibili a sostanze difficili da biodegradare piuttosto che a problemi di inibizione del processo, come dimostrato da misure di BOD fatte sul campione tal quale che evidenziano un rapporto BOD/COD poco superiore al 70%.

# 1. INTRODUZIONE

La presente tesi si inserisce all'interno di un progetto europeo denominato "Biorg4WasteWaterVal+" ed ha come obiettivo quello di studiare la biodegradabilità anaerobica delle acque reflue che derivano dal processo di lavorazione dei lupini.

Fino a poco tempo fa l'acqua veniva considerata come un bene inesauribile e gratuito pertanto il suo impiego è sempre avvenuto senza porre particolare attenzione al consumo che se ne faceva. Tale idea ha portato ad avere nell'industria alimentare, e non solo, dei processi produttivi che facevano dell'acqua sia un uso diretto che indiretto ma quasi mai ottimizzato. Oggigiorno, grazie alle nuove norme riguardo l'uso e il rilascio in ambiente dell'acqua utilizzata in ambito industriale la situazione sta cambiando e si ha una maggiore consapevolezza riguardo alla natura limitata di questo bene. La sfida di questi anni non è soltanto limitata ad un uso più efficiente dell'acqua ma piuttosto ad un'ottimizzazione dei processi produttivi per la minimizzazione e valorizzazione di "scarti della produzione" che, come per le acque reflue, prima di rappresentare un rifiuto, possono costituire una risorsa.

Nell'industria alimentare uno dei processi di lavorazione a maggior consumo di acqua è la lavorazione del lupino. Lo scopo di questo lavoro è approfondire la possibilità di valorizzazione delle acque di scarto prodotte dalla lavorazione dei lupini in modo da sfruttare le potenzialità energetiche e facilitarne lo smaltimento. A tal fine nel Capitolo 2 verrà approfondito il processo anaerobico e i possibili pretrattamenti applicabili ai reflui di lavorazione dei lupini.

Al fine di comprendere al meglio la dinamica dei processi in gioco ed impostare correttamente la fase sperimentale, nel Capitolo 3 verrà discussa la composizione dei lupini e le sostanze che è possibile trovare nelle acque derivanti dal processo lavorativo in modo da avere un quadro completo di tutte le componenti che potrebbero in qualche modo influire sulla degradabilità. Tali informazioni saranno lette in relazione alle conoscenze finora acquisite riguardo al processo di degradazione anaerobica mirando ad ottimizzare le condizioni di processo che massimizzano la produzione di metano.

Per una corretta comprensione della fase sperimentale, al paragrafo 4.2 verranno riassunti i risultati finora ottenuti nell'ambito del progetto in cui tale studio si inserisce, punto di partenza per la fase sperimentale svolta nel corso della presente tesi.



Seguirà dunque la descrizione dell'attività sperimentale vera e propria (Capitolo 5) con la descrizione dei pretrattamenti chimici ed enzimatici a cui i reflui sono stati sottoposti al fine di migliorarne la biodegradabilità e i metodi impiegati per la stima della stessa.

I pretrattamenti a cui i campioni sono stati sottoposti risultano i seguenti:

- Pretrattamento termico
- Pretrattamento termo-basico
- Pretrattamento termo-acido
- Pretrattamento enzimatico

mentre per stimarne la biodegradabilità sono state svolte delle prove di BMP (Biochemical Methane Potential) attraverso un sistema manometrico di misura, successivamente confrontato con il metodo volumetrico attraverso l'uso degli strumenti di misura AMPTS (Automatic Methane Potential Test System) prodotto da Bioprocess Control.

Infine, nel Capitolo 6, saranno presentati e discussi i risultati delle elaborazioni dei dati raccolti durante le prove. Saranno indagati innanzitutto gli effetti dei trattamenti a cui i campioni sono stati sottoposti e dunque i risultati delle prove e gli incrementi di biodegradabilità rispetto ai campioni non trattati.

## 2 DIGESTIONE ANAEROBICA

### 2.1 GENERALITÀ

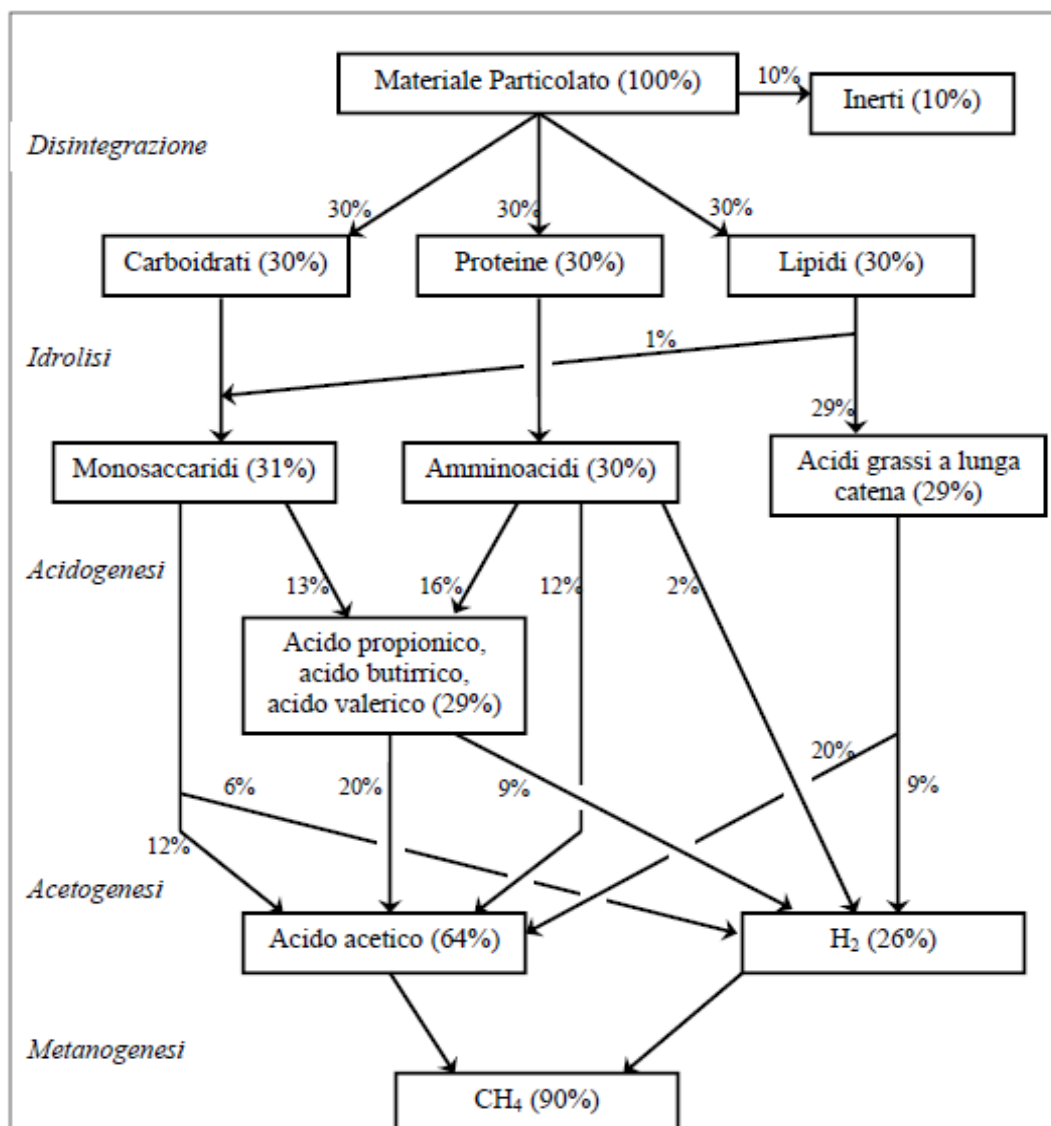
La digestione anaerobica è un processo biochimico effettuato in condizioni di anaerobiosi che permette la rimozione della sostanza organica presente in un refluo con lo scopo di depurarlo, stabilizzarlo e produrre biogas che potrà essere impiegato come fonte alternativa per la generazione di energia elettrica. L'interesse nei confronti di questo processo è cresciuto negli ultimi anni grazie anche agli incentivi sulla produzione di energia elettrica da biogas e ciò ha portato ad un aumento degli impianti di digestione anaerobica sul territorio italiano.

La degradazione della sostanza organica avviene in più fasi consecutive e viene svolta da diversi ceppi batterici ognuno dei quali esercita un ruolo ben definito nella dinamica globale del processo. L'efficienza della digestione anaerobica è dunque garantita se il processo viene svolto nelle condizioni di lavoro ottimali. Tali condizioni, in base al substrato da degradare, dovranno essere mirate a massimizzare la degradabilità e l'attività delle comunità batteriche coinvolte. I fanghi sottoposti a digestione possono avere diverse origini, in genere sono fanghi primari civili oppure fanghi di origine industriale, soprattutto di tipo alimentare i quali sono caratterizzati da un'alta putrescibilità e dunque necessitano di essere stabilizzati attraverso la rimozione del contenuto organico. Prima che il processo venga svolto a grande scala è necessario verificare in laboratorio che la matrice che si intende trattare sia effettivamente biodegradabile e che il contenuto di carbonio presente sia abbastanza da garantire una produzione di metano sufficientemente elevata. In genere la rimozione della sostanza organica è compresa tra il 50% e il 90% e dipende dalla composizione e dalla percentuale di sostanze rapidamente biodegradabili. Substrati a base di zuccheri semplici si degradano facilmente mentre matrici a base di cellulosa e lignina sono più difficili da degradare e spesso necessitano di essere pretrattate chimicamente per poter essere degradate. La conversione della sostanza organica conduce alla produzione di una miscela di gas definita biogas la quale contiene principalmente metano (50%-70%) ed anidride carbonica. È importante conoscere la percentuale di metano presente rispetto al totale del biogas per avere un'idea effettiva dell'energia lorda che si può ottenere dalla matrice degradata.

### 2.2 FASI DEL PROCESSO

Il processo può essere suddiviso in una serie di fasi durante le quali a partire dal materiale particolato e passando per molecole più semplici si giunge alla produzione di biogas (figura

2.1). Il metabolismo anaerobico si basa su reazioni che sfruttano la stessa sostanza organica come accettore finale di elettroni pertanto la presenza di accettori esterni quali ossigeno, nitrati o solfati potrebbe portare ad una minore produzione di metano. In tal modo durante la serie di reazioni svolte dai microrganismi il carbonio organico passa da diversi stati di ossidazione fino a giungere alla sua forma più ossidata, rappresentata dall'anidride carbonica ( $C^{+4}$ ), e a quella più ridotta come metano ( $C^{-4}$ ). L'intero processo di degradazione è portato avanti da vari ceppi batterici ognuno dei quali ha un ruolo ben definito nella demolizione della sostanza organica. Ogni consorzio batterico produce infatti cataboliti che fungono da substrato per la popolazione successiva nella catena trofica. La tipologia di substrato determina la reazione limitante dell'intero processo: per substrati lentamente biodegradabili la fase limitante è l'idrolisi mentre per substrati rapidamente biodegradabili la reazione più lenta risulta la metanogenesi (Ficara et al,2014).



**Figura 2.1-** Flusso di massa della sostanza organica durante le fasi del processo anaerobico (Ficara et al,2014).

## 2.2.1 Idrolisi

L'idrolisi rappresenta la prima fase del processo e consiste nella riduzione a molecole più semplici di molecole organiche complesse quali proteine, carboidrati e lipidi che vengono quindi convertite rispettivamente in amminoacidi, monosaccaridi e acidi grassi a lunga catena. Questi ultimi sono molecole di dimensioni minori e solubili in acqua, capaci dunque di attraversare la membrana cellulare ed essere facilmente metabolizzate dai batteri acidogeni che operano nelle fasi successive.

Essendo l'idrolisi la prima fase della digestione anaerobica essa può spesso rappresentare il processo limitante specialmente nei casi di substrati strutturalmente complessi. Vale il contrario in presenza di substrati facilmente idrolizzabili, in tale situazione potrebbe verificarsi un accumulo di VFA (Volatile Fatty Acids, acidi grassi volatili) e la fase limitante diventa la metanogenesi.

I batteri idrolitici possono colonizzare il substrato e degradarlo oppure produrre enzimi extracellulari che permettono l'idrolisi delle molecole complesse, reazione descrivibile attraverso una cinetica del primo ordine:

$$r = k \cdot X_s \quad (2.1)$$

dove:

$r$  è il tasso di idrolisi del substrato ( $\text{g m}^{-3} \text{d}^{-1}$ );

$X_s$  è la concentrazione di substrato ( $\text{g m}^{-3}$ );

$k$  è la costante di primo ordine ( $\text{d}^{-1}$ );

La velocità di idrolisi varia in funzione del substrato e di altri parametri quali la temperatura e il pH. In genere i lipidi sono i più lenti ad essere idrolizzati ( $k$  compresa tra 0.1 e 0.7  $\text{d}^{-1}$ ) mentre i carboidrati hanno costanti di idrolisi che arrivano fino a 2  $\text{d}^{-1}$ . Non tutte le sostanze sono idrolizzabili e nei casi di biomassa lignocellulosica è quasi sempre necessario effettuare dei pretrattamenti sul substrato prima di sottoporlo a digestione anaerobica. L'idrolisi è generalmente favorita in situazioni di termofilia e a pH vicini alla neutralità ma tali parametri possono variare di caso in caso (Meegoda et al, 2018).

### 2.2.2 Acidogenesi

I prodotti della degradazione idrolitica vengono convertiti dai batteri acidogeni in VFA, composti soprattutto da acido propionico, valerico e butirrico. Parallelamente, dagli acidi grassi a catena lunga viene prodotto anche acido acetico.

L'acidogenesi non risulta essere una fase limitante del processo ma anzi è una delle reazioni più veloci e la sua cinetica viene descritta dalla relazione di Monod:

$$r = k_{max} \cdot x \cdot \frac{S}{S + k_s} \quad (2.2)$$

dove:

$r$  è la velocità di conversione del substrato ( $\text{g m}^{-3} \text{d}^{-1}$ );

$k_{max}$  è la velocità massima di crescita ( $\text{d}^{-1}$ );

$x$  è la concentrazione della biomassa acidogena ( $\text{g m}^{-3}$ );

$S$  è la concentrazione del substrato ( $\text{g m}^{-3}$ );

$k_s$  è l'indice di semisaturazione del substrato ( $\text{g m}^{-3}$ );

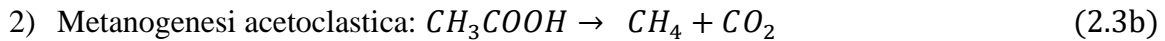
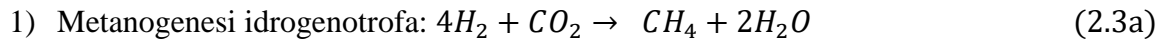
### 2.2.3 Acetogenesi

Durante questa fase i VFA prodotti nella fase precedente vengono convertiti in acido acetico, sostanza che può successivamente essere trasformata in metano. L'acido acetico viene anche in parte prodotto dagli acidi grassi a lunga catena senza passare per fasi intermedie ma la maggior parte di esso viene comunque ricavato dalla conversione degli acidi grassi volatili. Contemporaneamente si ha anche la produzione di  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$ .

La produzione e il consumo di idrogeno in tale fase gioca un ruolo fondamentale per l'efficienza della digestione anaerobica. Elevate concentrazioni di idrogeno causano infatti un aumento della pressione parziale e ciò influisce negativamente sulla produzione di metano (Meegoda et al, 2018). Tale fenomeno è evitabile se il reattore viene mantenuto ad un giusto livello di miscelazione: la coesistenza di batteri idrogeno produttori e idrogeno consumatori fa sì che si crei nel reattore una simbiosi tale da mantenere l'idrogeno a basse concentrazioni. Anche questa fase è descritta da una cinetica tipo Monod ma risulta più lenta rispetto l'acidogenesi. Un'elevata concentrazione di acidi grassi volatili e basse concentrazioni di acido acetico sono indice di rallentata o inibita acetogenesi.

## 2.2.4 Metanogenesi

Essa è la fase finale di tutto il processo. Il metano può essere prodotto sia dall'idrogeno sia dall'acido acetico generati nelle fasi precedenti:



Dalla reazione (2.3a) viene prodotto circa un terzo del metano, la restante parte viene generata dai metanigeni acetoclastici i quali appartengono principalmente ai generi *Methanosarcina* e *Methanosaeta*. I microrganismi metanigeni sono anaerobi obbligati e richiedono valori di pH più elevati rispetto alle fasi precedenti. L'attività metanigena è infatti favorita a pH tra 6.8 e 8.2 con valori ottimali tra 7 e 7.5, a differenza delle fasi di acidogenesi e acetogenesi che sono favorite a pH di circa 5.5 (Speece,1996). La crescita dei microrganismi metanigeni è descritta da una cinetica di tipo Monod e risulta essere la più lenta tra le varie popolazioni batteriche che operano in un digestore anaerobico. L'elevata sensibilità di tali batteri e il lungo tempo di rigenerazione, variabile tra i 5 e i 16 giorni, rendono la metanogenesi una fase estremamente delicata il cui blocco richiederebbe lunghi tempi di ripartenza con conseguente interruzione della produzione di energia da metano (Meegoda et al, 2018).

## 2.3 PARAMETRI CHE INFLUENZANO IL PROCESSO

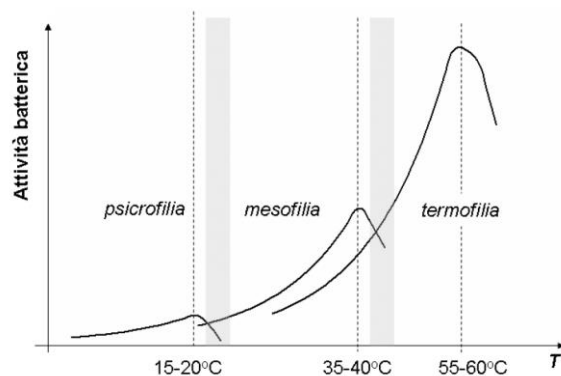
### 2.3.1 Temperatura

La digestione anaerobica può essere svolta in diverse condizioni di temperatura le quali influenzano sia il metabolismo batterico sia il tipo di batteri presenti:

- Condizioni psicrofile tra 4 -15 °C;
- Condizioni mesofile tra 20 -40 °C
- Condizioni termofile tra 45 -70 °C.

Per i batteri operanti in digestione anaerobica la crescita batterica aumenta al crescere della temperatura pertanto le condizioni di temperatura più usate sono quelle mesofile e termofile (figura 2.2). Le condizioni di psicrofilia risultano invece più lente e dunque di limitata applicazione. Uno dei vantaggi di lavorare in termofilia è la possibilità di alimentare il reattore con un carico organico maggiore dal momento che tali condizioni velocizzano la resa di

degradazione pertanto la fase di idrolisi viene svolta con un rateo superiore. Non ci sono però sostanziali differenze sull'efficienza di biodegradazione finale: secondo molti studi infatti le condizioni di mesofilia e termofilia presentano un'analogia produzione finale di metano anche se riguardo tale argomento esistono pareri discordanti (Ficara et al, 2014).



**Figura 2.2** - Effetto della temperatura sul processo di digestione anaerobica e campi in cui il processo non risulta efficiente (Ficara et al, 2014).

### 2.3.2 pH

Le fasi della digestione anaerobica presentano diversi valori di pH ottimale di lavoro dal momento che ognuna di esse viene svolta da diverse tipologie di batteri pertanto esso rappresenta uno dei fattori più critici da monitorare e controllare al fine di evitare l'inibizione del processo.

I batteri acidogeni e acetogeni lavorano preferibilmente a pH acidi con valori ottimali intorno a 5-5.5 mentre i batteri metanigeni presentano valori ottimali tra 7 e 7.5 anche se la loro attività può svolgersi in un range più ampio tra 6.8 e 8.2 (Speece,1996). Questi ultimi sono molto sensibili a variazioni di pH: la produzione di metano diminuisce al decrescere del pH e viene completamente inibita per pH inferiori a 6 con tempi di recupero dell'attività, al ristabilimento di adeguate condizioni di pH, dell'ordine delle settimane.

Al fine di non incorrere in riduzioni di pH è necessario limitare il carico organico in ingresso al reattore evitando così l'accumulo di acidi grassi volatili. È importante però anche garantire un adeguato contenuto di alcalinità il cui effetto è quello di contrastare riduzioni di pH. Un parametro utile a tal scopo è il rapporto tra alcalinità e acidi volatili presenti, il cui valore nel caso della digestione dei fanghi deve essere non inferiore a 3.5 g CaCO<sub>3</sub>/g CH<sub>3</sub>COOH (Ficara et al,2014).

### 2.3.3 Ammoniaca e solfuro

Le principali forme di azoto inorganico presenti nei reflui sono l'ammoniaca libera ( $\text{NH}_3$ ) e lo ione ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) il cui equilibrio è descritto dalla relazione 2.4. Tra le due forme, l' $\text{NH}_3$  risulta essere quella più tossica nei confronti dell'attività batterica: essa infatti si comporta come una base debole ed è capace di attraversare la parete cellulare dei microrganismi bloccandone la loro attività metabolica. Le principali fonti di  $\text{NH}_3$  sono i composti organici azotati presenti nei reflui da trattare, in particolare costituiti da proteine e urea e tra le varie specie batteriche presenti, i metanigeni risultano essere quelli più sensibili alla presenza di  $\text{NH}_3$  (Chen et al, 2008).

Concentrazioni di ammoniaca sotto i 200 mg/L non risultano problematiche per il processo ma anzi presentano effetti benefici dal momento che l'azoto è uno dei nutrienti richiesti dai microrganismi (Chen et al, 2008). Sebbene non vi siano valori precisi di concentrazione inibente, secondo molti studi concentrazioni di ammoniaca libera superiori a 500 mg/L possono limitare l'attività metanigena e tale fenomeno risulta accentuato quando si lavora in condizioni di termofilia dal momento che l'ammoniaca libera aumenta all'aumentare della temperatura e del pH (Ficara et al, 2014):

$$\frac{[\text{NH}_3\text{-N}]}{[\text{NH}_4^+\text{-N}]} = \frac{10^{\text{PH}}}{e^{\frac{6344}{273+T}}} \quad (2.4)$$

Altro possibile fattore inibente in condizioni anaerobiche sono i solfati i quali vengono usati come accettori di elettroni e ridotti da solfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) a solfuro ( $\text{S}^{2-}$ ). In tal caso l'inibizione avviene in due stadi: inizialmente vi è competizione di substrato dovuta ai batteri SRB (Sulphate Reducing Bacteria) i quali consumano il substrato organico che quindi non verrà convertito in metano, successivamente l'inibizione è dovuta alla tossicità del solfuro nei confronti dei ceppi batterici operanti nelle varie fasi della digestione (Chen et al, 2008). Per l'idrogeno solforato ( $\text{H}_2\text{S}$ ) la letteratura riporta valori di inibizione a partire da 200 mg/L (Ficara et al, 2014).



#### 2.3.4 Ioni metallici

Secondo molti studi alte concentrazioni di sali causano un'elevata pressione osmotica e la disidratazione delle cellule batteriche. Tale tossicità è associata prevalentemente a cationi metallici quali sodio, potassio, magnesio e calcio i quali possono essere giù presenti nel refluo trattato anaerobicamente oppure essere immessi successivamente ad esempio come correttori di pH o nutrienti esterni (Chen et al, 2008).

##### 2.3.4.1 Sodio

Il sodio causa un'inibizione moderata-forte passando da 3.5- 4.5 a 8 g/L (Ficara et al,2014). L'effetto inibente è maggiormente sentito dai batteri consumatori di acido propionico piuttosto che dai consumatori di acido acetico (Chen et al, 2008). L'utilizzo di bicarbonato di sodio come correttore di pH va effettuato adeguatamente per limitare elevate concentrazioni di Na<sup>+</sup>.

##### 2.3.4.2 Calcio

Il calcio è essenziale per la crescita dei microrganismi ma eccessive quantità di ione Ca<sup>2+</sup> possono provocare effetti indesiderati sul processo anaerobico quali precipitazione di carbonati e fosfati e dunque intasamento delle tubazioni e incrostazione del reattore, consumo di alcalinità e ridotta attività metanogenica. Gli studi riguardo gli effetti negativi del calcio sono in parte contrastanti ma si è osservato che concentrazioni fino a 200 mg/L di Ca<sup>+</sup> non risultano problematiche mentre concentrazioni tra 2.5- 4 g/L potrebbero causare una moderata inibizione per giungere a forte inibizione per concentrazioni di 8 g/L (Chen et al, 2008).

##### 2.3.4.3 Potassio

Alte concentrazioni di potassio hanno effetti negativi sui microrganismi: esse possono infatti portare al flusso passivo di ioni di potassio e conseguentemente alla neutralizzazione del potenziale di membrana (Chen et al, 2008). Concentrazioni fino a 400 mg/L non sembrano avere effetti inibenti sul processo mentre a concentrazioni superiori la tossicità aumenta soprattutto se si lavora in condizioni termofile.

##### 2.3.4.4 Magnesio

Anche un'elevata concentrazione di ioni Mg<sup>2+</sup> può avere effetti tossici sui microrganismi. Non esistono limiti precisi per effetto dell'acclimatazione batterica ma valori superiori a 1 g/L possono provocare effetti inibenti (Ficara et al,2014).

## 2.4 TIPOLOGIE DI PRETRATTAMENTI

### 2.4.1 Generalità

La biodegradabilità dei substrati sottoposti a digestione anaerobica dipende principalmente dall'origine e dalla composizione dello stesso. Proteine, lipidi e carboidrati sono generalmente biodegradabili ma è importante che il substrato introdotto nel digestore sia effettivamente disponibile alle prime fasi del processo pertanto risultano necessarie in molti casi azioni meccaniche di riduzione della pezzatura fino a pochi millimetri. Pezzature fini influiscono positivamente sulla velocità di idrolisi ma non ci sono evidenze scientifiche riguardo possibili benefici sul valore finale di biodegradazione di una certa matrice (Ficara et al, 2014). Nella classe di pretrattamenti fisici rientrano processi quali la macinatura, il trattamento con acqua calda liquida, l'esplosione a vapore, l'estrusione e l'irradiazione (Zheng et al, 2014). L'effetto di tali trattamenti oltre alla riduzione della pezzatura consiste nel ridurre la cristallinità della matrice ed aumentare la superficie specifica favorendo così il contatto tra substrato e microrganismi (Ariunbaatar et al, 2014).

In altri casi al fine di migliorare la biodegradabilità di una certa matrice sono necessarie azioni più complesse e che richiedono non solo pretrattamenti fisici ma anche chimici, biologici o enzimatici. La cellulosa ad esempio, degradabile anaerobicamente, quando si trova legata alla lignina diventa di difficile accessibilità ai batteri e richiede lunghi tempi di degradazione prima che i legami costituenti si rompano (Ficara et al, 2014). L'uso di pretrattamenti più complessi è dunque essenziale nei casi di matrici lignocellulosiche al fine di solubilizzare l'emicellulosa, rimuovere la lignina ed esporre le fibre di cellulosa all'idrolisi (Costa et al, 2014).

Nei prossimi paragrafi verranno pertanto approfonditi i pretrattamenti di tipo termico, termochimico ed enzimatico. In tabella 2.1 vengono raccolti alcuni studi svolti su diverse tipologie di matrici sottoposte a tali pretrattamenti, utili per avere un quadro iniziale dei parametri di trattamento e per visualizzare gli effetti riscontrati sulla produzione di metano, sulla solubilizzazione del COD (Chemical Oxygen Demand) e sull'idrolisi di alcune componenti della matrice impiegata.

**Tabella 2.1** – Lista di pretrattamenti effettuati su diverse matrici con relativi effetti sul BMP e sul COD solubile.

<b>Autore</b>	<b>Tipologia matrice</b>	<b>Trattamento</b>	<b>Effetti riscontrati</b>
Liu et al. (2011)	Fanghi attivi (WAS)	175 °C - 60 minuti.	35 °C: + 34.8% CH <sub>4</sub> prodotto
	Rifiuti da cucina (KW)	175 °C - 60 minuti.	35 °C: -7.9% CH <sub>4</sub> prodotto
	Residui da frutta e verdura (VFR)	175 °C - 60 minuti.	35 °C: -11.7% CH <sub>4</sub> prodotto
Rafique et al. (2010)	Letame di maiale	100 °C - 1 ora.	+ 25% CH <sub>4</sub> prodotto
Barjenbruch & Kopplow (2003)	Fango primario misto	121 °C - 1 ora.	36 °C: +20% sul BMP
Bochmann et al. (2015)	Cereali esausti usati per la birra	140 °C - 15 minuti.	37 °C: +27.8% sul BMP
Li et al. (2007)	Fanghi attivi (WAS)	NaOH: da 0.05 a 1.0 mol/L Durata 24 ore.	sCOD: incremento da 275 mg/L a circa 5 g/L (1 mol/L di NaOH)
		Ca(OH) <sub>2</sub> : da 0.02 a 0.5 mol/L Durata 24 ore.	sCOD: incremento da 275 mg/L a 1,375 g/L (0,02 mol/L di Ca(OH) <sub>2</sub> ) nei primi 30 minuti
Monlau et al, (2014)	Gambi di girasole	4 g NaOH/100 g TS, 55 °C per 24 ore.	Incremento produzione CH <sub>4</sub> : +26%
Sambusiti et al, (2013)	Insilato di sorgo	10 g NaOH/100 g TS, 40 °C per 24 ore.	Incremento produzione CH <sub>4</sub> : +25%
		0,092 g NaOH/g TS, 35 °C per 24 ore.	sCOD: +108,2%
Zhao et al (2011)	Residui da cucina (KW)	0,083 g HCl/g TS, 35 °C per 24 ore.	
Badshah et al (2012)	Bagassa da canna da zucchero	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2%), 121 °C per 15 minuti.	Idrolizzato il 36% degli zuccheri polimerici
		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2%) + Accelerase 1500 (3,5 %, 72 ore).	Conversione carboidrati: 43% Produzione CH <sub>4</sub> : +16% rispetto trattamento acido
Moon et Song (2011)	Rifiuti organici (Food Waste)	Carboidrasi, proteasi e lipasi (1:2:1) 0.2% w/w FW, 10 ore.	Solubilizzazione COD:62% Riduzione SSV: 61%

## 2.4.2 Pretrattamento termico

Il trattamento termico rientra nella categoria dei pretrattamenti fisici di cui fanno parte anche i trattamenti ad ultrasuoni, a microonde e meccanici. Lo scopo di questi pretrattamenti è quello di modificare la struttura morfologica delle sostanze e di favorire l'idrolisi e la solubilizzazione della materia organica in esse contenuta (Ma et al, 2018).

Il trattamento termico è uno dei trattamenti più semplici e più studiati e in molti casi è stato già impiegato a grande scala date le sue potenzialità e benefici. Esso consiste nel far avvenire l'idrolisi termica sulla matrice per effetto della temperatura a cui si decide di operare. Come principale effetto del trattamento si ha la solubilizzazione di composti organici quantificati come COD e tale effetto risulta direttamente correlato alla temperatura di processo. Per avere un'alta solubilizzazione di COD è opportuno lavorare ad alte temperature oppure a temperature inferiori ma aumentando la durata del trattamento (Ariunbaatar et al, 2014).

Sulla base degli studi precedenti, riguardanti l'applicazione del pretrattamento su matrici di origine alimentare o agricola, è possibile individuare il campo di lavoro ottimale per i parametri sopra citati.

### 2.4.2.1 *Trattamento ad alte temperature*

I trattamenti appartenenti a tale categoria sono effettuati a temperature oltre i 100 °C ma comunque non superiori a 250 °C, valore da evitare dal momento che a temperature così elevate si verificano reazioni indesiderate di pirolisi (Hendriks & Zeeman, 2008). La solubilizzazione dell'emicellulosa e della lignina avviene a temperature di circa 150 °C. Dall'idrolisi dell'emicellulosa vengono inoltre rilasciati acidi che fungono da catalizzatori e che incrementano ulteriormente il processo di solubilizzazione della stessa (Gregg and Saddler citati da Hendriks & Zeeman, 2008).

In diversi studi tra cui quelli sopra citati si è visto che temperature sopra i 170 °C non risultano avere effetti benefici sulla biodegradabilità finale del refluo e dunque sulla produzione di metano. Al contrario la solubilizzazione della lignina a temperature superiori a 160 °C può portare al rilascio di composti fenolici che possono inibire il processo anaerobico (Hendriks & Zeeman, 2008).

Nello studio di Liu et al. (2011) effettuato su matrici di origine alimentare ed agricola la produzione di metano successiva al pretrattamento termico svolto a 175 °C per 90 minuti non

ha subito incrementi ma anzi vi è stata una diminuzione dovuta alla formazione di melanoidine, macromolecole ad alto peso molecolare che in genere si formano a partire dagli zuccheri e dalla loro interazione con gli amminoacidi attraverso le reazioni di Maillard (Ariunbatar et al, 2014). Tali reazioni sono favorite a pH basici, si sviluppano in genere a temperature superiori a 140 °C oppure a basse temperature (inferiori a 100 °C) ma per tempi di trattamento prolungati e portano alla formazione di composti poco biodegradabili.

Nello studio di Rafique et al. (2010) su letame di maiale sottoposto a pretrattamento termico a 110 °C la diminuzione della resa di metano è stata attribuita alle stesse reazioni di Maillard che, in aggiunta, conferiscono al substrato un colore più scuro. Un ulteriore svantaggio dei trattamenti ad alte temperature è il fatto che essi possano portare alla distruzione dei solidi volatili e diminuire quindi la quantità di substrato organico disponibile al processo anaerobico (Meegoda et al, 2018).

È dunque preferibile non lavorare ad alte temperature sia per i possibili effetti negativi che si possono sviluppare sia dal punto di vista energetico ed ambientale visto che un processo termico ad alte temperature richiederebbe costi energetici difficili da recuperare con la sola produzione di metano.

#### *2.4.2.2 Trattamento a basse temperature*

In tale categoria ricadono i trattamenti termici effettuati a temperature inferiori a 100 °C. Secondo vari studi i trattamenti a basse temperature hanno un effetto meno marcato sulla solubilizzazione del COD rispetto alle alte temperature ma comunque inducono la deflocculazione di macromolecole (Protot et al. citati da Ariunbaatar et al, 2014). Altri studi invece affermano che anche in tali condizioni avviene la solubilizzazione delle proteine e la scomposizione di carboidrati (Neyens & Bayens citati da Ariunbaatar et al, 2014). In uno studio condotto da Appels et al. su fanghi provenienti da un impianto di depurazione in Belgio sono state testate 3 diverse temperature e per ognuna di esse una durata variabile da 15 minuti a 60 minuti. La sperimentazione ha dimostrato come la solubilizzazione di composti organici e inorganici avvenga con efficacia e aumenti all'aumentare della temperatura e della durata: sul fango trattato a 90 °C per 60 minuti il biogas prodotto ha subito un incremento pari a 20 volte rispetto al biogas ottenuto dal fango non trattato (Appels et al, 2010).

Un effetto che invece è comune ai trattamenti ad alte e a basse temperature è l'efficacia nell'abbattimento della carica patogena, la riduzione della viscosità e dell'umidità dei fanghi trattati (Liu et al., 2011).

### 2.4.3 Pretrattamento chimico

I trattamenti chimici prevedono l'impiego di reagenti quali basi, acidi e liquidi ionici con lo scopo di favorire l'idrolisi (Ma et al, 2018). I vantaggi dei pretrattamenti chimici rispetto quelli fisici consistono principalmente nel minor dispendio energetico che essi richiedono e nella loro semplicità di processo ma possono esserci anche degli aspetti negativi quali la generazione di cattivi odori, la solubilizzazione di COD non biodegradabile e la formazione di altre sostanze non desiderate. Molto spesso l'utilizzo di acidi o basi viene combinato con il trattamento termico effettuando così trattamenti termochimici che permettono una buona solubilizzazione di COD e consentono di lavorare a temperature meno elevate rispetto quelle del trattamento esclusivamente termico. Il pretrattamento alcalino con idrossido di sodio (NaOH) è generalmente quello più utilizzato. La durata dei trattamenti chimici può variare dai 30 minuti fino anche all'ordine dei giorni.

#### 2.4.3.1 *Trattamento basico*

Il trattamento alcalino utilizza basi quali NaOH,  $\text{Ca(OH)}_2$ , KOH con lo scopo di rimuovere la lignina, l'emicellulosa e la cellulosa ed aumentare quindi la biodegradabilità della matrice trattata. Le prime reazioni che hanno luogo durante il trattamento alcalino sono la solvatazione e la saponificazione e gli effetti finali consistono nella rottura dei legami tra lignina ad altri polimeri, aumento della porosità e della superficie specifica e riduzione della cristallinità e del grado di polimerizzazione del substrato (Zheng et al, 2014). Uno svantaggio di tale trattamento è la possibilità di rilascio di sottoprodotti o sostanze che possono risultare inibitori nei confronti dei microrganismi quali ad esempio un eccessivo contenuto residuo di ioni  $\text{Na}^+$  nell'effluente del digestore, causa di tossicità nei confronti dei batteri metanigeni e di un'eccessiva salinità nei suoli (Zheng et al, 2014).

Nello studio di Zhao et al. (2011) su residui da cucina è stato testato l'effetto della soda e dell'acido cloridrico sulla solubilizzazione di COD, zuccheri e proteine facendo variare il pH da 2 a 13 e mantenendo la matrice a 35 °C per 24 ore. I risultati hanno riportato un evidente effetto di solubilizzazione sui tre parametri misurati e nel caso del trattamento alcalino a pH pari a 13 l'incremento risulta maggiore sia rispetto il campione non trattato (pH=7.5) sia rispetto il campione trattato a pH acidi con conseguente incremento della produzione di idrogeno.

Il pretrattamento alcalino (10 g NaOH/100 g TS) ha riportato anche sul sorgo effetti benefici quali l'incremento della produzione di metano e il mantenimento di livelli accettabili di alcalinità nel reattore senza causare problemi di inibizione da ioni  $\text{Na}^+$  (Sambusiti et al, 2013).

In uno studio su gambi di girasole, oltre alla solubilizzazione del COD e all'incremento del contenuto di solidi volatili è stata riscontrata anche la solubilizzazione di acido uronico e composti fenolici. Questi ultimi vengono generati a partire dalla rimozione della lignina e possono risultare inibenti nei confronti dei microrganismi operanti nel processo anaerobico (Monlau et al, 2014).

Li et al (2007) ha studiato l'effetto del trattamento alcalino tramite soda e idrossido di calcio testando varie dosi. Tra i due reagenti la soda è risultata la più performante sebbene anche l'idrossido di calcio abbia avuto evidenti effetti sulla solubilizzazione del COD. Secondo le analisi effettuate ne è risultato inoltre che la solubilizzazione avviene in due fasi: nei primi 30 minuti del trattamento viene solubilizzato circa il 60% - 70% del COD complessivamente solubilizzato mentre la restante parte viene rilasciata fino al raggiungimento delle 24 ore di trattamento.

#### *2.4.3.2 Trattamento acido*

L'uso di pretrattamenti acidi per incrementare la produzione di biogas può avvenire combinando acidi concentrati e basse temperature (40 °C) oppure acidi diluiti ed alte temperature (> 100 °C). Quest'ultima opzione è quella preferita dal punto di vista economico dal momento che l'uso di acidi concentrati risulta costoso e pertanto richiederebbe il recupero dei reagenti impiegati (Zheng et al, 2014).

Per tale tipo di trattamento i reagenti comunemente utilizzati per migliorare l'efficienza della digestione anaerobica sono l'acido solforico  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , cloridrico  $\text{HCl}$ , il perossido di idrogeno  $\text{H}_2\text{O}_2$  e l'acido acetico  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Ma et al, 2018). Tali reagenti possono portare alla rottura dei legami di substrati complessi quali quelli lignocellulosici, all'aumento della porosità della matrice e all'incremento del rateo di idrolisi del processo. Le principali reazioni che avvengono sono la solubilizzazione degli xilani (presenti nella frazione di emicellulosa) e della lignina, reazioni che risultano favorite quando si lavora con acidi forti (Hendriks et al, 2008).

Un incremento della produzione di metano pari a 2.46 volte rispetto prove con campione non trattato è stato ottenuto su residui da cucina dopo aver pretrattato la matrice con acido cloridrico fino al raggiungimento di pH pari a 2 (Zhao et al, 2011). In due studi effettuati su residui organici e su bagassa da canna da zucchero, si è visto che in entrambi i casi l'uso di acido

solforico e cloridrico ha portato ad un aumento degli zuccheri disciolti fino a livelli molto vicini a quelli degli zuccheri totali (Vavouraki et al, 2012 e Costa et al, 2014).

L'effetto benefico del trattamento acido è dunque confermato da numerosi studi ma la possibilità di sviluppo di reazioni che portano alla formazione di sottoprodotti quali acidi carbossilici alifatici, composti fenilici e fureni rende tale trattamento meno popolare rispetto il trattamento alcalino.

#### 2.4.4 Pretrattamento enzimatico

I pretrattamenti enzimatici hanno il vantaggio di poter essere molto specifici nella loro azione se si conosce bene la tipologia di matrice da idrolizzare con conseguenti effetti positivi sulla produzione di metano o idrogeno. In funzione dell'azione che si desidera effettuare è possibile impiegare enzimi quali l'amilasi, la proteasi o la lipasi i quali servono rispettivamente a idrolizzare amidi, proteine e lipidi in glucosio, amminoacidi e acidi grassi a lunga catena (Ma et al, 2018). Anche le condizioni di lavoro a cui viene svolto un trattamento enzimatico sono vantaggiose nei confronti del processo anaerobico poiché si lavora a temperature non troppo elevate (in genere non superiori ai 50 °C) e a pH che dipendono dal tipo di enzima impiegato.

Un ulteriore parametro importante ai fini dell'effetto enzimatico è la durata del trattamento. In alcuni studi effettuati su polpa da barbabietola da zucchero e luppolo esausto è stato testato l'effetto di un preparato di enzimi a contatto con i due tipi di substrato per un tempo pari a otto giorni. I risultati ottenuti mostrano che l'idrolisi enzimatica prosegue fino al quarto giorno di trattamento sebbene siano le prime 24 ore quelle in cui l'effetto è maggiormente marcato (Zieminski et al, 2012).

L'impiego di enzimi può avvenire secondo varie modalità: in uno studio effettuato su erba di grano sono stati testati alcuni enzimi a base di cellulasi (25 mg di preparato/g SV) sia effettuando il pretrattamento del substrato prima della digestione anaerobica sia tramite l'immissione del preparato di enzimi direttamente nel reattore e svolgendo il processo sia a singola che a doppia fase. Sebbene sia stato dimostrato dalle analisi che il pretrattamento abbia incrementato la quantità di COD solubile nel campione, al termine del processo di digestione non sono stati però registrati incrementi di produzione di metano (Romano et al, 2009).

In un'ulteriore ricerca riguardante bagassa da canna da zucchero sono state effettuate delle prove di metanazione dopo aver combinato un pretrattamento acido con l'enzima *Accelerase 1500*. I risultati evidenziano come il trattamento enzimatico abbia incrementato la produzione



di metano del 16% rispetto al campione pretrattato esclusivamente con acido solforico e soprattutto come tale combinazione risulti il pretrattamento più efficace tra tutti quelli testati (Badshah et al,2012).

A fronte dei numerosi vantaggi del trattamento enzimatico il principale svantaggio che limita la sua applicazione su grande scala consiste principalmente nel costo elevato degli enzimi. L'efficacia del trattamento e la facilità di esecuzione spingono però ad approfondire ulteriormente questo tema con l'obiettivo di trovare un compromesso economicamente sostenibile.

#### 2.4.4.1 Idrolisi enzimatica delle proteine nel lupino

Informazioni dettagliate sull'applicazione di trattamenti enzimatici alle proteine del seme di lupino vengono fornite in uno studio riguardante l'isolamento e la caratterizzazione di peptidi bioattivi dalle proteine del *Lupinus angustifolius* o lupino blu (Kamran, 2017). Gli enzimi testati al fine di effettuare l'estrazione dei peptidi sono la pepsina, la pancreatina e la proteasi (flavourzyme prodotta dalla muffa *Aspergillus oryzae*). Le prove enzimatiche effettuate vengono riassunte in tabella 2.2.

**Tabella 2.2** – Dati di sintesi su prove di idrolisi enzimatica del lupino (Kamran, 2017)

Enzima	Rapporto Enzima/substrato	Valore parametri della prova	Grado di idrolisi (%) a diversi intervalli temporali			
			1 ora	2 ore	3 ore	4 ore
Pepsina	1:200	pH= 2, T=37 °C	31.11±2.4	48.15±3.3	61.48±2.3	68.88±4.7
Pancreatina	1:200	pH=7, 37 °C	14.82±1.3	19.26±0.7	38.52±1.4	77.03±3.8
Flavourzyme	1:10	pH=8, T=50 °C	65.92±4.6	72.59±5.1	74.81±6.2	78.52±5.2

Al termine del trattamento i campioni sono stati scaldati a circa 80 °C per 15 minuti al fine di interrompere l'attività enzimatica. Dalla tabella si nota come la prova che sfrutta l'enzima flavourzyme sia quella con i risultati migliori e tale enzima risulti pertanto il più efficace sia in termini di percentuale di proteine idrolizzate sia in termini di velocità di idrolisi dal momento che l'attività è concentrata soprattutto nella prima ora.

Da uno studio sull'idrolisi enzimatica delle proteine della soia deriva che il range di pH a cui l'enzima proteasi lavora meglio è 5.0-5.5, sebbene l'attività risulti stabile nel range 4.5-5.5 (de Castro & Sato, 2014). La temperatura ottimale di lavoro si aggira invece attorno ai 55-60 °C.

### 3 CARATTERISTICHE E USO DEI LUPINI

#### 3.1 GENERALITÀ SUL LUPINO

Il lupino è una pianta appartenente alla famiglia delle Leguminose o Fabacee coltivata da più di 2000 anni e presente in natura con oltre 400 specie diverse (Klupšaitė & Juodeikienė, 2015). In funzione del clima di ogni territorio una specie può prevalere rispetto le altre, in Europa ad esempio troviamo principalmente le seguenti specie di lupino:

- *Lupinus albus* (lupino bianco)
- *Lupinus luteus* (lupino giallo)
- *Lupinus angustifolius* (lupino blu).



**Figura 3.1-** Pianta di Lupino Bianco (a sinistra) e seme di lupino (a destra)

In Italia la specie più comune è il lupino bianco (*Lupinus albus*), conosciuto principalmente per il suo ruolo nell'ambito alimentare dal momento che risulta essere una ricca fonte di proteine spesso utilizzata come alternativa alla soia, di fibre e di altri nutrienti benefici per il sistema cardiovascolare. Tale legume viene impiegato anche in ambito farmaceutico per via dell'elevato contenuto di lupanina, uno degli alcaloidi contenuti nel lupino dal quale è possibile estrarre la sparteina, una sostanza impiegata in farmacia il cui valore economico risulta piuttosto elevato. L'interesse del campo farmaceutico verso alcuni alcaloidi come la lupanina è dovuto ad effetti curativi riscontrati nel dosaggio di piccole quantità di tali sostanze. Altri usi per il lupino sono l'impiego come foraggio per il bestiame e come fonte di nutrienti per fertilizzare i suoli: il lupino infatti è capace di fissare l'azoto atmosferico e trasferirlo attraverso l'apparato

radicale nel suolo in cui viene coltivato pertanto tale pianta è spesso impiegata come coltura rotazionale.

Le proprietà del lupino variano in funzione dell'ambiente in cui viene coltivato ma ha un contenuto proteico variabile tra il 33% e 47 % (Ertas & Bilgicli, 2012), un contenuto di fibre totali di circa il 37% ed un moderato contenuto di lipidi (5-20%) mentre presenta una percentuale di amido piuttosto bassa (3%), diversamente da quanto accade per altri legumi simili ad esso (Mohamed et al,1995). Risulta consistente invece il contenuto di alcaloidi pari a circa 1-2% in peso.

Come gran parte dei cereali e delle colture energetiche anche i lupini presentano un consistente contenuto di cellulosa e lignina. Tali sostanze si concentrano principalmente nel guscio esterno del lupino e non nel seme vero e proprio. Le proporzioni del guscio del lupino rispetto al seme sono piuttosto ampie, specie se confrontate con altri legumi. Esso occupa infatti oltre il 20% del volume totale ed in seguito al processo di deamarizzazione è costituito per circa il 90% da fibre insolubili composte da cellulosa (79%), emicellulosa (14%) e lignina (7%). Il contenuto proteico è invece concentrato quasi esclusivamente all'interno del seme (Zeriun Nigussie,2012).

### 3.2 PROPRIETÀ NUTRITIVE E COMPOSIZIONE DEL LUPINO

La composizione chimica del lupino è riportata in tabella 3.1.

**Tabella 3.1** - Macrocomponenti nel seme del lupino (% in peso).

	Contenuto (%) nel seme intero	Contenuto (%) nel seme sgusciato	Contenuto (%) nel seme intero
	Muranyi (2016)		Barbeitos (2016)
<b>Acqua</b>	9	12	-
<b>Proteine</b>	32	41	32-52
<b>Grassi</b>	6	7	5-20
<b>Ceneri e lignina</b>	4	4	-
<b>Polisaccaridi</b>	22	28	-
<b>Oligosaccaridi</b>	4	6	6
<b>Guscio</b>	23	0	-

Insieme alle sostanze elencate in tabella 3.1, il lupino include anche alcuni minerali (Ca, Mg, P, Zn, Fe, Mn) e vitamine quali Tiamina, Riboflavina e Niacina (Barbeitos, 2016).

Ai fini della digestione anaerobica è utile conoscere il più possibile approfonditamente la composizione di un potenziale substrato, anche per sostanze presenti in quantità inferiori.

### 3.2.1 Oli

La frazione lipidica è composta principalmente da acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi che coprono rispettivamente il 55% e il 31% degli acidi grassi totali e che sono rappresentati per lo più da acido oleico e linoleico (Klupšaitė & Juodeikienė, 2015). Non è però escluso che in tale frazione vi siano altri acidi tra cui l'acido palmitico e l'acido stearico, osservati all'interno della specie *L. angustifolius* e riportati in tabella 3.2 (Muranyi, 2016). Il restante 14% della frazione lipidica è invece composto da acidi grassi saturi.

**Tabella 3.2** - Oli contenuti nel seme del lupino (caratterizzazione degli acidi grassi) e confronto con quelli della soia (Muranyi, 2016)

<b>Acidi grassi</b>	<b>L. angustifolius</b>	<b>Soia</b>
<b>Acido palmitico</b>	11.0	10.3
<b>Acido stearico</b>	3.8	4.5
<b>Acido oleico</b>	38.2	23.9
<b>Acido linoleico</b>	37.1	51.8
<b>Acido alfa-linoleico</b>	5.3	6.5
<b>Acido arachidico</b>	0.9	-
<b>Acido gadoleico</b>	0.3	-
<b>Acido beenico</b>	1.9	-

### 3.2.2 Zuccheri

Dai dati riportati in tabella 3.3 si deduce come il disaccaride maggiormente presente sia il saccarosio. Altri zuccheri sono però presenti nel lupino tra cui Galattosio, Maltosio, Fruttosio, Ribosio e Xilosio. Quest'ultimo è uno zucchero a cinque atomi di carbonio che deriva dalla parte fibrosa del lupino.

**Tabella 3.3** - Zuccheri contenuti nel seme del *L. albus* e percentuale di ogni zucchero rispetto il totale (Barbeitos, 2016)

<b>Mono e Disaccaridi</b>	<b>Valore medio (mg/kg sostanza secca)</b>	<b>Percentuale sul totale (%)</b>
<b>Saccarosio</b>	41151 ± 1543	70.7
<b>Galattosio</b>	4880 ± 319	8.4
<b>Glucosio</b>	3902 ± 269	6.7
<b>Ribosio</b>	3352 ± 43	5.8
<b>Maltosio</b>	2955 ± 234	5.1
<b>Fruttosio</b>	1609 ± 39	2.8
<b>Xilosio</b>	321 ± 48	0.5
<b>Totale</b>	<b>58170</b>	<b>100</b>

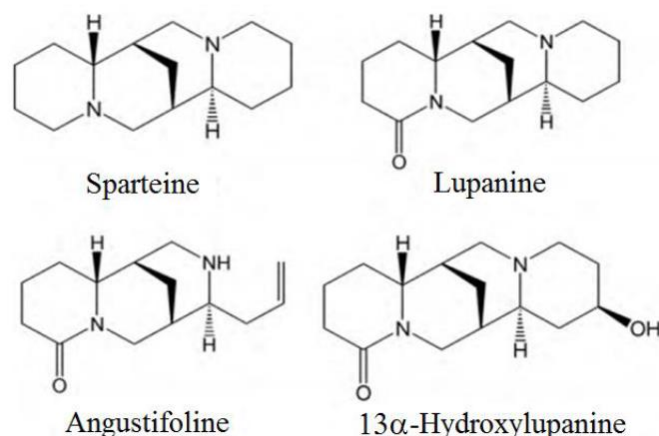
### 3.2.3 Alcaloidi

Sono stati osservati fino a 70 tipi di alcaloidi chinolizidinici nelle diverse specie di lupino esistenti. La quantità con cui ciascun alcaloide si presenta è piuttosto variabile e dipende sia dalla specie di lupino sia dal tipo di suolo e dal clima in cui la pianta si sviluppa. Nel caso specifico del lupino bianco (*L. albus*), Kroc et al. (2017) ha riportato la caratterizzazione di diversi alcaloidi (tabella 3.4).

**Tabella 3.4** – Percentuale di ogni alcaloide rispetto il contenuto totale di alcaloidi nel seme di lupino (Kroc et al., 2017)

	<b>Alcaloidi totali</b> (% sul peso secco del seme)	<b>Lupanina</b> (% sul totale)	<b>13-idrossilupanina</b> (% sul totale)	<b>Multiflorina</b> (% sul totale)	<b>Albina</b> (% sul totale)	<b>Angustifolina</b> (% sul totale)
Media	2.47	76.06	8.23	5.52	4.48	2.97
Minimo	0.02	28.22	0.1	0.00	0.00	0.24
Massimo	12.73	94.49	32.78	21.67	18.55	12.14

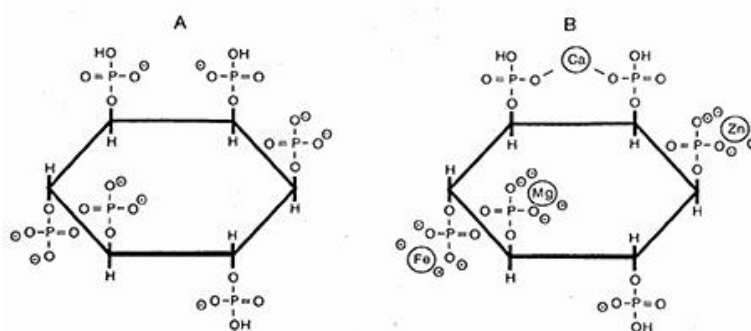
Secondo i dati di letteratura i lupini hanno un contenuto di alcaloidi in peso pari a circa 1-2% sul totale ma dai dati riportati in tabella 3.4 è possibile notare come in alcuni casi sia stato rilevato un contenuto di alcaloidi addirittura superiore al 12% in peso. La lupanina ( $C_{15}H_{24}N_2O$ ) è sempre risultata come l'alcaloide maggiormente presente sebbene vi siano anche altri alcaloidi in quantità non trascurabili.



**Figura 3.2** - Struttura di alcuni alcaloidi chinolizidinici presenti nei lupini (Klupšaitė,2015).

### 3.2.4 Acido fitico e uronico

Secondo lo studio di *Mohamed et al. (1994)* i lupini hanno un contenuto di acido fitico pari allo 0.03%, valore inferiore rispetto quello di altri legumi e di altre varietà di lupini. Tale sostanza è presente in molti tipi di cereali, legumi e semi ed è classificata come un antinutriente dal momento che riduce la biodisponibilità di minerali e proteine nei confronti dell'organismo umano e animale. Secondo vari studi infatti la molecola di acido fitico può legarsi a nutrienti e minerali impedendone l'utilizzo in alcuni processi biologici quali la digestione animale e l'assorbimento.



**Figura 3.3** - Acido fitico (a sinistra) e i complessi che forma con gli ioni di metalli come calcio, ferro, zinco e magnesio (a destra).

Discorso diverso vale per l'acido uronico il quale risulta essere presente in quantità superiore rispetto ad altri legumi (12%) ed in genere è considerato come un buon indicatore della presenza di pectina, polisaccaride di struttura contenuto nelle pareti cellulari dei tessuti vegetali e che presenta carattere gelificante (Mohamed et al, 1994).

### 3.2.5 Saponine e composti fenolici

Le saponine sono una classe di metaboliti secondari presenti in molti vegetali e legumi ed in alcuni casi possono raggiungere fino al 30% del peso secco di una pianta. Esse possono essere sintetizzate quando una pianta viene attaccata da organismi patogeni quali ad esempio microrganismi e funghi ma possono anche essere direttamente presenti nell'organismo vegetale. A livello strutturale esse sono molecole complesse composte da residui zuccherini come glucosio, fruttosio, galattosio e da una molecola non zuccherina detta sapogenina o aglicene. L'attività detergente delle saponine è da attribuire a tale struttura in quanto gli zuccheri e l'aglicene conferiscono rispettivamente carattere idrosolubile e liposolubile.

Altra classe di sostanze presenti nel lupino sono i tannini, composti polifenolici facilmente solubili in acqua e capaci di far precipitare sali di metalli pesanti. Essi si legano anche a sostanze contenenti azoto ed in particolare proteine ed alcaloidi formando aggregati insolubili. I tannini sono suddivisi in due gruppi: tannini idrolizzabili e non idrolizzabili. I primi si scindono per azione di acidi acquosi e sotto l'effetto di alte temperature dando origine a zuccheri e acidi fenolici liberi (acido gallico) mentre i tannini non idrolizzabili (detti anche condensati) differiscono strutturalmente dai primi e non sono sensibili all'effetto di alte temperature e acidi diluiti.

Nel lupino la quantità di saponine è molto variabile ma in alcune specie sono stati rilevati valori fino a 1.7 g/100 g lupino secco. I tannini invece risultano in quantità inferiore. La lista dei principali antinutrienti rilevati all'interno di diverse specie del lupino viene proposta in tabella 3.5. Essa è stata estratta da un articolo riguardante lo studio della composizione del lupino e del processo di deamarizzazione e contiene dati raccolti da più fonti (Carvajal-Larenas, 2015).

**Tabella 3.5** - Elenco di alcuni antinutrienti nel seme del lupino (Carvajal-Larenas, 2015).

	<b>L. albus</b>	<b>L.angustifolius</b>	<b>L. luteus</b>	<b>L. mutabilis</b>	<b>Seme di soia</b>
<b>Acido fitico (g/100g)</b>	1.42±0.06 (*)	1.45±0.4 (*)	2.72±0.9 (*)	2.74±0.4 (*)	1.23±2.3 (*)
<b>Saponine (g/100g)</b>	0.9±0.02 (*)	0.9±0.04 (*)	1.22±0.05(*)	1.7±0.08 (*)	1.7±0.01 (*)
<b>Tannini condensati (g/100 g)</b>	0.01 (**)	0.01 (**)	0.02 (***)	0.06 (****)	-
<b>Inibitori di tripsina (g/100g)</b>	0.01 (**)	0.01 (**)	0.03 (***)	-	-
<b>Stachiosio (g/100g)</b>	0.8±0.2 (*)	0.3±0.0 (*)	1.0±0.2 (*)	1.3±0.3 (*)	3.7±0.7 (*)
<b>Raffinosio (g/100g)</b>	0.8±0.2 (*)	0.6±0.0 (*)	1.0±0.2 (*)	0.9±0.2 (*)	1.0±0.2 (*)

(\*) Múzquiz et al. (1989), citati da Carvajal-Larenas (2015);

(\*\*) Petterson & Mackintosh (1994), citati da Carvajal- Larenas (2015);

(\*\*\*) Zdunczyk et al. (1994), citati da Carvajal- Larenas (2015);

(\*\*\*\*) Jiménez-Martínez et al. (2007), citati da Carvajal- Larenas (2015);

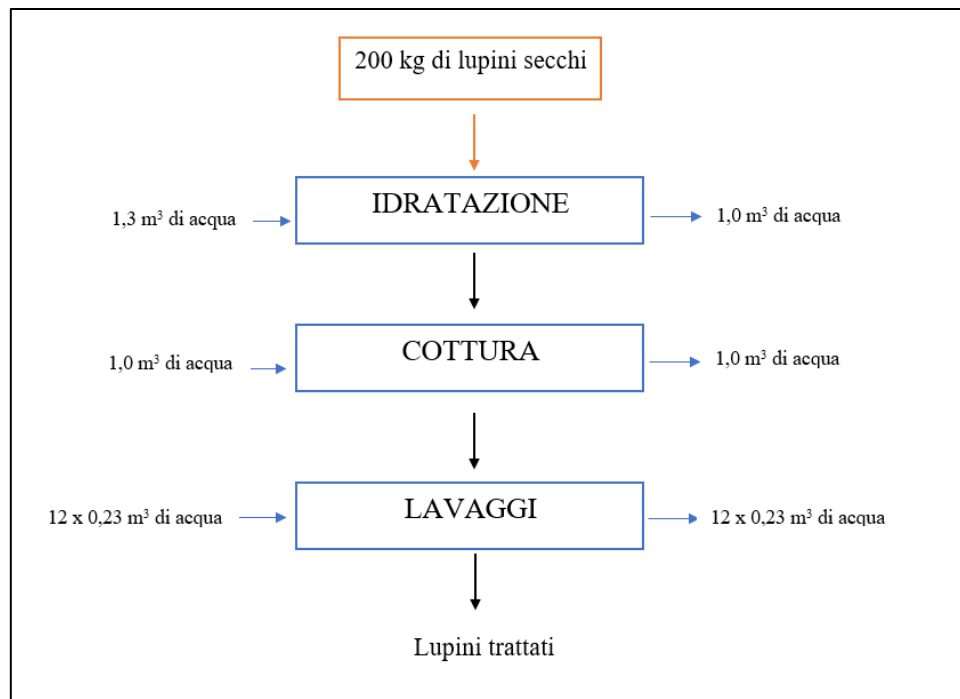


### 3.3 LAVORAZIONE DEI LUPINI PER L'USO ALIMENTARE

Le acque oggetto del presente studio derivano dal processo di trattamento dei lupini. In un precedente lavoro di tesi legato al progetto di ricerca in cui è inserito il presente studio è stata esaminata la filiera di trattamento che viene riportata in figura 3.4 (Battello,2017). La schematizzazione fornita fa riferimento alle informazioni ottenute da una ditta italiana, la quale ha temporaneamente partecipato al progetto di ricerca del Politecnico di Milano.

La prima fase consiste nell'idratazione dei lupini secchi. L'ammollo ha una durata di 12 ore, avviene in una vasca dal volume di  $1,5 \text{ m}^3$  contenente  $1,3 \text{ m}^3$  di acqua a temperatura ambiente e 200 kg di lupini secchi. Successivamente l'acqua di idratazione viene scaricata e la vasca nuovamente riempita con  $1 \text{ m}^3$  di acqua che viene scaldata fino a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ . Raggiunta la temperatura inizia la fase di cottura in cui i lupini vengono cotti per 15 minuti.

Una volta cotti, i lupini vengono trasferiti in una vasca di  $0,73 \text{ m}^3$  nella quale avverranno le fasi di lavaggio. Esse consistono in 12 cicli successivi durante i quali i lupini restano in ammollo per 12 ore in  $0,23 \text{ m}^3$  di acqua. Ad ogni ciclo l'acqua viene scaricata e sostituita con acqua pulita a temperatura ambiente. Il ciclo lavorativo si chiude con la salatura dei lupini ed il confezionamento finale.



**Figura 3.4** - Schematizzazione del processo di lavorazione dei lupini e fabbisogno idrico (Battello,2017)

Dallo schema in figura 3.4 è possibile notare quanto importante sia il consumo di acqua. La ditta italiana tratta in una settimana 2000 kg di lupini secchi equivalenti quindi a circa 48 m<sup>3</sup> di acqua scaricata a valle del trattamento.

La serie dei numerosi lavaggi successivi alla cottura dei lupini è necessaria al fine di migliorare le caratteristiche organolettiche del prodotto. La grande quantità di alcaloidi conferisce ai lupini un sapore amaro oltre che rappresentare un rischio per la salute umana data la loro tossicità. In figura 3.5 vengono riportate alcune foto delle fasi del processo di trattamento.



**Figura 3.5.** Lupini secchi (a sinistra), vasca di idratazione dei lupini (al centro) e vasca di cottura (a destra).

### 3.4 EFFETTI DEL PROCESSO DI DEAMARIZZAZIONE DEI LUPINI

Sebbene i lupini contengano diversi tipi di alcaloidi, quello maggiormente presente e su cui viene posta maggiore attenzione a livello di processo e quindi in questa tesi è la lupanina. Prima del trattamento i lupini hanno un alto contenuto di alcaloidi (10-20 g/kg) mentre, a valle del ciclo di lavorazione, grazie alla serie di lavaggi si riescono a raggiungere valori inferiori a 0,5 g/kg. Ovviamente gli alcaloidi rimossi vengono trasferiti sia nell'acqua di cottura che nell'acqua di lavaggio e la qualità del prodotto finale è tanto migliore quanto più si riesce a diminuire il contenuto di alcaloidi e di altre sostanze quali l'acido fitico, aventi tossicità rilevante o classificate come anti-nutrienti. Le acque scaricate a valle del processo produttivo dei lupini contengono tutte quelle sostanze contenute nel lupino e solubili in acqua quali composti azotati, minerali, vitamine e ovviamente alcaloidi.

L'effetto del trattamento dei lupini al fine di ridurre il sapore amaro e il contenuto di alcaloidi è stato studiato da Ertas & Bilgili (2012) esaminando le proprietà nutrizionali e confrontando diverse tecniche di lavaggio del prodotto. La cottura iniziale causa la diminuzione dei nutrienti, del contenuto proteico e anche del contenuto di acido fitico, come visibile in tabella 3.6, estratta dallo studio in questione.

**Tabella 3.6** – Effetto della fase di cottura sulla composizione del lupino

(Ertas &amp; Bilgicli, 2012),

<b>Composizione</b>	<b>Lupino tal quale</b>	<b>Lupino post cottura</b>
<b>Ceneri (% su peso secco)</b>	3.3 ± 0.03	2.8 ± 0.01
<b>Proteine (% su peso secco)</b>	41.3 ± 0.71	39.3 ± 0.51
<b>Acido fitico (mg/100 g peso secco)</b>	1486.8 ± 10.97	1125.9 ± 14.2
<b>Minerali (mg/100 g)</b>		
<b>Ca</b>	208.7 ± 3.96	186.3 ± 3.34
<b>P</b>	492.5 ± 7.96	472.8 ± 8.67
<b>Zn</b>	5.3 ± 0.17	4.9 ± 0.13
<b>Fe</b>	1.7 ± 0.07	1.5 ± 0.13
<b>Mg</b>	138.0 ± 3.01	119.0 ± 3.73
<b>Mn</b>	53.1 ± 0.58	52.4 ± 0.34

Tra i metodi di lavaggio esaminati è risultato che l'ammollo in acqua a 55 °C per 144 ore complessive è quello che riduce maggiormente sia la quantità di acido fitico che quella di nutrienti utili all'organismo. L'ammollo in soluzione acquosa con 0.5 % di NaHCO<sub>3</sub> per 144 ore ha dato invece i migliori risultati in termini di proprietà organolettiche. In tale articolo non vengono però forniti dati sulla quantità di lupanina residua nel lupino al termine della fase di cottura.

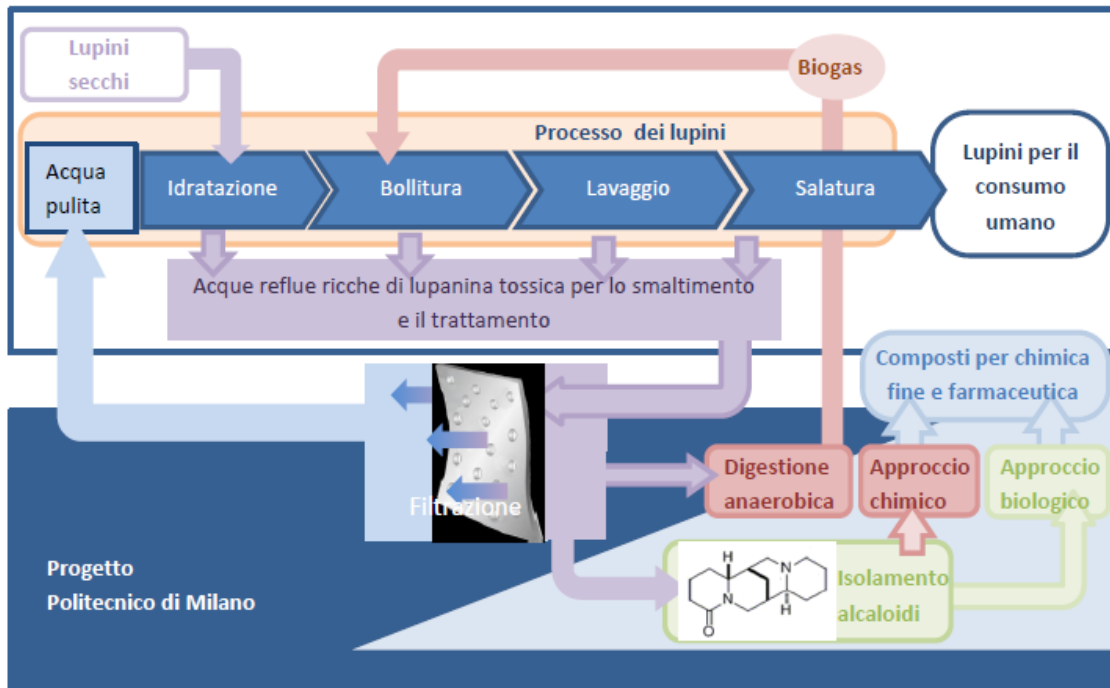
### 3.5 PROBLEMATICHE E OTTIMIZZAZIONE DEL PROCESSO PRODUTTIVO

#### 3.5.1 Il progetto “Biorg4WasteWaterVal+”

Il processo produttivo del lupino non appare complesso dal punto di vista tecnico ma risulta piuttosto dispendioso in termini di risorsa idrica dal momento che vengono impiegati approssimativamente 48 m<sup>3</sup> di acqua per ogni settimana di lavoro.

Il progetto “Biorg4WasteWaterVal+” ha lo scopo di proporre e studiare possibili miglioramenti e modifiche del ciclo produttivo al fine di incrementare l'efficienza del processo diminuendo i costi energetici e il dispendio di risorse. A pari importanza vi è l'obiettivo di recuperare la lupanina rilasciata e convertirla in prodotti usufruibili nell'industria farmaceutica.

Il progetto di ricerca complessivo viene schematizzato in figura 3.6.



**Figura 3.6** - Schematizzazione del progetto Biog4WasteWaterVal+”

Gli obiettivi del progetto possono essere riassunti in 3 punti:

- 1) Produzione di biogas tramite digestione anaerobica effettuata sul concentrato ottenuto dalla prima fase di filtrazione su membrana delle acque di idratazione, cottura e lavaggio raccolte durante il ciclo produttivo del lupino;
- 2) Isolamento degli alcaloidi tramite una seconda fase più spinta di filtrazione su membrana (nanofiltrazione) effettuata sul permeato della ultrafiltrazione;
- 3) Riutilizzo nel ciclo produttivo delle acque residue a valle del sistema di filtrazione, depurate sia dalla sostanza organica che dagli alcaloidi recuperati.

La prima fase di filtrazione ha l’obiettivo primario di concentrare la sostanza organica in un refluo che possa essere spedito alla fase di digestione anaerobica. Tale filtrazione dovrebbe separare gran parte della sostanza organica creando in tal modo condizioni di lavoro adatte per la successiva nanofiltrazione. La produzione di biogas derivante dalla digestione anaerobica può essere invece utilizzata per sostenere i costi energetici legati soprattutto alla fase di bollitura dei lupini.

### 3.5.2 Caratteristiche delle acque di lavorazione dei lupini

In tabella 3.7 vengono riportati i dati di caratterizzazione delle acque provenienti dalle diverse fasi del ciclo produttivo. Tali dati si riferiscono ad un campionamento effettuato in data 8/11/2016 presso la ditta collaboratrice e contengono le misurazioni di alcuni parametri tra cui COD, TKN (Totak Kjeldahl Nitrogen) e contenuto di lupanina (Battello, 2017).

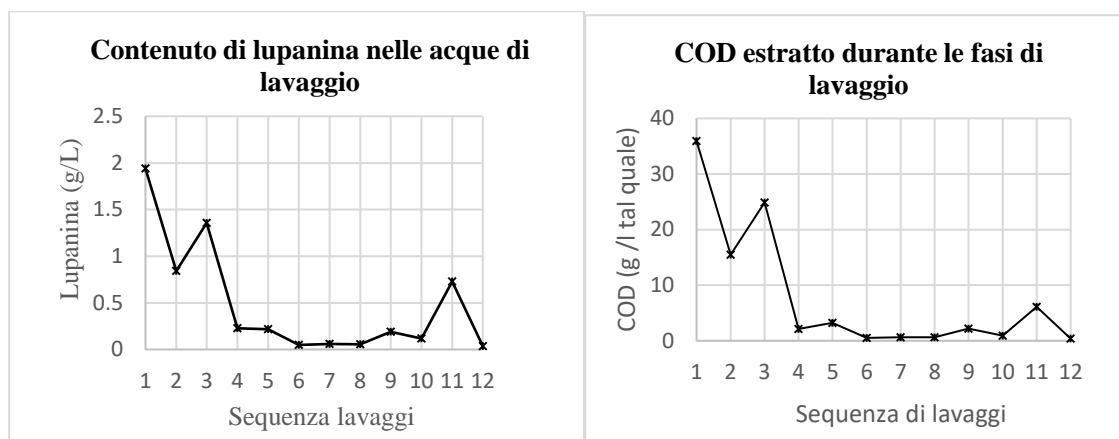
**Tabella 3.7** - Caratterizzazione delle acque di lavorazione dei lupini (Battello, 2017).

Acque analizzate	pH	Conducibilità [mS/cm]	COD [g /l tal quale]	COD solubile [g/l]	TKN [mg /kg tal quale]	Lupanina [g/l]
Acqua di idratazione	6.13	1.43	3.22	-	38.82	0
Acqua di cottura 1	6.61	3.0	20.12	19.44	257.8	0.98
Acqua di cottura 2	6.3	2.52	17.73	15.1	201.3	0.98
Acqua di cottura 3	6.35	3.33	25.55	24.74	318.8	1.20
Lavaggio 1	5.82	3.93	35.95	-	432.7	1.94
Lavaggio 2	6.38	2.09	15.48	-	182.7	0.84
Lavaggio 3	4.74	3.05	24.90	-	284.4	1.36
Lavaggio 4	6.47	1.06	2.10	-	49.25	0.27
Lavaggio 5	6.34	1.04	3.23	-	52.3	0.22
Lavaggio 6	6.73	1.02	0.53	-	22.5	0.05
Lavaggio 7	6.54	0.88	0.63	-	28.7	0.06
Lavaggio 8	6.67	0.93	0.62	-	26.4	0.06
Lavaggio 9 (*)	5.79	1.12	2.19	-	67.1	0.19
Lavaggio 10	6.24	0.89	0.92	-	39.8	0.17
Lavaggio 11 (*)	4.92	1.76	6.12	-	103.6	0.73
Lavaggio 12	6.67	0.86	0.38	-	17.0	0.04

Nella tabella sono presenti tre diversi campionamenti relativi all'acqua di cottura il primo dei quali corrisponde allo stesso lotto di lupini la cui lavorazione è stata campionata fino all'ultimo lavaggio. I campionamenti dei lavaggi 9 e 11 sono contrassegnati da un asterisco (\*) in quanto non sono da considerare attendibili per errore di campionamento (Battello, 2017).

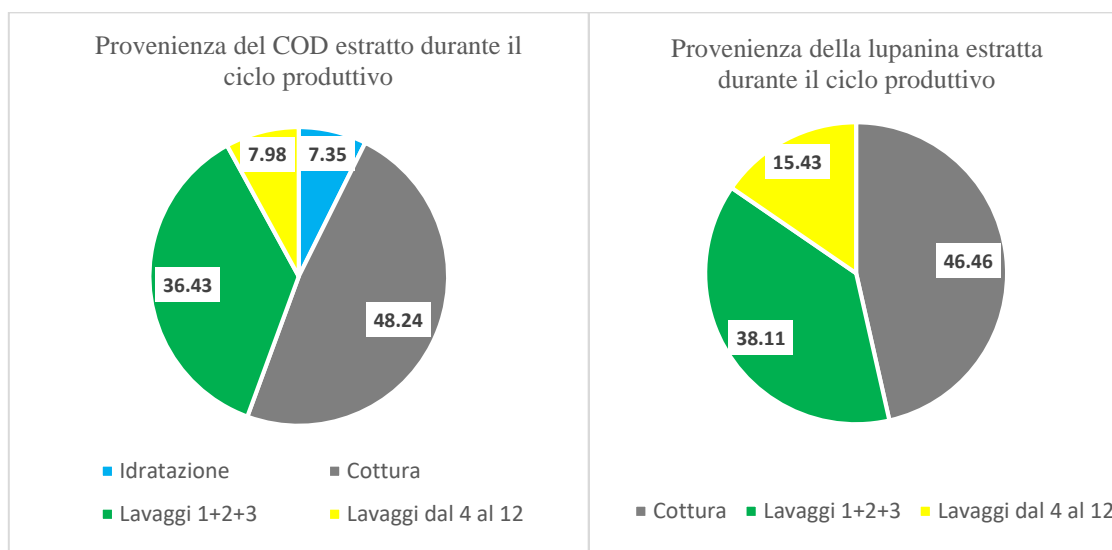
Dal campionamento è risultato che il contenuto di sostanza organica espresso in termini di COD e quello di azoto espresso in termini di TKN sono concentrati nelle acque di cottura e in quelle impiegate per i primi 3 lavaggi. Dal confronto tra le misure di COD solubile e COD sul campione tal quale dell'acqua di cottura è emerso che circa il 90 % della sostanza organica presente nei campioni analizzati è presente in forma solubile. Relativamente alla lupanina è stato notato come l'acqua di idratazione sia completamente priva di tale alcaloide il quale viene rilasciato solo dopo la fase di cottura dei lupini.

Utilizzando i dati riportati in tabella 3.7, viene proposto in figura 3.7 l'andamento della concentrazione di lupanina nelle dodici fasi di lavaggio, fasi che risultano essenziali al fine della rimozione dell'alcaloide, e l'andamento del contenuto di COD:



**Figura 3.7** – Concentrazioni di lupanina e di COD misurati nelle acque di lavaggio.

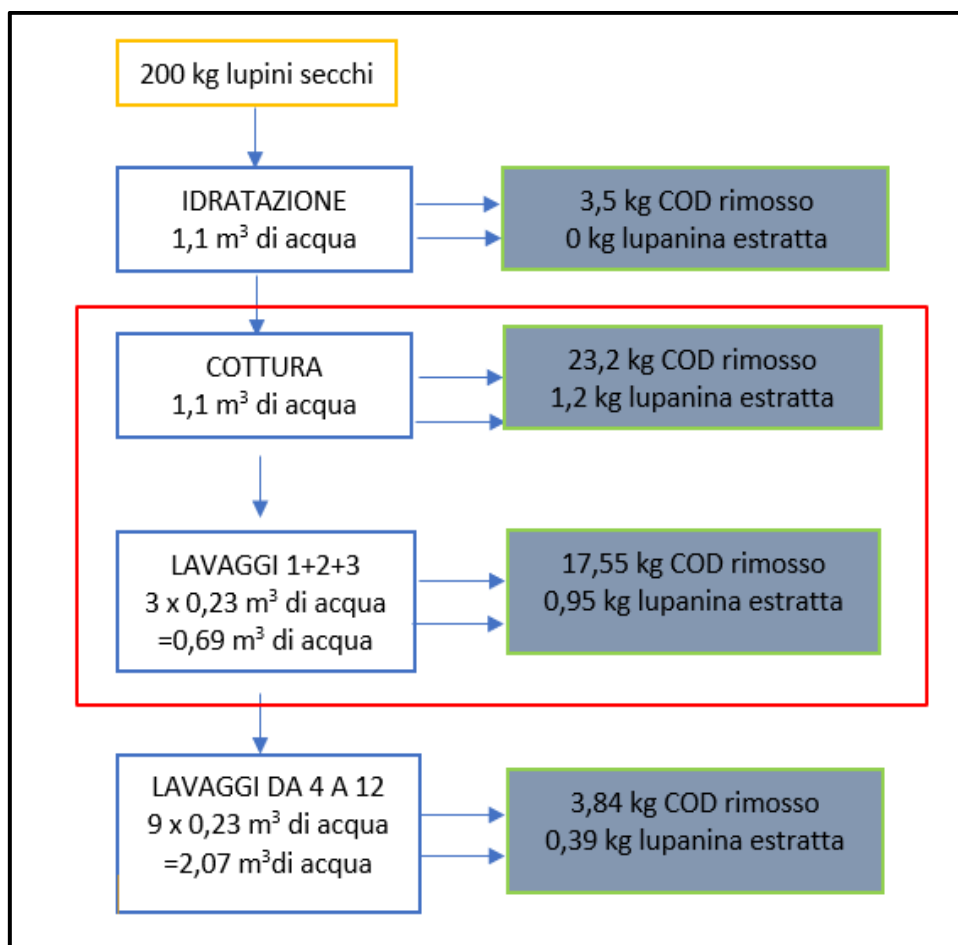
Sfruttando i dati di concentrazione riportati in tabella 3.7 e noti i volumi di acqua in gioco in ognuna delle singole fasi (figura 3.4) è possibile individuare quantitativamente quali sono le fasi durante le quali si ha un maggior rilascio di sostanza organica e di lupanina:



**Figura 3.8** – Contenuto percentuale di sostanza organica e lupanina estratti dalle diverse fasi di processo

In figura 3.8 si può osservare come le fasi che contribuiscono maggiormente all'estrazione di sostanza organica e lupanina siano sostanzialmente la fase di cottura e le prime tre fasi di lavaggio. Le restanti fasi di lavaggio sono necessarie per il raggiungimento dei requisiti di qualità per l'immissione del prodotto sul mercato ma non contribuiscono ad un'estrazione significativa di COD o lupanina.

L'intero processo di lavorazione e i flussi di COD e lupanina vengono illustrati in figura 3.9.



**Figura 3.9** – Carichi di COD e lupanina rimossi durante il processo di lavorazione dei lupini.

È interessante fare un confronto tra la possibilità di trattare tutte le acque globalmente generate dal processo (riquadro in nero di figura 3.9) e quella di trattare esclusivamente le acque più concentrate (riquadro in rosso).

**Tabella 3.8** – Confronto tra due modalità di trattamento delle acque reflue generate dal processo lavorativo.

	<b>Schema globale</b>	<b>Schema ridotto (acqua di cottura e primi 3 lavaggi)</b>
COD estratto [kg]	48.2	40.8
Lupanina estratta [kg]	2.5	2.11
Refluo da trattare [kg]	5.0	1.79

Dal confronto in tabella 3.8 si deduce che, considerando solamente le acque derivanti dalla fase di cottura e dei primi tre lavaggi si riesce comunque a trattare circa l'85% del COD e circa l'84% della lupanina complessivamente estratti, che risultano concentrati in un volume pari al 36% del volume totalmente scaricato.

## **4 BIODEGRADABILITÀ DI ACQUE AD ALTO CONTENUTO DI ALCALOIDI**

Nell'industria alimentare è molto comune avere a che fare con acque ricche di alcaloidi. Prodotti quali il caffè, i pomodori, le olive e le patate vengono sottoposti a processi di lavorazione che necessitano di ingenti quantità di acqua e a fine lavorazione tali acque risultano cariche di diverse sostanze che possono essere problematiche dal punto di vista ambientale a causa della loro tossicità. Per tale motivo esse necessitano di essere trattate con processi fisici, chimici o biologici. Tali reflui sono spesso caratterizzati da alte concentrazioni di COD e BOD (Biochemical Oxygen Demand) e generalmente presentano pH acidi (Özdemir, 2006). Tra i processi che più comunemente vengono applicati a tale tipologia di reflui vi sono processi biologici quali processi a fanghi attivi, processi di digestione anaerobica e processi combinati di ossidazione biologica e chimica impiegati per il trattamento di acque provenienti dalla lavorazione dell'oppio (Aytimur et al, 2004).

Non sempre però le caratteristiche di tali acque sono compatibili con i processi a cui esse vengono sottoposte e dunque non è raro incorrere in problemi di inibizione dei processi di trattamento biologico. Lo studio della biodegradabilità delle acque ad alto contenuto di alcaloidi è poco investigato e gli studi che hanno tentato di approfondire tale aspetto hanno spesso avuto difficoltà nello spiegare le cause di eventuali inibizioni.

### **4.1 SOSTANZE ASSOCIATE AD ACQUE RICCHE DI ALCALOIDI**

In questo paragrafo viene fatto un elenco di sostanze potenzialmente inibenti nei confronti del processo di digestione anaerobica, rilevate nelle acque di lavorazione di prodotti alimentari ad alto contenuto di alcaloidi. Tale analisi può servire per confrontare le sostanze che verranno descritte con quelle presenti nel seme del lupino, sulla base delle informazioni raccolte nel capitolo precedente riguardanti la composizione del seme e gli effetti del processo di cottura.

Gli alcaloidi risultano potenzialmente tossici nei confronti della salute umana ed è possibile che essi possano avere influenze anche sull'attività batterica. In un recente studio è stato testato l'effetto dell'aggiunta di gramina (alcaloide presente in molte piante) a varie dosi su un processo in continuo di co-digestione di insilato di erba e letame bovino (Popp et al, 2016). All'aumentare delle dosi di gramina è stata osservata una graduale diminuzione della produzione di metano fino a un massimo del 53 % con un incremento delle concentrazioni di



acido acetico. Sebbene nel tempo vi sia stato il recupero della normale produzione di metano, un'analisi della composizione microbiologica ha dimostrato che la comunità dei batteri metanigeni anziché essere ben bilanciata presentava una predominanza per oltre i due terzi del genere *Methanosarcina* e la totale scomparsa del genere *Methanosaeta*. Il metano prodotto inoltre risultava essere generato esclusivamente per via acetoclastica, il che spiegherebbe l'aumento dei batteri di tipo *Metanosarcina*.

Oltre agli alcaloidi, ulteriori sostanze che possono causare problemi di inibizione nei processi biologici sono le pectine, i tannini e altri composti polifenolici, riscontrati nelle acque a valle del processo di lavorazione del caffè (Rattan et al, 2015). Non è escluso che tali sostanze siano presenti anche nelle acque di lavorazione di altri prodotti quali anche quelle dei lupini (paragrafo 3.2.5) ma molto spesso tali composti risultano di difficile identificazione.

L'effetto sulla produzione di metano di substrati a contatto con metaboliti secondari quali saponina, tannini, salicina e aloina è stato studiato sul processo di co-digestione anaerobica del glucosio (Ngoma et al, 2015).

**Tabella 4.1** – Elenco di alcuni metaboliti secondari.

<b>Metabolita</b>	<b>Formula chimica</b>	<b>Peso molecolare (g)</b>	<b>Solubilità in acqua (g/L)</b>
<b>Saponina</b>	Non definita	Non definita	Non definita
<b>Acido tannico</b>	C <sub>76</sub> H <sub>52</sub> O <sub>46</sub>	1701.2	28.6
<b>Salicina</b>	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	286.3	40
<b>Aloina</b>	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	418.4	Non definita

In tale studio sono state condotte svariate prove di BMP con dosi crescenti di ciascun metabolita osservando una chiara inibizione da ciascuno di essi seppur con effetti più o meno marcati. Nello specifico la miscela sottoposta a digestione aveva un contenuto fisso di glucosio e dosi di ciascun metabolita variabili da 0.3 a 13.3 g/L. Il metabolita più inibente è risultato l'aloina, a seguire la saponina, l'acido tannico e infine la salicina.

In uno studio su acque provenienti dalla lavorazione dell'oppio viene citata anche la presenza di alte concentrazioni di solfati: essi possono causare inibizione nei processi biologici quali la digestione anaerobica. Nello specifico tali acque erano prima state sottoposte a processi a membrana (MBR) successivi ai quali il concentrato derivante dalla nanofiltrazione presentava concentrazioni di solfati ancora più elevate. Scopo del lavoro era quello di tentare la rimozione di tali composti attraverso il processo di elettrodialisi (Sakar et al, 2016).

Infine, un'ulteriore sostanza riscontrata in acque ricche di alcaloidi e presente anche nel seme del lupino è l'acido fitico (paragrafo 3.2.4). Esso è un composto presente in molti legumi e fa dunque parte della nostra dieta ma le opinioni riguardo i benefici che esso apporta all'organismo umano sono molto discordanti. I problemi legati a tale sostanza consistono nel fatto che si lega facilmente a molti ioni metallici quali Fe, Ni, Co, Ca diminuendone la biodisponibilità verso i microrganismi (Ivo Achu, 2012). Non sono però disponibili studi riguardanti la relazione tra produzione di metano e presenza di acido fitico.

## 4.2 STUDI PRECEDENTI SULLE ACQUE DEI LUPINI

La fase sperimentale di questa tesi si è occupata di valutare l'efficienza della digestione anaerobica nella rimozione del COD e nella produzione di metano sulle acque dei lupini dopo aver sottoposto i campioni da degradare a diversi pretrattamenti. Il lavoro va inteso come una continuazione ed un approfondimento dei risultati finora ottenuti riguardo tale tema pertanto può essere utile avere un quadro completo di quanto è stato fatto in studi precedenti ma sempre appartenenti al progetto di ricerca in cui si inserisce anche la presente tesi.

### 4.2.1 Caratterizzazione dei campioni sottoposti a prove di BMP

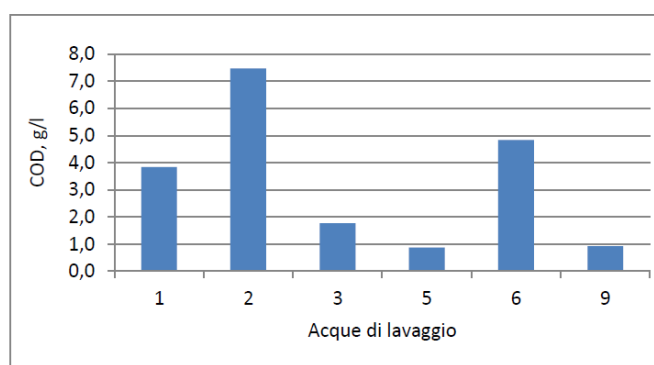
Sono state effettuate delle prove di BMP su campioni di acque provenienti da alcune delle diverse fasi del ciclo lavorativo dei lupini. Alcune di queste prove sono state effettuate dal Politecnico di Milano (Battello, 2017) su campioni provenienti dalla ditta italiana inizialmente collaborante al progetto mentre altre prove sono state svolte da partner di progetto portoghesi.

I campioni sottoposti a prove di BMP sono essenzialmente di tre tipi:

- 1) Acqua di cottura
- 2) Acque di lavaggio
- 3) Concentrato derivante dalla fase di ultrafiltrazione effettuata sulle acque di cottura.

Nel caso dei campioni italiani i valori di COD misurati per le acque di cottura variano tra i 15 e 25 g/L e tali acque, insieme alle acque provenienti dai primi quattro lavaggi, contengono circa l'85% di tutto il COD estratto durante il ciclo lavorativo complessivo. Confrontando le misure di COD sul campione tal quale con quelle di COD solubile, si è visto come la sostanza organica presente si trovi quasi tutta in forma solubile (tabella 3.7).

Confrontando i campioni italiani con quelli portoghesi è stato scoperto che le acque di cottura presentano valori di COD abbastanza simili mentre le acque di lavaggio della ditta portoghese hanno un maggior contenuto di sostanza organica (39 g COD/L). Con molta probabilità tale risultato è legato alla diversa metodologia che le ditte adottano per le fasi di lavaggio: la durata della singola fase influisce infatti su quanta sostanza organica viene rilasciata con differenze anche marcate. Nel caso della ditta italiana il primo lavaggio ha una durata di tre ore mentre i successivi lavaggi durano 12 ore e ciò spiega perché il secondo lavaggio presenta valori di COD superiori al primo. In figura 4.1 viene raffigurato l'andamento del COD durante i lavaggi dei lupini (Battello, 2017).



**Figura 4.1** – Concentrazione di sostanza organica nelle diverse acque di lavaggio (Battello, 2017).

È possibile notare come non vi sia un andamento regolare del COD estratto ma il secondo lavaggio è sicuramente quello a maggior carico di sostanza organica.

Ulteriori considerazioni sono state fatte sulla base dei risultati delle prove di filtrazione effettuate dal Politecnico di Milano su diversi campioni di acqua di cottura (Mascheroni, 2017). Nello specifico sono state effettuate prove di ultrafiltrazione a diversi cut-off molecolari per avere un'idea di quanto sia possibile concentrare la sostanza organica ed ottenere un retentato da spedire a digestione anaerobica. I dati riassuntivi delle prove di ultrafiltrazione sono raccolti in tabella 4.2.

**Tabella 4.2** - Sintesi prove di ultrafiltrazione su acqua di cottura (Mascheroni,2017)

Data	COD acqua di cottura tal quale [g/L]	Membrana	Reiezione [%]	Efficienza di rimozione del COD [%]
14/07/2017	15,92	2000 Da (usata)	35.46	[-]
30/08/2017	17,28	50000 Da (usata)	55.61	73.37
08/11/2017	20,12	50000 Da (usata)	55.02	73.02
08/11/2017	22,85	3000 Da (nuova)	50.59	87.65
08/11/2017	22,85	20000 Da (usata)	62.91	90.73
12/01/2017	17,73	MF 0,3 µm (nuova)	21.03	80.26

Quasi tutte le membrane utilizzate, ad eccezione di quella da 0.3  $\mu\text{m}$  che rientra nell'ordine della microfiltrazione (MF), sono risultate capaci di trattenere alte percentuali di COD e la membrana da 50 000 Da è risultata come la più indicata presentando il maggior flusso specifico di permeato (Mascheroni, 2017). Tale membrana ha un cut-off ampio e potrebbe dunque trattenere macromolecole quali ad esempio le proteine, presenti in grandi quantità nel seme di lupino e presenti anche nell'acqua di cottura come riportato in tabella 3.6. Alcuni dei campioni ottenuti dalle prove di filtrazione sono stati successivamente sottoposti a prove di BMP che verranno discusse nel prossimo paragrafo.

#### 4.2.2 Risultati delle precedenti prove di BMP

Sono state effettuate svariate prove di BMP con lo scopo di misurare la biodegradabilità anaerobica dei campioni di acqua sopra descritti. I risultati hanno dimostrato che una maggior produzione di metano viene ottenuta per rapporti F/M (Food To Microorganism) di circa 0.5 g COD/g SV sebbene non vi sia una relazione lineare tra il rapporto F/M e il metano prodotto (Battello, 2017).

Sottoponendo a degradazione anaerobica l'acqua di cottura, il suo concentrato e le acque di lavaggio sono stati ottenuti valori di biodegradabilità che si aggirano attorno al 60% per l'acqua di cottura ed il concentrato post ultrafiltrazione mentre valori ancora più bassi sono stati osservati per le acque di lavaggio. Solo in una prova condotta sulle acque di lavaggio della ditta portoghese si è raggiunto un valore superiore pari al 70%. Tali risultati sono piuttosto anomali se si considera che si tratta di matrici di origine alimentare le quali in genere risultano facilmente biodegradabili pertanto si pensa che vi possano essere delle sostanze inibenti che rallentano il processo oppure che alcune delle componenti facenti parte del substrato siano recalcitranti ad una delle fasi della digestione anaerobica e pertanto non vengano degradate.

Le più rilevanti prove di BMP svolte sono raccolte in tabella 4.3.

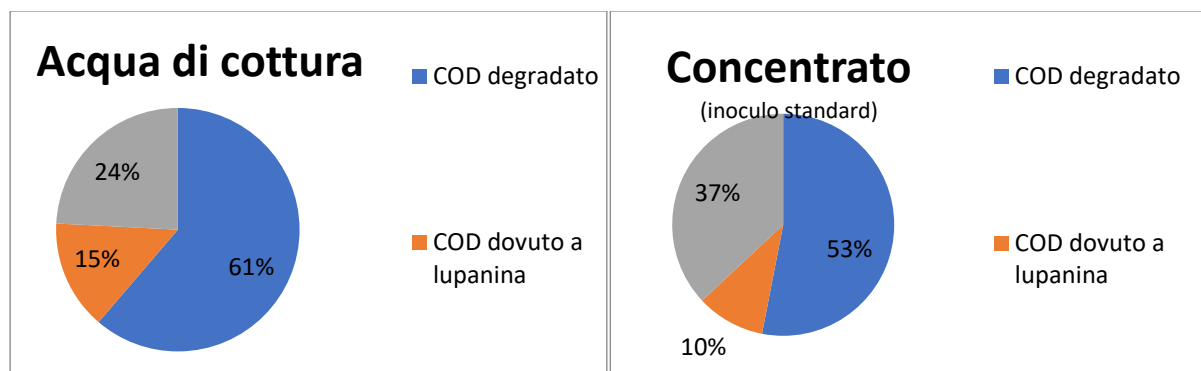
**Tabella 4.3** – Risultati delle precedenti prove di BMP su acque di lavorazione dei lupini (Battello, 2017)

<b>Campioni</b>	<b>BMP [mL CH<sub>4</sub>/g COD]</b>	<b>Biodegradabilità [%]</b>
Acqua di cottura (inoculo standard)	209.76 $\pm$ 5.92	64
Acqua di cottura (inoculo acclimatato)	199.23 $\pm$ 2.11	60
Concentrato (inoculo standard)	204.29 $\pm$ 1.31	62
Concentrato (inoculo acclimatato)	205.97 $\pm$ 0.3	62
Lavaggio 1 (inoculo standard)	147.52	45
Lavaggio 2 (inoculo standard)	165.97 $\pm$ 5,23	50

Per escludere o confermare la presenza di eventuali sostanze inibenti sono state effettuate delle prove di attività batterica o SMA (Specific Methanogenic Activity) sull'inoculo che proveniva dalle prove di BMP concluse (inoculo acclimatato) e sull'inoculo utilizzato prima della prova (inoculo standard) ottenendo come risultato che l'attività dei batteri metanigeni non risulta inibita dal momento che l'efficienza di rimozione dell'acetato di sodio, substrato facilmente biodegradabile, è risultata molto simile per entrambi i tipi di inoculo, con valori pari o superiori al 90%.

È più probabile dunque che le acque di lavorazione dei lupini contengano sostanze difficili da degradare. Una tra queste è sicuramente la lupanina, il principale alcaloide contenuto nei lupini. A tal proposito, è stato stimato il COD dovuto ad essa ed effettuando un bilancio del COD che ipotizza che tutta la lupanina non venga degradata, è stato osservato come anche se una parte del COD non degradato sia dovuto proprio alla lupanina residua a fine prova, ciò non basta a giustificare la bassa percentuale di biodegradabilità dei campioni dal momento che il COD corrispondente alla lupanina è minore del COD che a fine prova rimane non degradato.

Tale bilancio ipotizzava che tutta la lupanina presente nei campioni sottoposti a BMP non sia degradabile, ipotesi che comunque necessita di essere verificata tramite analisi sul surnatante post BMP.



**Figura 4.2** – Bilancio teorico di COD in due diverse tipologie di acque usate per BMP (Battello,2017)

## 5 MATERIALI E METODI

Lo scopo di questa tesi è quello di indagare sulla biodegradabilità dei reflui provenienti dal processo lavorativo del lupino. Tali acque hanno dimostrato in passato una biodegradabilità che si aggira attorno al 60% (Battello,2017), valore piuttosto basso per reflui di origine alimentare pertanto in questo lavoro si approfondirà l'uso di pretrattamenti di tipo fisico-chimico ed enzimatico. Nello specifico si è interessati a massimizzare la produzione di biogas e a comprendere se la limitata biodegradabilità del refluo sia dovuta alla presenza di inibenti o a quella di sostanze difficilmente biodegradabili.

### 5.1 ORIGINE E PREPARAZIONE DEL SUBSTRATO

Nel paragrafo 4.2.2 sono stati illustrati i risultati delle prove di biodegradazione effettuate in passato su campioni di acqua provenienti da diverse fasi del ciclo lavorativo del lupino e prelevati direttamente presso le sedi delle ditte che hanno collaborato al progetto di ricerca. Sebbene le prove di biodegradabilità siano state fatte su acque di cottura, di lavaggio e sul concentrato post filtrazione, nel corso della presente tesi si è deciso di effettuare i pretrattamenti esclusivamente sulle acque di cottura dal momento che lo scopo principale è capire l'effetto dei diversi pretrattamenti sulla biodegradabilità e tenendo comunque conto che i risultati delle precedenti prove di BMP non presentano differenze molto marcate tra i vari campioni (Battello, 2017).

Nel caso di questa tesi la tecnica di lavorazione dei lupini di una delle industrie inizialmente partner di progetto, illustrata al paragrafo 3.3, è stata simulata per produrre il refluo necessario a svolgere i test in laboratorio.

Sulla base dei rapporti tra chilogrammi di lupini trattati e volumi di acqua di idratazione e di cottura necessari ottenuti dai dati della ditta italiana, si è ricavata la quantità di lupini secchi da trattare al fine di ottenere una quantità di campione sufficiente per le varie prove effettuate.

In tabella 5.1 vengono riportati i volumi di acqua di idratazione e di cottura utilizzati per preparare il campione durante la fase sperimentale. I lupini secchi utilizzati per le prove sono stati acquistati presso fornitori locali di legumi e frutta secca.

**Tabella 5.1** - Volumi di acqua utilizzati per la preparazione del campione in laboratorio.

Ciclo di prove	Lupini secchi trattati (kg)	Acqua di idratazione (L)	Acqua di cottura (L)
<b>DITTA ITALIANA</b> (di riferimento)	200	1300	1100
<b>Trattamento termico</b>	0.25	1.63	1.38
<b>Trattamento termo -basico</b>	0.25	1.63	1.38
<b>Trattamento termo -acido</b>	0.3	1.95	1.65
<b>Trattamento enzimatico</b>	0.3	1.95	1.65
<b>Trattamenti misti</b>	0.3	1.95	1.65

La fase di idratazione è avvenuta mettendo a mollo per 12 ore i lupini secchi nel volume di acqua a temperatura ambiente. L'acqua di idratazione non è stata impiegata in alcun modo mentre i lupini idratati sono stati sottoposti alla fase di cottura in laboratorio, fase avvenuta utilizzando una piastra riscaldante con termometro collegato ed una pentola coperta con carta d'alluminio ed avvolta da panni. La presenza del termometro collegato alla piastra ha permesso di impostare la temperatura da raggiungere (pari a 90 °C) ed una volta raggiunto tale valore i lupini sono stati lasciati cuocere per ulteriori 15 minuti successivamente ai quali sono stati scolati e l'acqua di cottura lasciata raffreddare. I lupini sono stati introdotti a freddo e durante la fase di cottura non sono stati agitati seppur la pentola sia stata smossa periodicamente al fine di miscelare il suo contenuto ed evitare stratificazioni. La fase di cottura (Figura 5.1) è stata ripetuta 5 volte nel corso di questo lavoro al fine di produrre i campioni necessari per i diversi cicli di prove ed in media il raggiungimento dei 90 °C è avvenuto dopo circa un'ora.



**Figura 5.1** - Lupini secchi (a sinistra), piastra riscaldante in fase di cottura (al centro) e lupini con acqua post cottura (a destra)

## 5.2 DESCRIZIONE DEI PRETRATTAMENTI

In questa sezione vengono discussi i diversi pretrattamenti effettuati sull'acqua di cottura. In sintesi, i pretrattamenti sono i seguenti:

- Pretrattamento termico (gruppo 1)
- Pretrattamento termo-basico (gruppo 2)
- Pretrattamento termo-acido (gruppo 3)
- Pretrattamento enzimatico (gruppo 4)
- Pretrattamenti misti e campione portoghese (gruppo 5).

Il quinto gruppo di prove consiste nella ripetizione di alcuni pretrattamenti facendo solamente variare alcuni parametri. In aggiunta è stata fatta una prova di BMP su un campione proveniente da una ditta portoghese: esso deriva dalla fase di cottura successiva alla quale i lupini rimangono immersi per circa 24 ore nella stessa acqua. Le caratteristiche dei reflui portoghesi saranno descritte direttamente insieme ai risultati delle prove.

I campioni ottenuti su cui successivamente sono state effettuate le prove di BMP vengono raggruppati in tabella 5.2.

**Tabella 5.2** – Elenco campioni sottoposti a prove di BMP

<b>GRUPPO 1</b>	<b>GRUPPO 2</b>	<b>GRUPPO 3</b>	<b>GRUPPO 4</b>	<b>GRUPPO 5</b>
Cottura non trattata	Cottura non trattata	Cottura non trattata	Cottura non trattata	Cottura non trattata
Cottura 80 °C-30 minuti	Cottura + NaOH 80 °C-30 minuti	Cottura + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 80 °C-30 minuti	Cottura + Enzima 24 ore – 11 U/g	Cattura 7 giorni a 50 °C
Cottura 80 °C-60 minuti	Cottura + NaOH 80 °C-60 minuti	Cottura + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 80 °C-60 minuti	Cottura + Enzima 24 ore – 571 U/g	Cottura + Enzima 7 giorni - 11 U/g
Cottura 100 °C-30 minuti	Cottura + NaOH 100 °C-30 minuti	Cottura + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 100 °C-30 minuti	Cottura + Enzima 90 ore – 11 U/g	Cottura + NaOH (pH = 11)
Cottura 100 °C-60 minuti	Cottura + NaOH 100 °C-60 minuti	Cottura + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 100 °C-60 minuti	Cottura + Enzima 90 ore – 571 U/g	Resting Ditta portoghese

Nei prossimi paragrafi saranno approfonditi singolarmente i primi quattro cicli di prove.

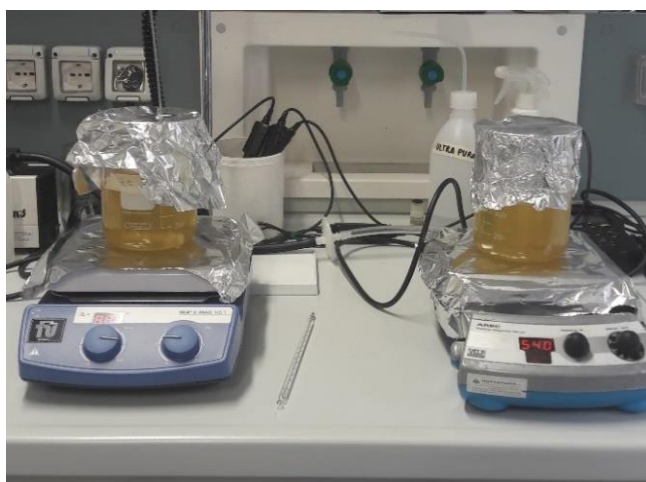
### 5.2.1 Pretrattamento termico

Il pretrattamento termico è avvenuto sottoponendo il campione di acqua di cottura a stress termico combinando due diverse durate del trattamento (30 e 60 minuti) con due diverse temperature (80 °C e 100 °C) al fine di valutare l'effetto di entrambi i parametri. Per il riscaldamento sono state utilizzate due piastre riscaldanti (Figura 5.2), una delle quali è stata



impostata in modo tale da raggiungere la temperatura fissa di 80 °C mentre con la seconda è stato portato a ebollizione il campione. Una volta raggiunta la temperatura desiderata è stato fatto partire il timer per controllare la durata del trattamento.

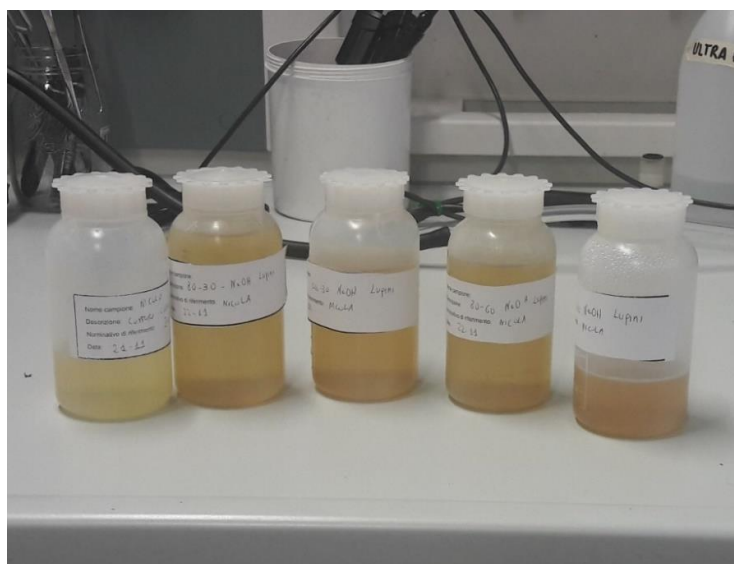
Attraverso l'uso di un'ancoretta magnetica è stato possibile mescolare continuamente il contenuto dei becker i quali dopo i primi 30 minuti sono stati svuotati per metà e i volumi di campione rimossi lasciati a raffreddare. Passati altri 30 minuti il trattamento si è considerato concluso e dopo aver lasciato raffreddare i campioni, sono state condotte alcune analisi di caratterizzazione (COD, TKN, pH, conducibilità).



**Figura 5.2** – Piastre con becker durante l'esecuzione del trattamento termico.

### 5.2.2 Pretrattamento termo-basico

In tale ciclo di prove si è voluto testare l'effetto di un pretrattamento basico sull'acqua di cottura ed a tal fine è stata preparata una soluzione 12 M di NaOH che è servita per portare il pH dei campioni di acqua di cottura fino a un valore di circa 9.2. Si è deciso infatti di portare il campione ad un valore di pH sufficientemente superiore rispetto il pH naturale ma non estremo in modo da non alterare eccessivamente la sua composizione. Successivamente a tale fase i campioni sono stati sottoposti a stress termico con stesse modalità e stessi valori di durata e temperatura come avvenuto nel primo ciclo di prove.



**Figura 5.3** – Campioni prodotti dopo il trattamento termo-basico.

Dopo averli lasciati raffreddare i campioni sono stati riportati a valori neutri di pH attraverso l'utilizzo di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 5.2.3 Pretrattamento termo-acido

In questo ciclo di prove si è testato l'effetto di un attacco acido combinato con il trattamento termico seguendo la stessa metodologia applicata nel ciclo di prove precedente. In tal caso però il primo passo è stato quello di utilizzare una soluzione 2 M di acido solforico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> per abbassare il pH fino ad un valore di 4.0 e, dopo aver effettuato il trattamento termico, il pH dell'acqua di cottura è stato riportato alla neutralità attraverso l'utilizzo di NaOH. Visto che nei cicli di prove precedenti è stata osservata una forte evaporazione di campione, in questo ciclo si è deciso di utilizzare delle beute lasciando però invariati i parametri di pretrattamento (durata e temperatura)



**Figura 5.4** – Piastre con beute durante l'esecuzione del trattamento termo-acido.

## 5.2.4 Pretrattamento enzimatico

Nel quarto gruppo di prove si è testato l'effetto di un enzima a base di proteasi sull'acqua di cottura. La scelta di tale enzima è legata alla possibilità che nell'acqua di cottura vi sia una frazione di COD associato a proteine difficili da degradare pertanto l'azione enzimatica della proteasi potrebbe essere d'aiuto nella scomposizione delle proteine e dunque incrementare la biodegradabilità del refluo. La presenza di proteine nell'acqua di cottura è confermata anche dai dati di letteratura come descritto nel paragrafo 3.4 secondo cui il contenuto proteico del seme di lupino diminuisce dopo la cottura.

### 5.2.4.1 Caratteristiche dell'enzima selezionato

L'enzima selezionato è la proteasi, selezionata tenendo conto della possibile presenza di composti proteici difficili da idrolizzare nelle prime fasi della digestione anaerobica. Il prodotto utilizzato in laboratorio si trova in forma liquida in una bottiglietta di vetro da 50 ml (figura 5.5), presenta un'attività enzimatica minima pari a 500 U per grammo di enzima e una densità nel range 1.10 - 1.30 g/ml. Per assenza di dati riguardo il contenuto organico dell'enzima, la misura è stata fatta in laboratorio ottenendo un valore di COD pari a 0.46 g COD/g enzima.

### 5.2.4.2. Impostazione del trattamento

In questo ciclo di prove si è operato sottoponendo il campione a due diverse dosi di enzima per ognuna delle quali sono state scelte due durate del tempo di contatto enzima-substrato. A causa della scarsa presenza di dati di letteratura a cui riferirsi per ricavare delle dosi di riferimento di enzima da dosare per grammo di COD del substrato (U/ g COD), si è deciso di testare due dosi abbastanza diverse tra loro.

Le due dosi selezionate risultano pari a 10 U/g COD e 500 U/g COD mentre per quanto riguarda i tempi di contatto è stato scelto di lasciare a contatto enzima e substrato sia per 24 ore che per una durata di oltre 3 giorni corrispondente a circa 90 ore. A causa di un valore del COD del substrato leggermente inferiore a quello ipotizzato al momento del calcolo della quantità di enzima da usare, la dose effettiva risulta leggermente superiore rispetto quella fissata inizialmente e pari rispettivamente a 11 U/g COD e 571 U/g COD. In termini di concentrazione di enzima per litro di substrato le dosi risultano rispettivamente pari a 0.24 e 12 g/L. Per creare le giuste condizioni favorevoli all'azione dell'enzima, il pH del campione è stato portato ad un valore pari a circa 4.5 tramite aggiunta di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed infine il trattamento è stato avviato ponendo

le bottiglie in termostato a 50 °C, in accordo alle informazioni ricavate da studi precedenti in cui è stato impiegato lo stesso enzima (paragrafo 2.4.4.1).



**Figura 5.5** – Bottiglia di enzima (a sinistra) e campioni dopo dosaggio enzima (a destra).

Al termine delle ore stabilite di trattamento, il campione è stato riscaldato ad una temperatura superiore a 60 °C per 15 minuti al fine di bloccare l'attività enzimatica ed infine il pH riportato vicino alla neutralità con una soluzione di soda 3M.

## 5.3 METODI ANALITICI

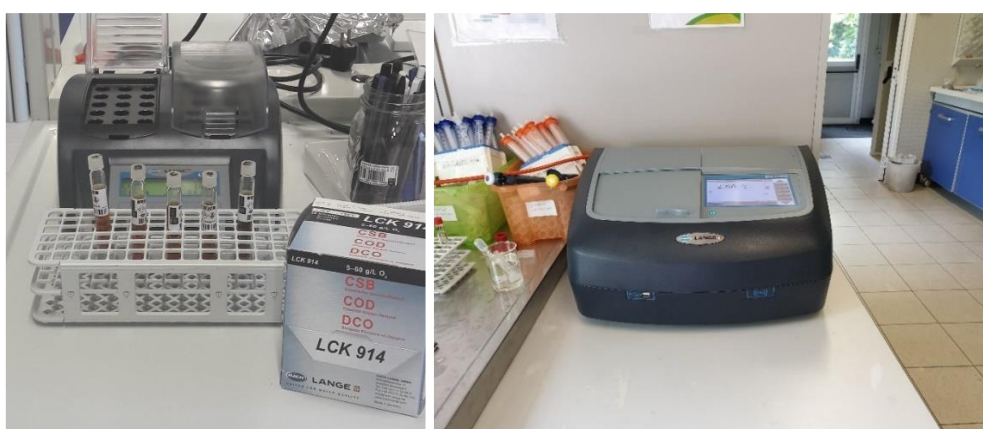
In questa sezione vengono descritte le metodologie di analisi e gli strumenti utilizzati per la caratterizzazione dei campioni di acqua di cottura tal quale e di quelli sottoposti a pretrattamento.

### 5.3.1 Misure di COD

Il COD rappresenta la quantità di ossigeno richiesto per l'ossidazione chimica della sostanza organica e quindi del carbonio presente nel campione. Nel corso di questo lavoro la misura di COD sui campioni di acqua di cottura prima e dopo pretrattamento è stata fatta direttamente sul campione liquido tal quale, dato il basso contenuto di solidi. Al contrario, per valutare il COD residuo al termine delle prove di degradabilità anaerobica è stato necessario effettuare tali misure sul digestato, pertanto è stato prima necessario centrifugare il campione e poi filtrarlo a 0.45 µm tramite filtro per siringa. Le misure di COD sono avvenute utilizzando i kit della Hach

Lange che consistono in provette con reagenti predosati che permettono una misura precisa, veloce e in massima sicurezza (figura 5.6). In funzione dell'intervallo di concentrazione di COD che ci si attende dal campione che stiamo per misurare, esistono diversi kit e qualora necessario è possibile utilizzare i kit su campioni diluiti per rientrare nei range richiesti.

Nello specifico nel corso della sperimentazione sono stati usati i kit LCK914 e LCK514 (range di 5 - 60 g COD/L e 100 - 2000 mg COD/L) rispettivamente per i campioni di acqua di cottura e per il surnatante del digestato a fine prova. La misura viene effettuata dosando la quantità di campione richiesta, chiudendo la provetta ed agitandola per poi lasciarla in termostato a 148 °C per due ore. Dopo tale periodo di tempo si lascia raffreddare la provetta e si può infine leggere la misura di COD tramite spettrofotometro.



**Figura 5.6** – Kit per il COD con termostato (a sinistra) e spettrofotometro per la lettura della misura (a destra).

### 5.3.2 Determinazione dell'azoto ammoniacale

L'azoto ammoniacale è stato determinato tramite l'uso di kit della Hach Lange (LCK303) per l'intervallo di concentrazione 2 - 47 mg N-NH<sub>4</sub>/L. Al fine di poter effettuare le misure sul digestato è stato necessario effettuare una diluizione con acqua deionizzata. La lettura della misura è stata effettuata seguendo la procedura riportata dal kit e tramite lo spettrofotometro che ha riportato i valori direttamente in mg N-NH<sub>4</sub>/L.

### 5.3.3 Determinazione dei solidi sospesi totali e solidi sospesi volatili

La stima di SST (Solidi Sospesi Totali) e SSV (Solidi Sospesi Volatili) sui campioni liquidi trattati è stata effettuata esclusivamente durante il primo ciclo di trattamento. Tale misura è stata fatta utilizzando il sistema di filtrazione da laboratorio (Figura 5.7) e dei filtri in fibra di vetro capaci di resistere alle temperature tipiche della muffola (550 - 600 °C).



**Figura 5.7** – Strumento per la filtrazione dei campioni.

La misura avviene pesando il filtro dopo che esso è stato essiccato. Il filtro viene inserito nell'apparato filtrante e si filtra un volume di campione liquido noto. Il filtro e i solidi trattenuti vengono messi in stufa a 105 °C per due ore e poi prelevati, fatti raffreddare in un essiccatore per 30 minuti e dunque pesati.

Se ne ricava la concentrazione di SST come:

$$SST \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{\text{peso dopo } 105 \text{ } ^\circ C - \text{peso filtro}}{\text{volume filtrato}} \quad (5.1a)$$

Il filtro viene successivamente messo in muffola a 550 °C per circa un'ora dopo la quale viene rimosso, lasciato raffreddare in essiccatore e infine pesato.

La concentrazione di SSV si ricava come:

$$SSV \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{\text{peso dopo } 105 \text{ } ^\circ C - \text{peso dopo } 550 \text{ } ^\circ C}{\text{volume filtrato}} \quad (5.1b)$$

#### 5.3.4 Misure svolte da altri operatori

Oltre alle analisi sopra citate, ulteriori misure sono state svolte da altri operatori del laboratorio. Durante il corso delle prove sperimentali è stato necessario effettuare anche analisi di azoto in termini di TKN, misure del COD totale tramite l'uso di una soluzione di bicromato di potassio  $K_2Cr_2O_7$  in presenza di acido solforico concentrato e valutazione dei VFA presenti al termine di prove di degradazione anaerobica. Sono state effettuate inoltre delle misure di proteine all'interno dei campioni di acqua di cottura tal quale e pretrattata con enzima per valutare un'eventuale diminuzione delle stesse. Queste ultime misure sono state effettuate utilizzando il kit della Sigma-Aldrich (TP0300) per la misura delle proteine totali (Total Protein kit, Micro-Lowry, Peterson's modification). Infine, sono state eseguite delle prove per la stima del  $BOD_5$

e BOD<sub>20</sub> di diversi campioni tra cui l'acqua di cottura e il surnatante del digestato al termine delle prove di BMP.

#### 5.4 STIMA DELLA BIODEGRADABILITÀ DEI REFLUI

Per capire quanto un refluo sia biodegradabile è necessario confrontare la produzione di metano misurata a fine prova con un valore di riferimento di metano atteso. Tale valore viene ricavato a partire dal bilancio del COD, valido nel caso di processi anaerobici (relazione 5.2).

$$COD_{substrato\ rimosso} = COD_{prodotti} + COD_{biomassa} \quad (5.2)$$

Ipotizzando inizialmente trascurabile il COD dovuto alla nuova biomassa formata, è possibile semplificare il bilancio assumendo che il COD rimosso sia uguale al COD dei prodotti. Il biogas è formato principalmente da CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> ma quest'ultima ha COD nullo non essendo ulteriormente ossidabile pertanto il COD dei prodotti è pari al COD del solo metano calcolabile secondo la reazione di ossidazione:



Ne risulta che servono due moli di ossigeno per ossidare una mole di metano e passando per i pesi molecolari si ricava un fattore pari a 0.25 g CH<sub>4</sub>/g COD. Utilizzando il volume molare standard pari a 22.4 L/mol è possibile esprimere la quantità di metano in termini di volume normale per grammo di COD rimosso pari a 0.35 Nm<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/ kg COD.

Tale fattore indica che per ogni chilogrammo di COD rimosso sono attesi al massimo 0.35 Nm<sup>3</sup> di metano prodotto. Per tenere conto del consumo di COD dovuto alla crescita batterica in tale lavoro si è utilizzato un fattore leggermente ridotto e pari a 0.33 Nm<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/ kg COD.

A questo punto è possibile stimare la biodegradabilità di un refluo nota la produzione di metano misurata a fine prova ed espressa in termini di litri normali prodotti per grammo di COD inizialmente presenti:

$$Biodegradabilità\ (\%) = 100 \cdot \frac{P_s}{330 \frac{Nml}{g\ COD}} \quad (5.4)$$

dove  $P_s$  è la produzione specifica di metano relativa alla prova conclusa [Nml CH<sub>4</sub>/g COD].

## 5.5 PROVE DI BMP

La misura della degradabilità anaerobica dei reflui pretrattati è avvenuta attraverso le prove di BMP. Esse consistono in prove batch in cui il substrato è messo a contatto con l'inoculo in ambiente anaerobico e con opportune condizioni di pH, temperatura e quantità di nutrienti disponibili ai microrganismi. Dopo aver predisposto la prova, viene lasciato un tempo variabile da 30 a 90 giorni durante il quale la miscela viene continuamente agitata e in cui avviene la degradazione del substrato mediante reazioni di ossidoriduzione. Esistono due modalità principali di stima della produzione di metano, una di tipo manometrico e una di tipo volumetrico. Nel corso di questa tesi è stato utilizzato principalmente il metodo con misura manometrica sebbene siano state fatte anche delle prove di tipo volumetrico pertanto segue la descrizione di entrambi i metodi di stima del BMP.

### 5.5.1 Misura manometrica del BMP

#### 5.5.1.1 Preparazione della prova

Le prove sono state condotte in bottiglie di vetro da 330 ml disposte di tappo impermeabile al gas e di una ghiera metallica utile a sigillare il contenuto della bottiglia stessa. Le fasi per la preparazione della miscela vengono elencate di seguito:

1. Inserimento inoculo
2. Dosaggio dei nutrienti
3. Dosaggio del substrato
4. Diluizione con acqua corrente
5. Controllo del pH ed eventuale aggiunta di  $\text{NaHCO}_3$

Una volta preparata la miscela, le bottiglie vengono chiuse e sigillate mediante l'aiuto di nastro isolante. Per creare un ambiente anaerobico all'interno delle prove viene insufflato dell'azoto gassoso  $\text{N}_2$  per un tempo di almeno 5 minuti. A questo punto le bottiglie vengono messe in un termostato dotato di agitatore meccanico (figura 5.8) per un tempo di circa due ore durante le quali il sistema raggiunge un equilibrio tra pressione e temperatura. Il riscaldamento iniziale causa un incremento di pressione nella bottiglia non dovuto alla produzione di biogas pertanto è necessario effettuare uno sfiato dopo cui le bottiglie vengono rimesse in termostato e la prova avere inizio.





**Figura 5.8** – Termostato con bottiglie incubate (a sinistra) e sistema di sfiato (a destra).

Nel corso della prova la produzione di biogas viene monitorata attraverso l'incremento della pressione interna alle bottiglie, misurata tramite l'uso di un manometro. Tale pressione può raggiungere valori eccessivamente elevati per la tenuta delle bottiglie, pertanto in tali casi è necessario effettuare un ulteriore sfiato al fine di evitare perdite di biogas o un'eventuale rottura della bottiglia. Nel corso delle prove effettuate, lo sfiato è stato fatto al raggiungimento di una pressione di circa 1.6 bar. Durante le fasi di sfiato e al termine della prova viene fatta un'analisi del gas tramite gas cromatografo (GC) per valutare la concentrazione dei gas presenti all'interno della bottiglia (% v/v di gas secco sul totale).

Le prove sono state condotte in triplicati in modo da avere sullo stesso campione 3 esiti finali e poter verificare così la ripetibilità dell'esperimento.

#### *5.5.1.2 Caratteristiche dell'inoculo*

L'inoculo impiegato durante le prove di BMP è stato prelevato da un impianto di depurazione e proviene da un digestore anaerobico che lavora in mesofilia. Al fine di diminuire al massimo la produzione di biogas endogena dovuta all'inoculo esso è stato prima sottoposto ad una fase di "degassamento" che consiste nel lasciare l'inoculo per almeno 5 giorni a 35 °C senza nutrienti e senza substrato in modo da effettuare una predigestione prima dell'inizio dei test.

Al fine di determinare correttamente i rapporti F/M è sempre necessario effettuare delle misure di solidi totali e volatili dell'inoculo. Tale misura viene fatta tramite l'uso di crogioli che vengono pesati e poi riempiti con una quantità di inoculo nota. I crogioli vengono posti in stufa a 105 °C per 24 ore e poi spostati in muffola per almeno due ore. Il calcolo dei solidi totali e volatili viene ottenuto come:

$$ST \left( \frac{g \text{ ST}}{kg \text{ inoculo}} \right) = \frac{\text{peso dopo } 105 \text{ }^\circ\text{C} - \text{tara}}{\text{peso umido} - \text{tara}} \cdot 1000 \quad (5.5a)$$

$$SV \left( \frac{g \text{ SV}}{kg \text{ inoculo}} \right) = \frac{\text{peso dopo } 105 \text{ }^\circ\text{C} - \text{peso dopo } 550 \text{ }^\circ\text{C}}{\text{peso umido} - \text{tara}} \cdot 1000 \quad (5.5b)$$

Nel corso dei test effettuati l'inoculo ha presentato una frazione di SV quasi sempre pari a circa 16 g SV/kg tal quale, eccezion fatta per il quinto ciclo di prove manometriche in cui è stato ottenuto un valore di circa 11 g/kg.

### 5.5.1.3 Nutrienti

L'aggiunta di nutrienti durante la preparazione della prova è necessaria al fine di garantire ai microrganismi il giusto apporto di sali minerali e sostanze necessarie per la loro crescita. Le soluzioni di nutrienti contengono inoltre sostanze tampone utili a mantenere il pH stabile durante le reazioni di ossidoriduzione che prevedono il rilascio di acidi volatili. La quantità di nutrienti da dosare viene valutata come una percentuale del volume totale della miscela. Nello specifico vi sono tre tipologie di soluzioni che sono state utilizzate, contrassegnate come soluzione A, B, e C (tabella 5.3). Le prime due sono state dosate in quantità pari al 5% del volume della miscela, la terza in percentuale pari al 1%.

**Tabella 5.3** -Composizione delle soluzioni di nutrienti utilizzate nella preparazione delle prove.

<b>Soluzione madre A</b>	
<i>Sostanza</i>	<i>Concentrazione (g/l)</i>
Diidrogenofosfato di potassio anidro (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5,4
Idrogenofosfato di sodio dodecaidrato (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O)	22,4
Cloruro di ammonio (NH <sub>4</sub> Cl)	10,6
<b>Soluzione madre B</b>	
<i>Sostanza</i>	<i>Concentrazione (g/l)</i>
Cloruro di calcio diidrato (CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	1,5
Cloruro di magnesio esaidrato (MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	2,0
Cloruro di ferro (II) tetraidrato (FeCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O)	0,4
<b>Soluzione madre C</b>	
<i>Sostanza</i>	<i>Concentrazione (g/l)</i>
Cloruro tetraidrato di manganese (MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O)	0,05
Acido borico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0,005
Cloruro di zinco (ZnCl <sub>2</sub> )	0,005
Cloruro (II) di rame (CuCl <sub>2</sub> )	0,003
Molibdato di sodio biidrato (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	0,001
Cloruro di cobalto esaidrato (CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	0,1
Cloruro di nichel esaidrato (NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	0,01
Selenito di sodio (Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> )	0,005

#### *5.5.1.4 Rapporto F/M*

Il rapporto Food to Microorganism è l'indice utilizzato per valutare la quantità di substrato da utilizzare una volta fissata la quantità di inoculo da inserire nel volume di prova. Esso rappresenta la quantità di substrato presente (in termini di SV o di COD) rispetto alla quantità di inoculo espresso in termini di solidi volatili.

Il rapporto F/M selezionato durante la fase di impostazione delle prove è pari a 0.4 g COD per grammo di SV di inoculo. È sconsigliato lavorare a F/M troppo elevati specialmente nel caso di substrati rapidamente biodegradabili poiché vi è il rischio di un accumulo di acidi volatili e poiché viene favorita una eventuale inibizione da sostanze presenti nel substrato. Al contrario F/M troppo bassi (fino a 0.1 g COD/g SV) hanno come svantaggio il fatto che la produzione di metano da substrato sia confondibile con quella endogena generata dall'inoculo.

#### *5.5.1.5 pH e temperatura*

Per tutta la durata della prova le bottiglie sono state mantenute in termostato in condizioni di mesofilia, più nello specifico alla temperatura di 35 °C.

Altro parametro fondamentale per la riuscita della prova è il pH. Durante la preparazione delle prove ci si assicura che la miscela presenti un pH nel range 7.5 - 8.5 e se necessario si opera ad una correzione. Nel corso delle prove in alcuni casi è stato necessario correggere il pH mediante l'uso di  $\text{NaHCO}_3$  ed in genere le prove sono state avviate con un pH di circa 7.5. Al termine delle prove si misura nuovamente il pH al fine di verificare che non vi sia stato un abbassamento eccessivo dovuto ad accumulo di VFA.

#### *5.5.1.6 Bianco*

Insieme alle prove con inoculo e substrato è sempre necessario effettuare delle prove la cui miscela sia composta da solo inoculo, nutrienti e acqua di diluizione. Tale prova viene definita "bianco" ed ha lo scopo di valutare la produzione di metano che deriva dalla sola attività batterica. Tale quantità seppur bassa non può ritenersi trascurabile pertanto va sottratta al valore finale di BMP al fine di non sovrastimare la produzione di metano legata al substrato. La preparazione dei bianchi avviene con stesse quantità di inoculo e nutrienti usati nelle prove con substrato, l'acqua di diluizione invece risulta maggiore per compensare l'assenza di substrato e lasciare così lo stesso spazio di testa.

### 5.5.1.7 Durata della prova

Le prove di BMP non hanno una durata prefissata. Alcune prove possono ritenersi concluse in soli 15 giorni, altre possono durare anche fino a 90 giorni. Un criterio per stabilire quando concludere una prova consiste nel verificare che la produzione netta giornaliera di metano risulti essere inferiore all'1% del volume totale cumulato netto di metano prodotto fino a quel giorno, per 3 giorni consecutivi. Tale criterio può non valere nei casi di sostanze lentamente biodegradabili o con presenza di inibenti pertanto può essere utile in alcuni casi attendere qualche giorno in più.

Le prove effettuate per questa tesi hanno avuto tutte una durata di almeno 30 giorni ma è stato osservato che già dopo i primi 15 giorni di prova l'incremento di pressione nello spazio di testa era quasi impercettibile, anzi in alcuni casi la perdita di gas dovuta alla misurazione col manometro provocava una diminuzione della pressione nello spazio di testa rispetto all'ultimo valore rilevato.

### 5.5.1.8 Stima del metano prodotto

Il volume di metano prodotto viene calcolato a partire dalle misure di pressione effettuate col manometro. Il calcolo del volume di biogas umido prodotto viene calcolato applicando la legge dei gas perfetti allo spazio di testa:

$$\Delta V_{biogas,umido} = V_{testa} \cdot \frac{\Delta P}{P_{rnf}} \cdot \frac{T_{rif}}{T_{op}} \quad (5.6)$$

Dove:

- $\Delta V_{biogas,umido}$  rappresenta il volume di gas umido prodotto durante la prova (Nml);
- $V_{testa}$  rappresenta il volume dello spazio di testa (L);
- $\Delta P$  rappresenta il delta di pressione tra inizio e fine prova, depurato dall'effetto della creazione di vapore acqueo in fase gassosa (bar);
- $P_{rif}$  rappresenta la pressione di riferimento in condizioni normali, pari a 1.013 bar;
- $T_{rif}$  rappresenta la temperatura di riferimento in condizioni normali, pari a 273.15 kelvin;
- $T_{op}$  rappresenta la temperatura operativa nel nostro caso pari a 308.15 kelvin;

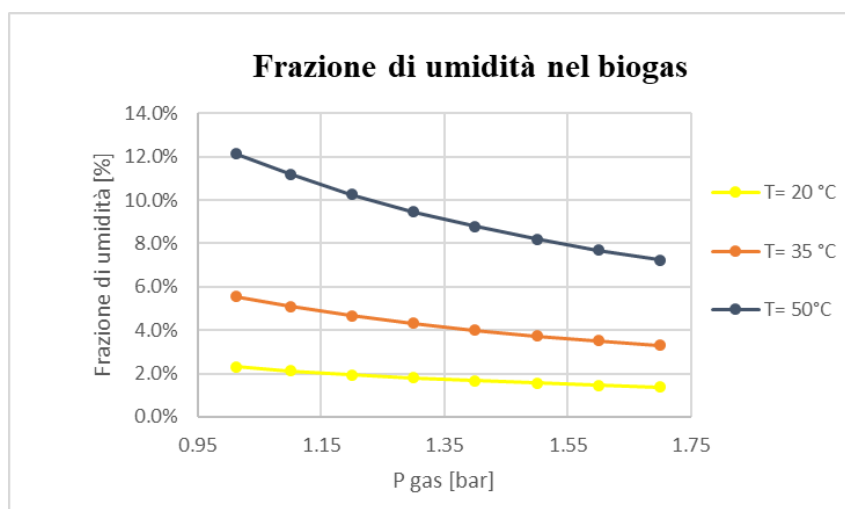
Una volta ricavato il volume umido di gas prodotto è necessario tenere conto del contenuto di umidità in esso presente e rimuovere tale frazione in modo da poter esprimere il volume di biogas in termini di gas secco.

Tale operazione è stata fatta seguendo la stessa procedura di stima del contenuto di umidità utilizzata dal software dell'AMPTS per la stima volumetrica del BMP. La formula utilizzata si basa sull'equazione di Antoine per la stima della pressione di vapore ed ha la seguente espressione:

$$f_w = 1 - \frac{p_{vap}}{p_{gas}} = 1 - \frac{10^{\frac{8.1962 - \frac{1730.63}{233.426 + t_{gas}}}}}{10 \cdot (p_{gas} + 0.6)} \quad (5.7)$$

Con  $t_{gas}$  espressa in °C e  $p_{gas}$  espressa in kPa. Il fattore correttivo di 0.6 presente al denominatore è stato trascurato in fase di calcolo poiché è adatto alla stima dell'umidità solo se riferita agli strumenti volumetrici AMPTS.

L'equazione assume che la pressione di vapore sia proporzionale al volume di gas (secondo la legge dei gas perfetti) e stima la frazione di umidità come rapporto tra la pressione di vapore e la pressione totale del gas (Bioprocess Control, 2016). Il tenore di umidità in funzione della pressione interna alle bottiglie è visualizzabile in figura 5.9 per tre diverse temperature.



**Figura 5.9** – Umidità nel gas in funzione della pressione totale per diversi valori di temperatura.

Le percentuali di gas rilevate dal GC nella fase finale della prova possono essere applicate al volume di biogas secco prodotto per avere una stima del solo metano generato. Tali misure sono espresse come percentuale di gas rispetto al volume totale di gas secco e per tale motivo è stato necessario tenere conto della frazione di umidità presente nel biogas umido e rimuoverla.

Il volume di metano prodotto (Nml) viene ricavato come:

$$V_{CH_4 \text{ prodotto}} = \Delta V_{biogas, secco} \cdot \frac{\%CH_4}{\%CH_4 + \%CO_2 + \%H_2} \quad (5.8)$$

La relazione 5.8 tiene conto del fatto che il biogas generato sia composto esclusivamente da metano, anidride carbonica ed eventualmente idrogeno. Nel caso specifico di questo lavoro non era presente idrogeno pertanto la relazione teneva conto del solo contributo di CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

In alcune delle prove svolte durante i diversi cicli di trattamento è stato necessario sfiatare una volta le bottiglie contenenti inoculo più substrato. I bianchi, al contrario, non sono mai stati sfiatati. In tali casi il calcolo del metano prodotto è avvenuto con lo stesso metodo sopra descritto ed effettuando un minimo di due analisi del gas, la prima subito prima dello sfiato e la seconda al termine della prova. Il volume di metano prodotto è stato infine ricavato come somma del metano prodotto prima dello sfiato e quello residuo nello spazio di testa rilevato alla fine della prova.

#### *5.5.1.9 Commenti sul metodo manometrico*

Il metodo manometrico è spesso utilizzato per avere un'idea preliminare della biodegradabilità di un refluo. I principali vantaggi associati ad esso consistono nella possibilità di decidere la frequenza di campionamento delle pressioni e la reperibilità degli strumenti necessari all'esecuzione della prova, strumenti poco costosi e presenti in molti laboratori.

Tale metodo presenta anche alcuni svantaggi che possono influire sui risultati finali in modo più o meno marcato. Innanzitutto, essendo un metodo manuale esso risulta più scomodo e più laborioso dal momento che è necessario misurare manualmente le pressioni durante il corso della prova, effettuare analisi del gas tramite gas cromatografo ed eventualmente sfiatare le bottiglie. Le operazioni di misura delle pressioni e di prelievo di gas per il gas cromatografo possono rappresentare una fonte di errore sui risultati poiché, in base alla frequenza, alla velocità e alla cura con cui tali misure vengono fatte, può avvenire la fuoriuscita di biogas in quantità più o meno trascurabile. In più bisogna tener conto che le perdite di gas possono avvenire anche per altre cause tra cui l'usura nel tempo dei tappi delle bottiglie.

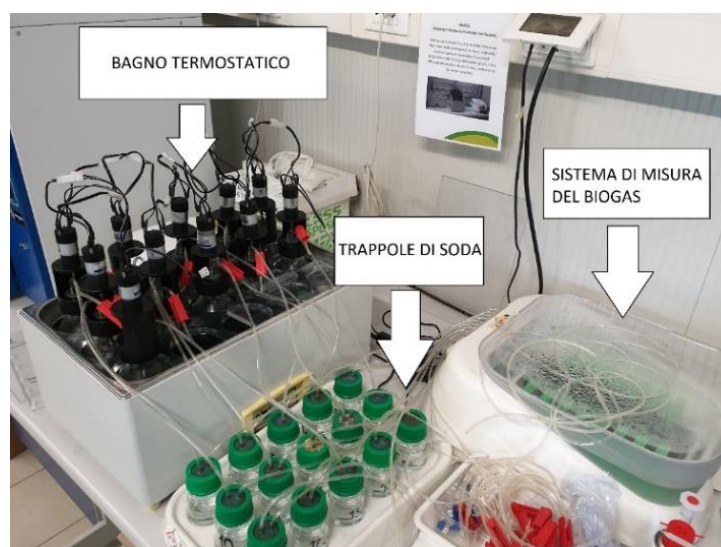
Nonostante tali svantaggi, la possibilità di svolgere un elevato numero di prove in spazi limitati e la flessibilità sulla frequenza di campionamento rendono tale metodo utile nella valutazione del BMP di un substrato e spingono a valutarne la precisione di stima rispetto al metodo di stima volumetrico, descritto nel prossimo paragrafo.

## 5.5.2 Misura volumetrica del BMP

La preparazione della miscela interna alle bottiglie è avvenuta con gli stessi criteri utilizzati per le prove manometriche. La strumentazione impiegata per la misura volumetrica del BMP è visualizzabile in figura 5.10 e consiste in:

- Bottiglie in vetro da 500 ml
- Tubicini di plastica
- Sistema di chiusura con agitatore per la miscelazione
- Bottiglie di vetro per trappola CO<sub>2</sub>
- Bagno termostatico
- Dispositivo di misura manometrica AMPTS

Ogni bottiglia è stata riempita con 480 ml di miscela e successivamente chiusa con gli appositi tappi dotati oltre che di un sistema di agitazione anche di due fori collegabili a due tubicini. Il primo tubo permette di inserire nel reattore sostanze quali ad esempio NaHCO<sub>3</sub> al fine di correggere il pH durante la prova, il secondo invece è quello attraverso cui il biogas fuoriesce dal reattore dirigendosi prima alla trappola per la CO<sub>2</sub> e successivamente alla campanella di raccolta del metano. La trappola consiste in una soluzione 3M di idrossido di sodio NaOH nella quale la CO<sub>2</sub> presente nel biogas viene disciolta: in tal modo il gas che giunge alla campana può ritenersi composto esclusivamente da CH<sub>4</sub> che dunque può essere misurato in modo diretto dal software di registrazione dei dati del sistema AMPTS, noti il numero di sollevamenti della campana e il volume di gas che causa tale sollevamento.



**Figura 5.10** – Strumento AMPTS per prove di BMP volumetriche.

Il sistema volumetrico non produce incrementi di pressione nelle bottiglie pertanto risulta meno soggetto a perdite di biogas. Un'ulteriore punto a favore di tale metodo è il fatto che è possibile osservare in tempo reale l'andamento della prova con verifiche sull'andamento della produzione di metano e con la possibilità di individuare eventuali problemi dovuti ad abbassamenti del pH o ad inibenti ed intervenire immediatamente.

Al termine della prova tramite il software dedicato è possibile scaricare il report relativo alle prove concluse contenente i dati di produzione di metano forniti in condizioni normali ( $T=0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $P=1\text{ atm}$ ) e in termini di gas secco. La frazione di umidità viene calcolata dal software attraverso l'equazione di Antoine come anticipato al paragrafo 5.5.1.8.

### 5.5.3 Impostazione delle prove di BMP svolte

In questo paragrafo vengono raccolti in forma tabulare i dati riguardanti le condizioni operative di ciascuna bottiglia durante i diversi cicli di prove. Per ogni ciclo di trattamento sono state fatte delle prove di BMP anche sull'acqua di cottura tal quale per avere un'idea su quanto il trattamento abbia incrementato o meno la produzione di metano.

**Tabella 5.4** – Condizioni operative di ciascuna bottiglia per il primo gruppo di prove.

<b>GRUPPO 1-TRATTAMENTO TERMICO- BMP MANOMETRICI</b>					
<b>Campione</b>	<b>Inoculo [mL]</b>	<b>Substrato [mL]</b>	<b>F/M [g COD/g SV]</b>	<b>Nutrienti [mL]</b>	<b>Volume miscela [mL]</b>
Bianco - A	50.01	-	-	16.5	150.2
Bianco - B	50.08	-	-	16.5	150.1
Bianco - C	50.01	-	-	16.5	150.0
Cottura Tal Quale - A	50.1	28.85	0.34	16.5	150.2
Cottura Tal Quale - B	50.03	28.80	0.34	16.5	150.0
Cottura Tal Quale - C	50	28.79	0.34	16.5	150.1
Tratt. 80 °C-30 min - A	50.1	30.63	0.34	16.5	150.2
Tratt. 80 °C-30 min - B	50.04	30.64	0.34	16.5	151.8
Tratt. 80 °C-30 min - C	50	30.74	0.34	16.5	150.1
Tratt. 80 °C-60 min - A	50.03	30.37	0.34	16.5	150.2
Tratt. 80 °C-60 min - B	50.06	30.26	0.34	16.5	150.1
Tratt. 80 °C-60 min - C	50	30.26	0.34	16.5	150.1
Tratt. 100 °C-30 min - A	50.01	26.70	0.34	16.5	150.1
Tratt. 100 °C-30 min - B	50.04	26.69	0.34	16.5	150.0
Tratt. 100 °C-30 min - C	50.03	26.74	0.34	16.5	150.1
Tratt. 100 °C-60 min - A	50	17.52	0.34	16.5	150.0
Tratt. 100 °C-60 min - B	50.04	17.54	0.34	16.5	150.1
Tratt. 100 °C-60 min - C	50.01	17.50	0.34	16.5	150.0



Tabella 5.5 – Condizioni operative di ciascuna bottiglia per il secondo gruppo di prove.

<b>GRUPPO 2-TRATTAMENTO TERMO – BASICO - BMP MANOMETRICI</b>					
Campione	Inoculo [mL]	Substrato [mL]	F/M [g COD/g SV]	Nutrienti [mL]	Volume miscela [mL]
Bianco - A	50.03	-	-	16.5	150.0
Bianco - B	50.01	-	-	16.5	150.1
Bianco - C	50	-	-	16.5	150.0
Cottura Tal Quale - A	50.02	25.64	0.41	16.5	150.2
Cottura Tal Quale - B	50.01	25.57	0.41	16.5	150.3
Cottura Tal Quale - C	50	25.55	0.41	16.5	150.1
Tratt. 80 °C- 30 min + NaOH - A	50.03	26.77	0.41	16.5	150.0
Tratt. 80 °C- 30 min + NaOH - B	50	26.79	0.41	16.5	150.0
Tratt. 80 °C- 30 min + NaOH - C	50.03	26.78	0.41	16.5	150.0
Tratt. 80 °C- 60 min + NaOH - A	50.02	25.20	0.41	16.5	150.1
Tratt. 80 °C- 60 min + NaOH - B	50	25.15	0.41	16.5	154.1
Tratt. 80 °C- 60 min + NaOH - C	50.02	25.16	0.41	16.5	150.0
Tratt. 100 °C- 30 min + NaOH - A	50.04	19.34	0.41	16.5	150.1
Tratt. 100 °C- 30 min + NaOH - B	50.03	19.36	0.41	16.5	150.1
Tratt. 100 °C- 30 min + NaOH - C	50	19.30	0.41	16.5	150.0
Tratt. 100 °C- 60 min + NaOH - A	50.04	10.19	0.41	16.5	150.0
Tratt. 100 °C- 60 min + NaOH - B	50	10.26	0.42	16.5	150.1
Tratt. 100 °C- 60 min + NaOH- C	50	10.24	0.41	16.5	150.1

Tabella 5.6a – Condizioni operative di ciascuna bottiglia per il terzo gruppo di prove.

<b>GRUPPO 3-TRATTAMENTO TERMO – ACIDO - BMP MANOMETRICI</b>					
Campione	Inoculo [mL]	Substrato [mL]	F/M [g COD/g SV]	Nutrienti [mL]	Volume miscela [mL]
Bianco - A	50.02	-	-	16.5	150.1
Bianco - B	50.02	-	-	16.5	150.1
Bianco - C	50.06	-	-	16.5	150.1
Cottura Tal Quale - A	50.01	26.41	0.41	16.5	150.1
Cottura Tal Quale - B	50.01	26.41	0.41	16.5	150.1
Cottura Tal Quale - C	50.01	26.42	0.41	16.5	150.1
Tratt. 80 °C- 30 min + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - A	50	28.81	0.41	16.5	150.7
Tratt. 80 °C- 30 min + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - B	50.07	28.21	0.40	16.5	150.1
Tratt. 80 °C- 30 min + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - C	50.01	28.21	0.41	16.5	150.0
Tratt. 80 °C- 60 min + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - A	50	27.27	0.41	16.5	150.0
Tratt. 80 °C- 60 min + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - B	50.03	27.27	0.41	16.5	150.0
Tratt. 80 °C- 60 min + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - C	50.02	27.27	0.41	16.5	151.0
Tratt. 100 °C- 30 min + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - A	50.01	25.19	0.41	16.5	150.1
Tratt. 100 °C- 30 min + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - B	50.05	25.22	0.41	16.5	150.1
Tratt. 100 °C- 30 min + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - C	50	25.19	0.41	16.5	150.0
Tratt. 100 °C- 60 min++ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - A	50.02	22.96	0.41	16.5	150.1
Tratt. 100 °C- 60 min++ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - B	50	22.97	0.41	16.5	150.1
Tratt. 100 °C- 60 min++ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - C	50	23.00	0.41	16.5	150.1

All'interno del terzo gruppo di prove a scopo di confronto è stata fatta una prova volumetrica utilizzando lo stesso campione di acqua di cottura non trattata impiegato nelle prove manometriche di tabella 5.6a. Per motivi di disponibilità di spazio all'interno dell'apparato di misura volumetrica, le prove sono state condotte in doppio e non in triplo.

**Tabella 5.6b** – Condizioni operative delle bottiglie usate per BMP volumetrici nel terzo gruppo di prove.

<b>GRUPPO 3-TRATTAMENTO TERMO – ACIDO - BMP VOLUMETRICI</b>					
<b>Campione</b>	<b>Inoculo [mL]</b>	<b>Substrato [mL]</b>	<b>F/M [g COD/g SV]</b>	<b>Nutrienti [mL]</b>	<b>Volume miscela [mL]</b>
<b>Bianco- A</b>	120.01	-	-	52.80	480.1
<b>Bianco- B</b>	120.04	-	-	52.80	480.0
<b>Cottura Tal Quale- A</b>	120.01	63.38	0.41	52.8	482.7
<b>Cottura Tal Quale- B</b>	120.03	63.36	0.41	52.8	480.1

Il quarto gruppo di prove è relativo al trattamento enzimatico dell'acqua di cottura. La preparazione di una prova con bianco più enzima è servita per poter valutare la quantità di metano associata alla biodegradazione del COD apportato dall'enzima e rimuovere tale stima per avere un valore di produzione netta. Tale prova conteneva una quantità di enzima equivalente a quella presente nelle prove con campione trattato con la dose maggiore di enzima (571 U/ g COD). La quantità di enzima presente nelle altre bottiglie è stata calcolata nota la concentrazione dell'enzima nel campione trattato.

**Tabella 5.7** – Condizioni operative delle bottiglie usate per BMP manometrici nel quarto gruppo di prove.

<b>GRUPPO 4-TRATTAMENTO ENZIMATICO - BMP MANOMETRICI</b>						
<b>Campione</b>	<b>Inoculo [mL]</b>	<b>Substrato [mL]</b>	<b>Enzima [mg]</b>	<b>F/M [g COD/g SV]</b>	<b>Nutrienti [mL]</b>	<b>Volume miscela [mL]</b>
<b>Bianco - A</b>	50.02	-	-	-	16.5	150.0
<b>Bianco - B</b>	50.21	-	-	-	16.5	150.3
<b>Bianco - C</b>	50.12	-	-	-	16.5	150.1
<b>Bianco + Enzima - A</b>	50.03	-	250.0	0.15	16.5	150.4
<b>Bianco+ Enzima - B</b>	50.02	-	270.0	0.16	16.5	150.4
<b>Bianco+ Enzima - C</b>	50	-	250.0	0.15	16.5	150.3
<b>Cottura Tal Quale - A</b>	50.21	31.55	-	0.42	16.5	150.4
<b>Cottura Tal Quale - B</b>	50.03	31.39	-	0.42	16.5	150.1
<b>Cottura Tal Quale - C</b>	50.02	31.37	-	0.42	16.5	150.1
<b>Tratt. 24 ore -11 U - A</b>	50.08	30.27	7.26	0.42	16.5	150.1
<b>Tratt. 24 ore -11 U - B</b>	50.03	30.24	7.26	0.42	16.5	150.0
<b>Tratt. 24 ore -11 U - C</b>	50.17	30.20	7.25	0.42	16.5	150.1
<b>Tratt. 24 ore -571 U - A</b>	50.02	20.32	243.8	0.42	16.5	150.4
<b>Tratt. 24 ore -571 U - B</b>	50.05	20.23	242.8	0.42	16.5	150.3
<b>Tratt. 24 ore -571 U - C</b>	50.11	20.25	243.0	0.42	16.5	150.3
<b>Tratt. 90 ore -11 U - A</b>	49.96	34.46	8.27	0.42	16.5	150.0
<b>Tratt. 90 ore -11 U - B</b>	49.98	34.46	8.27	0.42	16.5	150.3
<b>Tratt. 90 ore -11 U - C</b>	50.02	34.49	8.28	0.42	16.5	150.4
<b>Tratt. 90 ore -571 U - A</b>	50.32	20.75	249.0	0.42	16.5	150.3
<b>Tratt. 90 ore -571 U - B</b>	50.05	20.76	249.1	0.42	16.5	150.0
<b>Tratt. 90 ore -571 U - C</b>	50.03	20.68	248.16	0.42	16.5	149.9

Nel quinto gruppo di prove (tabella 5.8) l'acqua di cottura è stata trattata sia con enzima (con stesse modalità del quarto gruppo di prove ma con durata del contatto pari a 7 giorni e usando solo la dose più bassa), sia con soda ma senza stress termico. Al fine di verificare l'effetto della permanenza in termostato sull'acqua di cottura al netto dell'effetto dovuto all'enzima, è stata preparata una prova in cui l'acqua di cottura non trattata è stata messa nelle stesse condizioni di prova del campione trattato con enzima ovvero alla temperatura di 50 °C per sette giorni consecutivi.

**Tabella 5.8** – Condizioni operative delle bottiglie usate per BMP manometrici nel quinto gruppo di prove.

<b>GRUPPO 5-TRATTAMENTI MISTI- BMP MANOMETRICI</b>					
<b>Campione</b>	<b>Inoculo [mL]</b>	<b>Substrato [mL]</b>	<b>F/M [g COD/g SV]</b>	<b>Nutrienti [mL]</b>	<b>Volume miscela [mL]</b>
Bianco - A	50.04	-	-	16.5	150.10
Bianco - B	50.15	-	-	16.5	150.16
Bianco - C	50	-	-	16.5	150.12
Cottura Tal Quale - A	50.04	33.18	0.60	16.5	150.06
Cottura Tal Quale - B	50.08	33.17	0.60	16.5	150.05
Cottura Tal Quale - C	50.05	33.55	0.61	16.5	150.77
Cottura 7 giorni a 50 °C - A	50	33.92	0.60	16.5	150.11
Cottura 7 giorni a 50 °C - B	50.02	36.57	0.65	16.5	152.69
Cottura 7 giorni a 50 °C - C	50.13	33.91	0.60	16.5	150.14
Cottura + Enzima (12 U) - A	50	32.62	0.61	16.5	150.12
Cottura + Enzima (12 U) - B	50.02	32.47	0.60	16.5	150.00
Cottura + Enzima (12 U) - C	50.01	32.49	0.60	16.5	150.03
Cottura + NaOH (pH 11) - A	50.03	34.67	0.60	16.5	150.05
Cottura + NaOH (pH 11) - B	50.01	34.71	0.60	16.5	150.03
Cottura + NaOH (pH 11) - C	50.03	34.67	0.60	16.5	150.04

Per ultime vengono mostrate in tabella 5.9 le impostazioni delle prove manometriche (blocco superiore) e volumetriche (blocco inferiore) effettuate sul campione di acqua portoghese.

**Tabella 5.9** – Impostazione delle prove di BMP su campione portoghese.

<b>Campione</b>	<b>Inoculo [mL]</b>	<b>Substrato [mL]</b>	<b>F/M [g COD/g SV]</b>	<b>Nutrienti [mL]</b>	<b>Volume miscela [mL]</b>
Bianco - A	50.07	-	-	16.5	100.1
Bianco - B	50.04	-	-	16.5	100.1
Bianco - C	50.00	-	-	16.5	100.1
Resting - A	50.02	10.60	0.40	16.5	100.0
Resting - B	50.12	11.2	0.42	16.5	100.9
Resting - C	50.11	10.6	0.40	16.5	100.2
Bianco - A	350.07	-	-	52.8	480.20
Bianco - B	350.06	-	-	52.8	480.14
Resting - A	350.00	63.13	0.34	52.8	482.1
Resting - B	350.85	63.08	0.34	52.8	481.8
Resting - C	350.03	63.06	0.34	52.8	482.6

#### 5.5.4 Specific Methanogenic Activity

Per valutare l'attività dei microrganismi al termine delle prove di BMP appartenenti al quarto gruppo, è stata effettuata una prova di SMA dosando all'interno delle bottiglie di prova una quantità nota di acetato di sodio e valutando l'entità della biodegradazione dello stesso. Tale substrato è utile per valutare l'attività dei metanigeni, operanti nell'ultima fase del processo anaerobico. Tale test è avvenuto immettendo nelle bottiglie una quantità di substrato limitata in modo da evitare lo sfiato delle stesse ( $F/M = 0.17 \text{ g COD/g SV}_{\text{inoculo}}$ ) e lasciando avvenire la rimozione del substrato nei successivi 7 giorni.

## 6. RISULTATI: ESPOSIZIONE E INTERPRETAZIONE

In questo capitolo verranno esposti e discussi tutti i risultati ottenuti durante il corso della fase sperimentale della presente tesi. Ogni ciclo di prove verrà discusso separatamente, illustrando prima gli effetti del pretrattamento sul campione pretrattato e successivamente i risultati delle prove di BMP svolte. L'entità della biodegradazione viene riportata sia come valore medio della produzione specifica all'interno di ogni triplicato (Nml CH<sub>4</sub>/g COD), sia in termini percentuali di biodegradabilità, come mostrato al paragrafo 5.4. Si ricorda che i valori di COD riferiti all'acqua di cottura (pretrattata e non) si riferiscono al campione tal quale.

Prima di esaminare i risultati dei diversi cicli di prove, vengono riportati in tabella 6.1 i dati di caratterizzazione dell'acqua di cottura prodotta per ognuno dei cinque gruppi.

**Tabella 6.1** – Caratterizzazione campioni preparati in laboratorio.

<b>Ciclo di prove</b>	<b>COD totale</b> g/L	<b>pH</b> Unità pH	<b>Conducibilità</b> ms/cm	<b>TKN</b> mg/kg	<b>N/C</b> %
Trattamento termico	9.73	7.15	1.17	213.1	2.19
Trattamento termo-basico	13	7.44	1.45	[-]	[-]
Trattamento termo-acido	12.5	7.47	1.41	95.9	0.77
Trattamento enzimatico	10.5	7.36	1.55	[-]	[-]
Trattamenti misti	9.89	7.4	1.34	[-]	[-]

Dai dati soprastanti si nota come il COD si mantenga su valori simili tra di loro ma ben inferiori rispetto ai valori di COD dell'acqua di cottura fornita dalla ditta italiana che si aggiravano tra i 17 e i 25 g/L (tabella 3.7). Ciò può essere dovuto a diversi fattori quali innanzitutto le differenti modalità con cui la cottura avviene a livello di laboratorio rispetto a come essa viene svolta in ditta. Un fattore determinante è sicuramente il fatto che in ditta, per questioni di risparmio energetico, non tutta l'acqua di cottura viene scaricata ma una parte di essa viene preservata e miscelata insieme ad acqua pulita per effettuare una nuova cottura. Altri fattori determinanti potrebbero essere la tipologia di semi di lupino impiegati, la pulizia degli strumenti e l'entità dell'evaporazione del volume liquido. Quest'ultimo aspetto è stato anche dimostrato in laboratorio infatti nel secondo e terzo ciclo di prove l'acqua di cottura prodotta è risultata più concentrata rispetto a quella prodotta negli altri cicli per via di un'evaporazione più spinta del campione. Il COD dei campioni prodotti viene espresso come COD sul refluo tal quale. La misura di SSV e SST è stata fatta esclusivamente nel primo ciclo di prove e verrà pertanto illustrata nel prossimo paragrafo. Gli altri parametri risultano simili per i cinque campioni prodotti, ad eccezione del TKN che nel corso della prima cottura è risultato essere oltre il doppio rispetto quello del terzo campione prodotto.

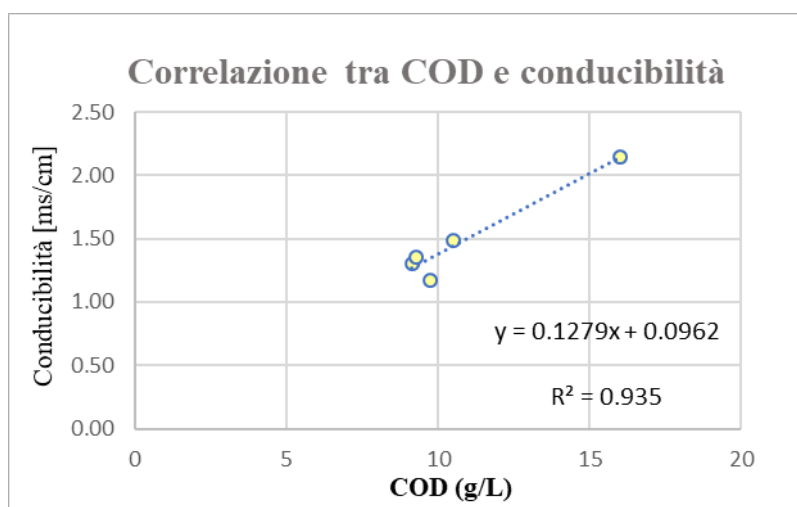
## 6.1 PRIMO GRUPPO DI PROVE - TRATTAMENTO TERMICO

Gli effetti del pretrattamento termico sul campione di acqua di cottura prodotto nel primo gruppo di prove vengono riportati in tabella 6.2.

**Tabella 6.2** –Caratterizzazione dei campioni al termine del pretrattamento termico.

	pH Post trattamento	Conducibilità [mS/cm]	COD [g/L]	TKN [mg/kg]	SST [mg/L]	SSV [mg/L]	SSV/SST [%]
Cottura Tal Quale	7.15	1.17	9.73	213	163	150	92.0
Tratt. 80 °C-30 min	8.02	1.30	9.14	252	435	418	96.1
Tratt. 80 °C- 60 min	8.41	1.36	9.26	368	230	223	97.0
Tratt. 100 °C- 30 min	8.74	1.49	10.5	216	560	520	92.9
Tratt. 100 °C- 60 min	8.83	2.15	16.0	230	1098	1015	92.4

I maggiori effetti osservabili dopo il trattamento consistono in un graduale aumento del pH, della conducibilità e del COD al crescere della temperatura e della durata del trattamento. L'incremento del COD non è dovuto ad una maggiore solubilizzazione della sostanza organica bensì all'evaporazione di parte del campione liquido durante la fase di pretrattamento termico. Lo stesso discorso è valido per la conducibilità la quale risulta legata al COD attraverso una relazione di tipo lineare (figura 6.1).



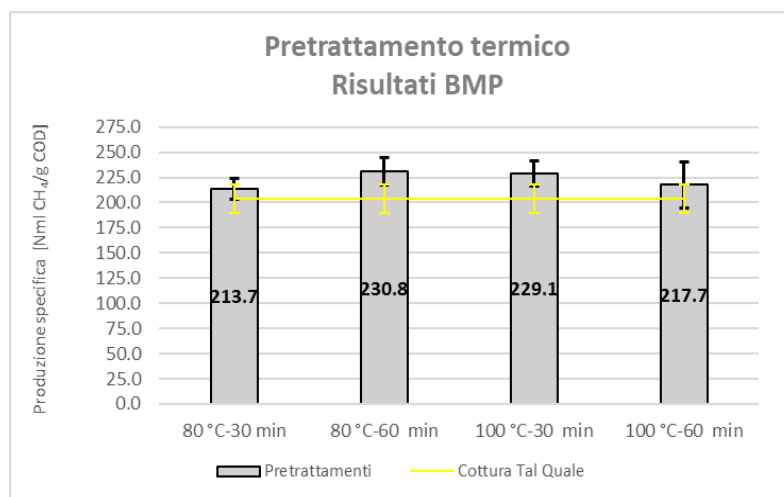
**Figura 6.1** – Correlazione tra COD e conducibilità nei campioni del primo gruppo.

Anche il pH subisce un incremento piuttosto marcato passando da un valore di 7.15 per il campione tal quale ad un valore massimo di 8.83 per il campione trattato 60 minuti a 100 °C. Tale aumento può essere dovuto ad un cambiamento dell'equilibrio dei carbonati e allo strippaggio della CO<sub>2</sub> la cui solubilità tende a diminuire con l'aumento della temperatura. Il contenuto di azoto espresso come TKN non sembra avere invece dipendenze dai parametri di

trattamento ma anzi assume valori costanti ad eccezione del campione trattato ad 80 °C per 60 minuti. Quest'ultimo infatti assume un valore molto più alto ma che è comunque stato confermato anche da una seconda analisi.

### 6.1.1 Risultati dei BMP - Gruppo 1

I risultati delle prove di BMP effettuate sui campioni pretrattati termicamente ed il confronto con il campione non trattato vengono esposti in forma grafica come valore medio di produzione specifica di metano per grammo di COD presente (Nml CH<sub>4</sub>/g COD). La produzione specifica del campione di acqua di cottura tal quale viene rappresentata mediante una linea retta per rendere più immediata la visione dell'effetto del pretrattamento. Ai valori medi di ogni risultato è associata anche la relativa deviazione standard (Figura 6,2).



**Figura 6.2** – Risultati prove di BMP- Primo gruppo di prove

Vengono inoltre esposti in tabella 6.3 i risultati numerici in forma tabulare, utili per visualizzare la produzione netta di metano e i valori percentuali di biodegradabilità.

**Tabella 6.3** – Risultati numerici prove di BMP- Primo gruppo di prove

	Produzione netta media [Nml CH <sub>4</sub> ]	Produzione specifica media [Nml CH <sub>4</sub> /g COD]	Biodegradabilità [%]
<b>Cottura Tal Quale</b>	57.1	203.5 ± 14.4	61.7 ± 4.4
<b>Tratt. 80 °C- 30 min</b>	59.9	213.7 ± 10.1	64.8 ± 3.0
<b>Tratt. 80 °C- 60 min</b>	64.8	230.8 ± 13.4	69.9 ± 4.1
<b>Tratt. 100 °C- 30 min (*)</b>	55.2	229.1 ± 12.4	69.4 ± 3.8
<b>Tratt. 100 °C- 60 min</b>	61.0	217.7 ± 23.2	65.7 ± 7.0

(\*) Prova condotta in doppio e non in triplo per via di problemi legati ad una delle tre prove inizialmente preparate.

Dalle prove è emerso che la produzione di metano si concentra durante i primi 10 giorni di prova. L'acqua di cottura tal quale presenta valori di BMP in linea con quelli riscontrati nelle

prove effettuate in passato (Battello, 2017), corrispondenti ad una biodegradabilità media di quasi il 62%. In seguito ai pretrattamenti sono stati rilevati incrementi di produzione specifica di metano per i campioni pretrattati a 80 °C per 60 minuti (+ 13.4 %) e a 100 °C per 30 minuti (+ 12.5%) con una biodegradabilità media simile, di poco inferiore al 70%. Osservando i valori di deviazione standard è possibile constatare che questi ultimi due trattamenti hanno effettivamente apportato dei miglioramenti, seppur lievi, alla biodegradabilità del refluo dal momento che anche i BMP più bassi ottenuti nei triplicati di queste prove risultano superiori a quelli rilevati per le prove sul substrato non trattato.

Osservando i pretrattamenti effettuati ad 80 °C è possibile dire che all'aumentare della durata del trattamento si ha un maggiore incremento di produzione specifica. Non è possibile dire lo stesso dei trattamenti effettuati a 100 °C dal momento che all'aumentare della temperatura non è stato rilevato un incremento della biodegradabilità bensì una sua diminuzione in termini medi. Sembrerebbe dunque che le migliori combinazioni di trattamento siano rappresentate da durate brevi ed alte temperature oppure basse temperature e durate più lunghe.

## 6.2 SECONDO GRUPPO DI PROVE - TRATTAMENTO TERMO-BASICO

Vengono illustrate in tabella 6.4 le caratteristiche del campione di acqua di cottura non trattata e quelle dei campioni sottoposti a trattamento termo-basico:

**Tabella 6.4** –Caratterizzazione dei campioni al termine del pretrattamento termo-basico

	<b>COD [g/l]</b>	<b>Conducibilità [mS/cm]</b>	<b>pH post trattamento</b>	<b>TKN [mg/kg]</b>
<b>Cottura Tal Quale</b>	13	1.44	[ - ]	-
<b>Tratt. 80 °C - 30 min + NaOH</b>	12.4	2.08	8.91	295.6
<b>Tratt. 80 °C - 60 min + NaOH</b>	13.2	2.18	8.93	300.4
<b>Tratt. 100 °C - 30 min + NaOH</b>	17.2	2.69	9.3	380.4
<b>Tratt. 100 °C - 60 min + NaOH</b>	32.6	4.42	9.29	660.8

Come per il primo ciclo di trattamenti, anche qui si nota un incremento del COD e della conducibilità al crescere della temperatura di trattamento e della durata. Differentemente da prima però si osserva anche un graduale incremento del TKN. L'incremento della concentrazione di sostanza organica e di conducibilità rilevato dopo i pretrattamenti è legato all'evaporazione del campione durante il processo termico. A tal proposito, in tabella 6.5 è stato fatto un bilancio tra la sostanza organica presente inizialmente (stimata sulla base del COD dell'acqua di cottura non ancora trattata) e quella rilevata nei vari campioni tramite misure svolte a fine trattamento.



**Tabella 6.5** –Bilancio del COD e stima entità evaporazione – Gruppo 2.

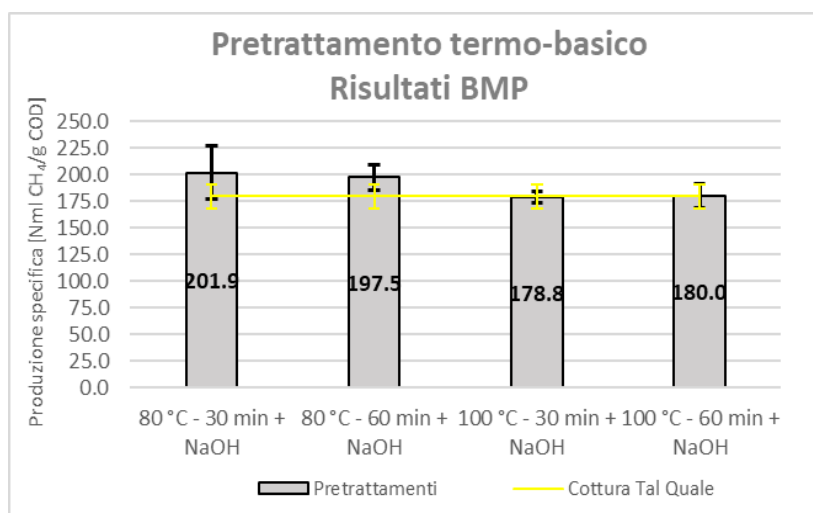
	Volume [ml]	COD [g/L]	COD [g]
<b>VOLUME INIZIALE</b>	1000	13	13
<b>VOLUME RESIDUO</b>			
<b>Tratt. 80 °C - 30 min + NaOH</b>	240	12.4	2.98
<b>Tratt. 80 °C - 60 min + NaOH</b>	220	13.2	2.9
<b>Tratt. 100 °C - 30 min + NaOH</b>	200	17.2	3.44
<b>Tratt. 80 °C - 30 min + NaOH</b>	80	32.6	2.61
<b>SOMMA</b>	740		11.93
<b>Rapporto finale/iniziale [%]</b>	74		91.77

Per la stima del COD inizialmente presente è stato considerato che approssimativamente sono stati usati 500 ml di acqua di cottura tal quale per iniziare il trattamento a 80 °C e 500 ml per quello a 100 °C. Dal bilancio risulta un'entità di evaporazione molto marcata, corrispondente alla perdita di circa il 26% del volume complessivamente trattato. Il bilancio sul COD evidenzia uno scarto pari all'8.2%, dato che potrebbe significare che una frazione del COD estremamente volatile si sia persa durante il pretrattamento termico.

Rispetto al primo gruppo di prove (pretrattamento termico), in tale ciclo il TKN aumenta gradualmente con la temperatura e durata del processo, passando da circa 296 mg/kg per il campione trattato 30 minuti a 80 °C a oltre 660 mg/kg per il campione trattato 1 ora a 100 °C. Tale fenomeno potrebbe essere dovuto all'effetto del cambiamento del pH durante il pretrattamento, con conseguente spostamento dell'equilibrio da ione ammonio a  $\text{NH}_3$  indissociata. Un'altra possibile causa di tale incremento potrebbe anche essere la distruzione dei pochi solidi presenti nel volume liquido da parte dell'attacco termo-basico, con conseguente rilascio di composti a base di azoto in forma solubile. I valori di pH a fine trattamento si aggirano tra 8.9 e 9.3. Confrontando tali valori con quelli misurati a fine trattamento termico (tabella 6.2) si nota che la differenza tra i due gruppi di prove non è poi tanto marcata: nel primo gruppo di prove, senza uso di NaOH, a fine trattamento erano stati raggiunti comunque pH variabili tra 8 e 8.8. Tale aspetto è da tenere in considerazione quando verranno confrontati i risultati dei due gruppi di prove.

## 6.2.1 Risultati dei BMP - Gruppo 2

I risultati delle prove manometriche di BMP svolte durante il secondo ciclo di prove sono esposti in figura 6.3.



**Figura 6.3** – Risultati prove di BMP- Secondo gruppo di prove.

I valori di biodegradabilità riscontrati nel secondo gruppo di prove non superano il 61 % e nel caso dell'acqua di cottura non trattata è stata ottenuta una biodegradabilità di poco superiore al 54% (tabella 6.6). I valori più elevati di produzione specifica sono stati ottenuti dalle prove con campioni pretrattati a 80 °C per 30 e 60 minuti con biodegradabilità simile e pari rispettivamente a 61% e 59%.

**Tabella 6.6** – Risultati numerici prove di BMP- Secondo gruppo di prove.

	Produzione netta media [Nml CH <sub>4</sub> ]	Produzione specifica media [Nml CH <sub>4</sub> /g COD]	Biodegradabilità [%]
<b>Cottura Tal Quale</b>	59.7	179.5 ± 11.1	54.4 ± 3.4
<b>80 °C - 30 min + NaOH</b>	67.0	201.9 ± 25.2	61.2 ± 7.6
<b>80 °C - 60 min + NaOH</b>	65.6	197.5 ± 11.8	59.8 ± 3.6
<b>100 °C - 30 min + NaOH</b>	59.5	178.8 ± 5.2	54.2 ± 1.6
<b>100 °C - 60 min + NaOH</b>	60.0	180.0 ± 11.8	54.5 ± 3.6

Il trattamento termico a 100 °C in tale gruppo di prove mostra risultati al pari del campione non trattato, indipendentemente dalla durata del trattamento. Come discusso nel paragrafo 2.4.2.1, il trattamento termico non sempre porta ad effetti benefici, in alcune situazioni può portare alla formazione di macromolecole attraverso le reazioni di Maillard le quali sono favorite a pH basici e sottoponendo i campioni a temperature più o meno elevate e per tempi prolungati. L'acqua di cottura è già di per sé sottoposta a stress termico durante la cottura dei lupini, se poi si tiene conto anche del tempo necessario a raggiungere la temperatura di pretrattamento e

quello del pretrattamento vero e proprio, è possibile dire che il fenomeno sopra citato non sia da escludere sebbene necessiti di essere confermato. Un ulteriore aspetto che ha portato a pensare alla possibilità di sviluppo delle reazioni di Maillard è il fatto che i campioni abbiano assunto una colorazione più scura, in particolar modo quelli sottoposti a trattamento termico a 100 °C. Tale cambiamento di colore è solito avvenire quando si sviluppano le reazioni in questione.

## 6.2.2 Analisi sul digestato di fine prova

Al termine delle prove i digestati di ogni triplicato sono stati mischiati e filtrati con filtro da 0.45 µm per effettuare alcune analisi sul surnatante. Al fine di verificare che i bassi valori di biodegradabilità non siano dovuti ad inibizione del metabolismo batterico da parte di NH<sub>3</sub>, sono state effettuate delle misure di N-NH<sub>4</sub> attraverso il quale la concentrazione di NH<sub>3</sub> è stata ricavata a partire dall'equazione di equilibrio tra ione ammonio e ammoniaca libera, riportata al paragrafo 2.3.3, che tiene conto della temperatura e del pH di fine prova. In tabella 6.7 vengono riportate le concentrazioni di NH<sub>4</sub> misurate tramite kit e la stima della concentrazione di NH<sub>3</sub> attesa nel digestato.

**Tabella 6.7** –Stima dell'ammoniaca indissociata presente nel mix di prova.

	N-NH <sub>4</sub> (kit) [mg/L]	pH	NH <sub>3</sub> stimata [mg/L]
<b>Cottura Tal Quale</b>	380	7.0	5.28
<b>80 °C - 30 min + NaOH</b>	330	7.03	4.91
<b>80 °C - 60 min + NaOH</b>	312	6.99	4.24
<b>100 °C - 30 min + NaOH</b>	383	6.98	5.09
<b>100 °C - 60 min + NaOH</b>	341	6.98	4.53

All'equilibrio, l'azoto risulta presente quasi tutto come ione NH<sub>4</sub> dal momento che il mix di prova si trova a pH neutri. I valori stimati di NH<sub>3</sub> risultano piuttosto bassi e ben sotto il limite di 200 mg/L che si dovrebbe rispettare al fine di evitare problemi di inibizione (vedi paragrafo 2.3.3), pertanto è possibile escludere tale composto dai possibili inibenti.

### 6.3 TERZO GRUPPO DI PROVE - TRATTAMENTO TERMO -ACIDO

Gli effetti del pretrattamento termo-acido vengono sintetizzati in tabella 6.8. Si ricorda che il campione pretrattato aveva un volume totale di 1 L mentre il volume restante di acqua di cottura preparata è stato utilizzato come campione tal quale.

**Tabella 6.8** – Caratterizzazione dei campioni al termine del pretrattamento termo-acido.

	Volume [ml]	COD [g/l]	pH post trattamento	Conducibilità [mS/cm]	TKN [mg/kg]
<b>Cottura Tal Quale</b>	380	12.5	[-]	1.41	95.9
<b>Tratt. 80 °C - 30 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	250	11.7	4.25	2.2	199.2
<b>Tratt. 80 °C - 60 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	225	12.1	4.25	2.24	244.4
<b>Tratt. 100 °C - 30 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	250	13.1	4.19	2.35	276.5
<b>Tratt. 100 °C - 60 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	175	14.4	4.22	2.64	320.1

È emerso che il pretrattamento termo-acido non ha apportato variazioni significative alle caratteristiche dei campioni di acqua di cottura. Rispetto le prove precedenti in tal caso si hanno concentrazioni di sostanza organica abbastanza contenute e simili a quelli del campione non trattato, conseguenza di una minore evaporazione durante la fase di trattamento termico anche grazie alla sostituzione dei becker con le beute. L'entità dell'evaporazione e il bilancio sul COD inizialmente presente e quello risultante a fine trattamento vengono mostrati in tabella 6.9.

**Tabella 6.9** – Bilancio del COD e stima entità evaporazione – Gruppo 3.

	Volume [ml]	COD [g/L]	COD [g]
<b>VOLUME INIZIALE</b>	1000	12.5	12.5
<b>VOLUME RESIDUO</b>			
<b>Tratt. 80 °C - 30 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	250	11.7	2.93
<b>Tratt. 80 °C - 60 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	225	12.1	2.72
<b>Tratt. 100 °C - 30 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	250	13.1	3.28
<b>Tratt. 80 °C - 30 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	175	14.4	2.52
<b>SOMMA</b>	900		11.4
<b>Rapporto finale/iniziale [%]</b>	90		91.2

Ne deriva una perdita di campione pari al 10% corrispondente a 100 ml evaporati nel corso dei diversi pretrattamenti. Dal bilancio del COD residuo rispetto al COD inizialmente presente si ottiene uno scarto del 8.8%, valore simile a quello stimato nel bilancio relativo al primo gruppo di prove (tabella 6.5). Tale scarto può essere dovuto a due ragioni principali, ovvero la perdita per evaporazione di una componente estremamente volatile della frazione organica oppure l'incertezza della misura di COD effettuata tramite kit. Si ricorda infatti che i kit possono presentare incertezze di misura crescenti al crescere delle concentrazioni saline.

Il contenuto di TKN misurato nell'acqua di cottura tal quale è di 95.9 mg/kg, pari a meno della metà rispetto quello trovato nel campione di acqua di cottura del primo ciclo, e inoltre all'aumentare della durata e della temperatura del trattamento si osserva anche un graduale aumento del TKN. Il pH invece rimane stabile e pari a 4.2, valore vicino al pH di inizio trattamento. Lo stesso andamento del TKN era stato riscontrato nel precedente gruppo di prove (pretrattamenti termo-basici), e ciò permette di escludere il pH come causa di tale fenomeno. È più probabile invece che l'effetto combinato di calore e reagenti basici e acidi demolisca eventuali solidi presenti nell'acqua di cottura rilasciando composti organici in forma solubile.

Infine, l'acqua di cottura prodotta per questo ciclo di prove è stata sottoposta ad un'analisi di BOD per valutare la frazione di sostanza organica biodegradabile aerobicamente:

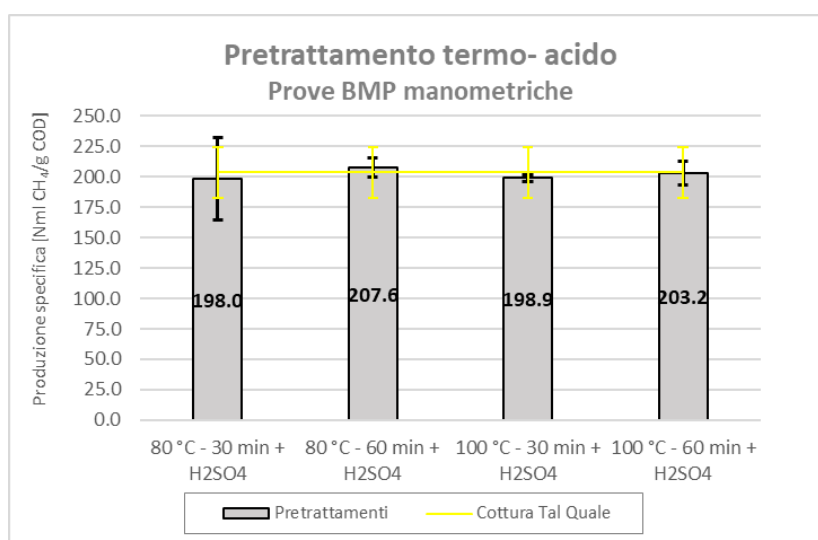
**Tabella 6.10** – Misure di BOD sul campione di acqua di cottura non trattata- Terzo gruppo di prove.

Analisi su acqua di cottura tal quale (gruppo 3)	
BOD <sub>20</sub> [mg/L]	8844
COD <sub>tot</sub> [mg/L]	12500
BOD <sub>20</sub> /COD [%]	70.8

Il rapporto BOD<sub>20</sub>/COD pari a oltre il 70% indica che non tutta la sostanza organica è biodegradabile. Il COD infatti può includere nella misura anche quei composti che riescono ad essere ossidati chimicamente ma non biologicamente.

### 6.3.1 Risultati delle prove manometriche di BMP - Gruppo 3

In figura 6.4 vengono riassunti i risultati delle prove di BMP manometriche svolte in questo ciclo di prove.



**Figura 6.4** – Risultati prove manometriche di BMP - Terzo gruppo di prove.

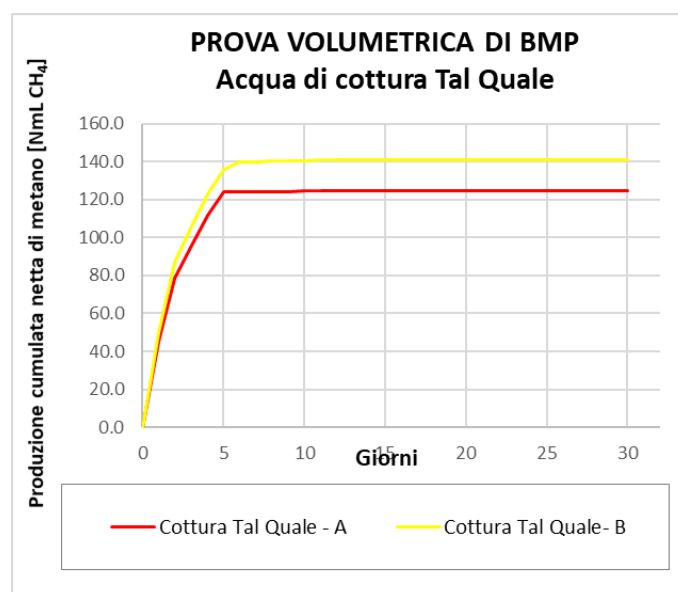
Anche in questo gruppo di prove la biodegradabilità dell'acqua di cottura si aggira attorno al 60% ma nessun pretrattamento sembra incrementarla in modo significativo, alcune prove hanno riportato anzi un BMP inferiore rispetto quello dell'acqua di cottura tal quale. I risultati delle prove fatte sull'acqua di cottura tal quale e sul campione trattato a 80 °C per 30 minuti mostrano inoltre un'elevata variabilità mentre le altre prove presentano un'ottima ripetibilità (tabella 6.11).

**Tabella 6.11**– Risultati numerici prove manometriche di BMP - Terzo gruppo di prove.

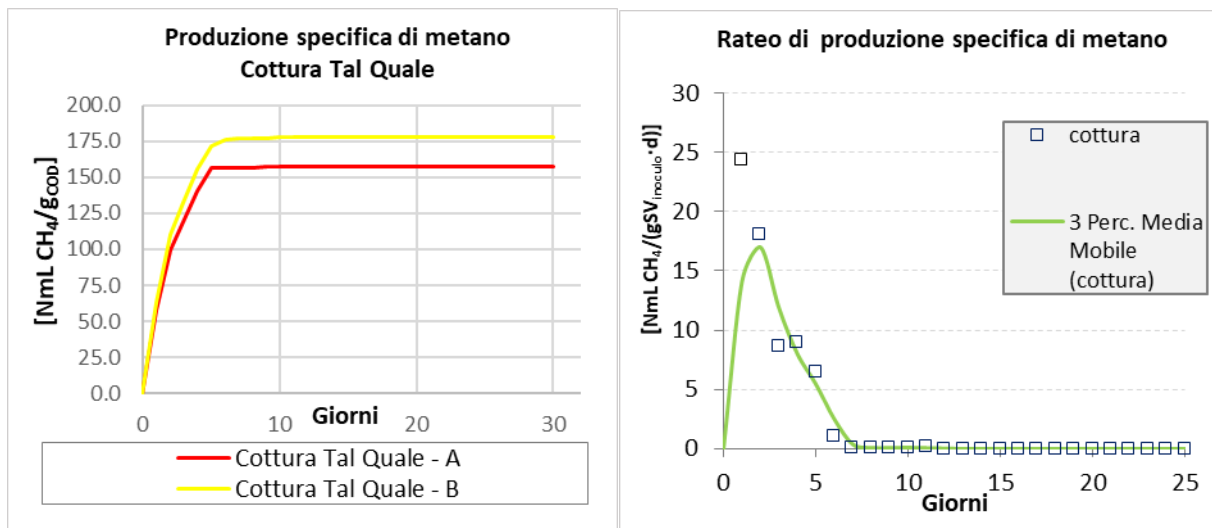
	Produzione netta media [Nml CH <sub>4</sub> ]	Produzione specifica media [Nml CH <sub>4</sub> /g COD]	Biodegradabilità [%]
<b>Cottura Tal Quale</b>	67.19	203.5 ± 20.5	61.7 ± 6.2
<b>80 °C - 30 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	65.80	198.0 ± 33.9	60.0 ± 10.3
<b>80 °C - 60 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	68.49	207.6 ± 7.8	62.9 ± 2.4
<b>100 °C - 30 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	65.66	198.9 ± 2.8	60.3 ± 0.8
<b>100 °C - 60 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	67.24	203.2 ± 9.7	61.6 ± 2.9

### 6.3.2 Risultati delle prove volumetriche di BMP - Gruppo 3

All'interno del terzo gruppo di prove è stato incluso un test di BMP sull'acqua di cottura non trattata attraverso il metodo di stima volumetrico, al fine di valutare i valori di biodegradabilità tramite il sistema AMPTS. La produzione cumulata di metano viene raffigurata in figura 6.5.



**Figura 6.5** – Produzione cumulata netta di metano – Acqua di cottura tal quale, gruppo 3.



**Figura 6.6** – Produzione specifica di metano e rateo di produzione–Acqua di cottura tal quale, gruppo 3.

I risultati sono stati ottenuti elaborando i dati registrati dal software AMPTS e rimuovendo la produzione del bianco, legata al metabolismo batterico. Con questi dati è possibile visualizzare automaticamente la produzione di metano netta evidenziando più chiaramente come la produzione si arresti tra il quinto e decimo giorno. Vengono esposti i risultati del BMP in forma tabulare (tabella 6.12) confrontandoli con quelli ottenuti tramite il metodo manometrico sullo stesso campione di acqua di cottura, già esposti in tabella 6.11. Tale confronto può servire per capire quanto il metodo di stima manometrico differisca da quello volumetrico nello stimare la biodegradabilità del substrato.

**Tabella 6.12** – Confronto dei BMP su acqua di cottura tal quale - Gruppo 3.

	<b>Produzione specifica [Nml CH<sub>4</sub>/g COD]</b>	<b>Biodegradabilità [%]</b>
<b>Cottura Tal Quale- A</b>	157.3	47.7
<b>Cottura Tal Quale- B</b>	178.0	53.9
<b>Media Metodo volumetrico</b>	167.7 ± 14.63	50.8 ± 4.43
<b>Media Metodo manometrico</b>	203.5 ± 20.5	61.7 ± 6.2

I risultati mostrano un valore di biodegradabilità media inferiore rispetto quello stimato utilizzando il metodo manometrico. Attribuire tale diversità all'impresione del metodo manometrico potrebbe essere una risposta alla differenza di risultato ma questa teoria non risulta del tutto corretta dal momento che il test volumetrico ha riportato valori di BMP discordanti anche all'interno del duplicato stesso. Si noti infatti come la prova in doppio abbia fornito delle biodegradabilità diverse e pari rispettivamente al 47.7% e al 53.9%, differenza piuttosto marcata. Non è pertanto ancora possibile fare delle conclusioni definitive riguardo l'equivalenza o meno tra i due metodi. A tal fine sarà discusso un ulteriore confronto effettuato sul campione portoghese durante il quinto gruppo di prove.

### 6.3.3 Misure di azoto ammoniacale e VFA

Al termine delle prove di BMP i digestati sono stati filtrati e sottoposti ad alcune analisi come già avvenuto nei gruppi di prove precedenti. Sui digestati delle prove manometriche è stata valutata la presenza di VFA tramite un kit per la misura di acidi organici ed inoltre sono state fatte misure di N-NH<sub>4</sub> per stimare l'ammoniaca presente (tabella 6.13).

**Tabella 6.13** – Analisi di acidi organici e stima NH<sub>3</sub> - Gruppo 3.

	N-NH <sub>4</sub> (kit)[mg/L]	pH	NH <sub>3</sub> stimata [mg/L]	VFA (kit) [mg/L]
<b>Bianco</b>	317.0	7.25	7.84	40
<b>Cottura Tal Quale</b>	361.0	6.89	3.90	51.4
<b>80 °C - 30 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	328.0	6.95	4.07	49.6
<b>80 °C - 60 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	351.0	6.94	4.25	45.5
<b>100 °C - 30 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	354.0	6.95	4.39	52.4
<b>100 °C - 60 min + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	361.0	6.94	4.37	50.1

Le concentrazioni di N-NH<sub>4</sub> ottenute sono simili a quelle misurate nel corso delle precedenti prove, ne conseguono valori di NH<sub>3</sub> piuttosto bassi e quindi per nulla preoccupanti. Anche i valori di VFA in termini di acidi organici presenti risultano piuttosto bassi, va però fatta notare la vicinanza al limite inferiore dell'intervallo di misura del kit utilizzato.

È stata anche fatta una misura più accurata di VFA tramite gas cromatografo sui digestati al termine dei BMP volumetrici (tabella 6.14). Lo strumento ha rilevato solamente la presenza di acido acetico in concentrazioni molto basse, a conferma di quanto già ipotizzato in seguito alle misure fatte col kit.

**Tabella 6.14** – Analisi di acidi organici tramite gas cromatografo - Gruppo 3.

	VFA [mg CH <sub>3</sub> COOH/L]	COD dovuto a VFA [mg COD/L]
<b>Bianco -A</b>	4.6	4.9
<b>Bianco - B</b>	5	5.3
<b>Cottura Tal Quale -A</b>	3.5	3.7
<b>Cottura Tal Quale -B</b>	3.1	3.3

Da tali dati risulta che non si è in presenza di VFA e che quindi l'ultima fase della digestione anaerobica viene svolta regolarmente.



### 6.3.4 Stima dei solfati apportati dal pretrattamento

Dal momento che le alte concentrazioni di ioni solfato possono essere motivo di inibizione del processo anaerobico, è stata fatta una stima della concentrazione di ioni solfato apportati durante la fase di pretrattamento tramite il dosaggio di  $H_2SO_4$ . Sapendo che per abbassare il pH fino a 4 è stato necessario dosare 3.6 ml di una soluzione 2M di acido solforico in un litro di campione, ne risulta un dosaggio pari a 0.0072 mol/L equivalenti a 691.6 mg  $SO_4^{2-}$ /L. Considerando la quantità di substrato dosata in ogni bottiglia di prova e la diluizione nel mix di BMP corrispondente ad un volume complessivo di 150 ml (vedi tabella 5.6a), si stima la concentrazione di ioni solfato immessi nel mix di prova e da essi la concentrazione degli ioni  $S^{2-}$ . Ne deriva una concentrazione di ioni solfato compresa tra 132 e 106 mg/L e di conseguenza concentrazioni teoriche di  $H_2S$  comprese tra 47 e 37 mg/L. Tali valori non risultano preoccupanti essendo inferiori a 200 mg/L, dato limite di letteratura (paragrafo 2.3.3). Le concentrazioni di acido solfidrico stimate per ogni singola bottiglia di prova sono consultabili in Appendice.

### 6.4 QUARTO GRUPPO DI PROVE - TRATTAMENTO ENZIMATICO

Gli effetti attesi dal pretrattamento enzimatico riguardano soprattutto l'attacco dei composti proteici attraverso una fase di idrolisi enzimatica. Per verificare gli effetti dell'enzima si è deciso di effettuare delle analisi di proteine sui campioni di acqua di cottura pretrattati confrontando i risultati con le proteine rilevate nel campione non trattato. Tali analisi, riportate in tabella 6.15 ed espresse come proteine totali, mostrano una riduzione di circa il 40% della concentrazione di proteine rispetto l'acqua di cottura tal quale. Non vi sono grosse differenze tra gli effetti delle due dosi usate, anzi la dose più alta riporta concentrazioni superiori di proteine ma ciò può essere dovuto al fatto che l'enzima stesso è composto da proteine e sebbene il contributo proteico dell'enzima sia stato sottratto, una parte di esso può comunque essere stata inclusa nella stima della quantità proteica netta. Ciò che però si nota è una diminuzione nel tempo del contenuto proteico, sia nel caso della dose inferiore che per la dose superiore.

**Tabella 6.15** – Caratterizzazione campioni a fine pretrattamento enzimatico - Gruppo 4.

	<b>COD</b> [g/L]	<b>COD apportato da enzima</b> [g/L]	<b>Conducibilità</b> [mS/cm]	<b>Proteine</b> [g/L]
<b>Cottura Tal Quale</b>	10.5	[ - ]	1.55	1.92
<b>Tratt. 24 h -11 U</b>	10.9	0.11	2.89	1.1 (-42.3%)
<b>Tratt. 24 h - 571 U</b>	16.3	5.56	5.4	1.25 (-34.9)
<b>Tratt. 90 h - 11 U</b>	9.6	0.11	1.39	1.0 (-44.7%)
<b>Tratt. 90 h - 571 U</b>	15.9	5.56	1.40	1.18 (-38.6%)

L'attività enzimatica risulta concentrata nelle prime 24 ore di trattamento ma il contenuto proteico decresce ulteriormente fino al raggiungimento del terzo giorno di trattamento.

Per quanto riguarda invece la quantità di sostanza organica è possibile notare come i campioni trattati con la dose più alta di enzima riportino valori di COD simili (circa 16 g/L) e superiori ai campioni trattati con dose più bassa (circa 10 g/L). Rimuovendo però l'apporto di sostanza organica dovuto all'enzima, si ricavano concentrazioni di COD simili per tutti i campioni trattati e molto vicini alla quantità di sostanza organica del campione tal quale, pari a circa 10 g/L.

Analizzando infine i valori di conducibilità si osserva che essa al termine delle prime 24 ore risulta più elevata rispetto al campione tal quale, soprattutto per il campione trattato con dose pari a 571 U/g COD. Tali valori sono attribuibili all'apporto di sali da parte dello stesso enzima e alla dissoluzione dei colloidali presenti nel volume liquido trattato. Dopo le 90 ore di trattamento però essa si ristabilizza a valori simili a quelli dell'acqua di cottura (1.4 ms/cm), indifferentemente dalla dose di trattamento. È possibile dunque che nel tempo si verifichi la riformazione dei colloidali che si erano disciolti nelle prime 24 ore, se non addirittura un aumento di questi.

#### 6.4.1 Risultati delle prove manometriche di BMP - Gruppo 4

I risultati delle prove di BMP svolte sui campioni pretrattati con enzima sono illustrati in figura 6.7.

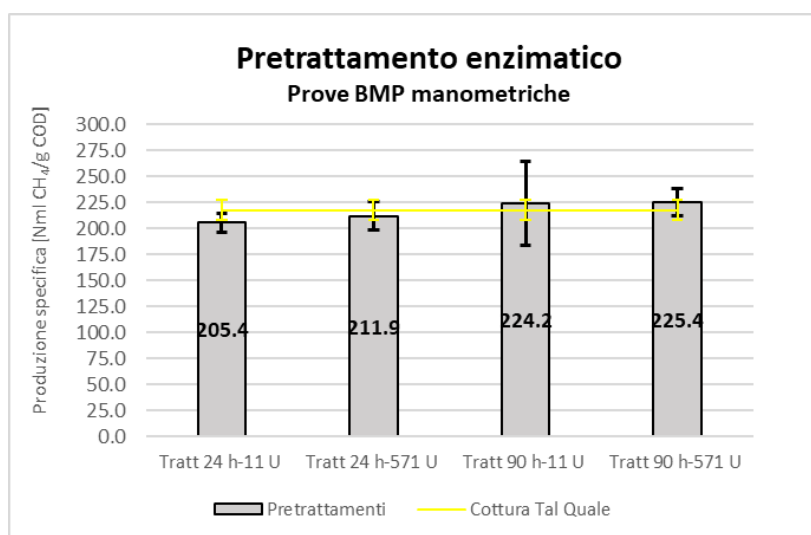


Figura 6.7 – Risultati prove manometriche di BMP - Quarto gruppo di prove.

I risultati mostrano scarsi miglioramenti in termini di metano prodotto rispetto l'acqua di cottura tal quale. I trattamenti che sembrano migliorare la biodegradabilità risultano quelli in cui l'enzima è stato lasciato a contatto con il substrato per 90 ore, indipendentemente dalla dose

utilizzata riuscendo ad aumentare la biodegradabilità dell'acqua di cottura fino a circa il 68% rispetto al 66% del campione non trattato ( $\approx + 3\%$ ). Tale incremento, seppur minimo, è indice di un effetto del trattamento enzimatico sull'acqua di cottura ed in particolare dimostra che la durata del trattamento è anch'essa influente sui risultati delle prove: i campioni trattati per sole 24 ore mostrano infatti valori di biodegradabilità simili a quelli del campione non trattato. Tale informazione era già stata ottenuta in fase di misura delle proteine e i risultati del BMP confermano quanto inizialmente ipotizzato riguardo l'importanza della durata del trattamento.

I risultati numerici vengono riassunti in tabella 6.16 che contiene le stime di biodegradabilità sia per i campioni di acqua di cottura, sia per l'enzima utilizzato. La produzione di metano netta è stata calcolata rimuovendo il metano associato al metabolismo batterico e alla degradazione dell'enzima. La produzione specifica è stata infine ricavata dividendo la produzione netta di metano per la quantità di COD immesso nella bottiglia di prova, al netto del COD apportato dall'enzima.

**Tabella 6.16** – Risultati numerici prove manometriche di BMP - Quarto gruppo di prove.

	<b>Produzione netta media (NmL)</b>	<b>Produzione specifica (NmL CH<sub>4</sub>/gCOD)</b>	<b>Biodegradabilità [%]</b>
<b>Cottura Tal Quale</b>	71.8	217.4 ± 9.4	65.9% ± 2.9
<b>Tratt. 24 h-11 U</b>	67.0	205.4 ± 9.3	62.2% ± 2.8
<b>Tratt. 24 h-571 U</b>	46.1	211.9 ± 13.3	64.2% ± 4.0
<b>Tratt. 90 h-11 U</b>	73.2	224.2 ± 40.1	67.9% ± 12.1
<b>Tratt. 90 h-571 U</b>	48.3	225.4 ± 12.9	68.3% ± 3.9
<b>Enzima</b>	30.6	254.7 ± 29.1	77.3% ± 8.8

La dosi di enzima utilizzate per il trattamento sono molto diverse tra loro ma mostrano risultati simili a parità di durata del trattamento. Dalla prova fatta sul solo enzima è stata ottenuta una biodegradabilità media pari al 77%.

Il campione trattato 90 ore con dosi pari a 11 U/g COD apporta miglioramenti al pari della prova con dosi pari a 571 U/g COD, pertanto è possibile concludere che è sufficiente dosare 11 U/g COD per avere il massimo miglioramento possibile in termini di biodegradabilità. Non è escluso che dosi inferiori di enzima possano apportare gli stessi miglioramenti, è invece difficile pensare che dosi più elevate possano migliorare ulteriormente la biodegradabilità visto che già la dose superiore usata in questo ciclo di prove risulta piuttosto consistente.

Un'elevata variabilità è stata osservata nelle prove sul campione "Tratt. 90 ore - 11 U". A causa di tale variabilità non è possibile giungere a conclusioni robuste riguardo l'effetto di tale trattamento.

## 6.4.2 Prove di SMA

Le prove di SMA sono state svolte su tale gruppo di prove per valutare eventuali effetti dell'enzima sull'attività batterica. Le prove sono state avviate dosando in due delle tre bottiglie formanti il triplicato di ogni prova una quantità nota di acetato di sodio e corrispondente a circa 0.14 gCOD/bottiglia, quantità limitata in modo tale da evitare lo sfiato. La prova ha avuto una durata di sette giorni, tempo ritenuto sufficiente per la completa degradazione dell'acetato. I risultati vengono riportati in tabella 6.17.

**Tabella 6.17** – Risultati numerici prova di SMA- Quarto gruppo di prove.

	<b>Produzione netta media (NmL) *</b>	<b>Produzione specifica (NmL CH<sub>4</sub>/gCOD)</b>	<b>Biodegradabilità [%]</b>
<b>Cottura Tal Quale</b>	24.6	181.0 ± 32.3	54.8% ± 9.8
<b>Tratt. 24 h -11 U</b>	21.7	159.7 ± 13.4	48.4% ± 4.1
<b>Tratt. 24 h - 571 U</b>	22.1	162.4 ± 5.6	49.2% ± 1.7
<b>Tratt. 90 h - 11 U</b>	23.3	171.1 ± 14.9	51.9% ± 4.5
<b>Tratt. 90 h - 571 U</b>	23.8	175.4 ± 20.7	53.1% ± 6.3
<b>Enzima</b>	24.1	177.1 ± 10.0	53.7% ± 3.0

(\*) Valori medi calcolati dai risultati di produzione delle due bottiglie per campione in cui è stato immesso acetato. La terza bottiglia in cui non è stato immesso nuovo substrato è stata usata per depurare la produzione di metano del bianco e dell'eventuale substrato residuo (enzima, acqua di cottura).

I risultati mostrano che dopo sette giorni non tutto l'acetato è stato degradato, i valori medi si aggirano infatti intorno al 50% e anche considerando la variabilità dei risultati si ottengono valori di biodegradabilità piuttosto bassi. Questi risultati potrebbero essere spiegati da un'inibizione dell'ultima fase di digestione anaerobica oppure dalla scarsa crescita dei batteri metanigeni acetoclastici. Ciò spiegherebbe perché dalle analisi dei VFA svolte non è risultato un accumulo di questi ultimi.

## 6.5 QUINTO GRUPPO DI PROVE – TRATTAMENTI MISTI

In tabella 6.18 vengono illustrate le caratteristiche dei campioni sottoposti alle prove manometriche di BMP durante l'ultimo gruppo di prove:

**Tabella 6.18** – Campioni utilizzati nel quinto gruppo di prove.

	Tipologia pretrattamento	COD finale [g/L]	Conducibilità finale [ms/cm]
<b>Cottura Tal Quale</b>	Non trattata (pH = 7.4, conservata in frigo)	9.89	1.34
<b>Cottura - 7 gg a 50 °C</b>	In termostato per 7 giorni a 50 °C, pH =5.0	9.67	3.0
<b>Cottura + Enzima (12 U)</b>	In termostato per 7 giorni a 50 °C, pH =5.0, Dose enzima pari a 12 U/g COD	10.1	2.8
<b>Cottura + NaOH (pH 11)</b>	pH = 11, in agitazione per 60 minuti a T ambiente	9.46	2.14
<b>Campione portoghese (Resting water)</b>	Non trattato pH=4.0	30.0 (sCOD=29.4)	9.7

I campioni usati nel quinto ciclo di prove provengono da acqua di cottura prodotta in laboratorio ad eccezione del campione portoghese. Quest'ultimo, ottenuto da una ditta portoghese, deriva dalla fase di cottura dei lupini ma non è confrontabile con la cottura effettuata in laboratorio poiché la ditta effettua una procedura di trattamento leggermente diversa che prevede un primo lavaggio direttamente nell'acqua usata per la cottura. Per tale motivo il COD di questo campione è tre volte superiore rispetto al COD del campione prodotto in laboratorio ed anche il pH risulta molto più basso. Il refluo portoghese risulta più simile ai campioni di acqua di lavaggio che sono stati descritti in tabella 3.7 e che presentavano pH e contenuto di sostanza organica molto consistenti, effetto della lunga permanenza dei lupini nell'acqua stessa.

Sull' acqua di cottura prodotta in laboratorio si è deciso di effettuare un trattamento basico senza stress termico in modo da valutare il solo effetto della soda. Come discusso durante il secondo gruppo di prove infatti, è possibile che la combinazione del trattamento termico con quello basico possa provocare effetti negativi sulla biodegradabilità. Si è deciso inoltre di ripetere il trattamento enzimatico usando la dose più bassa di enzima (90 U/g COD) per due motivi principali: tale dose ha mostrato effetti tanto positivi quanto la dose superiore ma a fronte di una minore quantità di enzima utilizzata. In più è sembrato opportuno ripetere l'esperimento vista la grande variabilità di risultato ottenuta nel quarto ciclo di prove. Infine, dal momento che si è vista una correlazione tra biodegradabilità e durata del trattamento enzimatico, si è deciso di lasciare il substrato a contatto con l'enzima per 7 giorni.

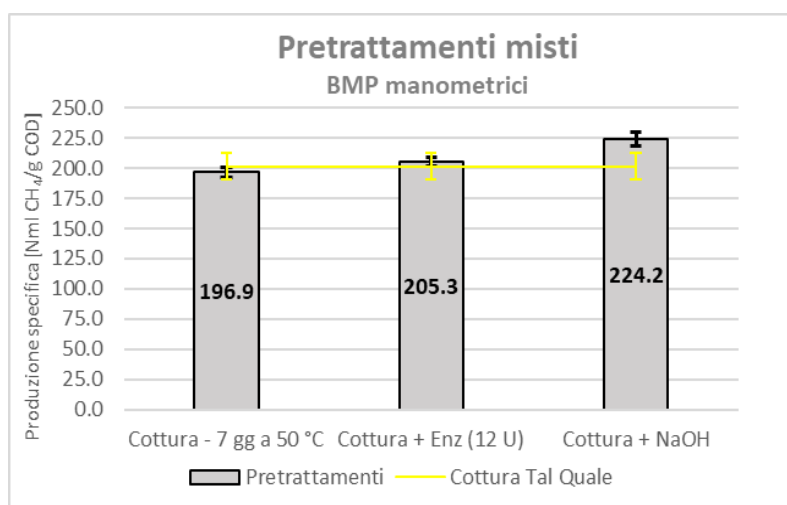
L'acqua di cottura prodotta per questo ciclo di prove è stata sottoposta ad una misura di BOD come già fatto per il campione prodotto al terzo ciclo di prove. I risultati delle analisi, visibili in tabella 6.19, mostrano anche in tale occasione un rapporto BOD/COD pari al 73.9%, valore simile a quello ricavato nel terzo ciclo di prove (tabella 6.10). Ciò conferma che circa il 30 % della sostanza organica presente nell'acqua di cottura non è biodegradabile.

**Tabella 6.19** – BOD sul campione di acqua di cottura tal quale prodotta in laboratorio – Quinto gruppo di prove.

<b>Analisi su acqua di cottura tal quale (gruppo 5)</b>	
<b>BOD<sub>5</sub> [mg/L]</b>	5510
<b>BOD<sub>20</sub> [mg/L]</b>	7310
<b>COD<sub>tot</sub> [mg/L]</b>	9890
<b>BOD<sub>20</sub>/COD [%]</b>	73.9

### 6.5.1 Risultati delle prove manometriche di BMP - Gruppo 5

I risultati delle prove di BMP svolte sui campioni pretrattati con enzima sono illustrati in figura 6.8.



**Figura 6.8** – Risultati prove manometriche di BMP - Quinto gruppo di prove.

I risultati delle prove sembrano confermare alcune ipotesi che erano state fatte in conclusione dei precedenti gruppi di BMP. In primo luogo, si nota come il trattamento enzimatico abbia un effetto molto limitato sulla biodegradabilità (+ 1.9%), nonostante questa volta il contatto substrato-enzima sia durato 7 giorni. Questo incremento, seppur limitato, è attribuibile all'effetto dell'enzima e non a quello della temperatura a cui il trattamento enzimatico avviene, come osservabile dal test svolto sul campione "Cottura 7 gg - 50 °C" che riporta valori di biodegradabilità uguali a quelli del campione non trattato (Tabella 6.20).

**Tabella 6.20** – Risultati numerici prove manometriche di BMP - Quinto gruppo di prove.

	<b>Produzione netta media [NmL]</b>	<b>Produzione specifica [NmL CH<sub>4</sub>/gCOD]</b>	<b>Biodegradabilità [%]</b>
<b>Cottura TQ</b>	66.4	201.6 ± 10.9	61.1 ± 3.3
<b>Cottura 7 gg - 50 °C</b>	66.3	196.9 ± 4.2	59.7 ± 1.3
<b>Cottura + Enzima (12 U)</b>	67.5	205.3 ± 3.7	62.2 ± 1.1
<b>Cottura + NaOH (pH=11)</b>	73.6	224.2 ± 5.7	67.9 ± 1.7

Sul campione trattato con NaOH è stato ottenuto un incremento di produzione pari a + 11.2% giungendo ad una biodegradabilità del 68% rispetto al 61% del campione non trattato. Tale incremento risulta quasi al pari dei massimi incrementi ottenuti con il pretrattamento termico e termo-basico ( $\approx +13\%$ ) ma a fronte di un trattamento meno costoso e meno impegnativo in termini di tempo.

### 6.5.2 Analisi di COD e BOD sul surnatante

I digestati di fine prova sono stati filtrati e su di essi effettuate analisi di COD e BOD. Per i digestati relativi ai diversi campioni pretrattati i valori sono riportati già al netto del COD e BOD misurati nel bianco a fine prova e riportati in tabella 6.21. Per completezza vengono inserite anche le analisi fatte sul mix del bianco prima dell'inizio del test.

**Tabella 6.21** – Analisi sui digestati post BMP - Quinto gruppo di prove.

	<b>COD [mg/L]</b>	<b>BOD<sub>5</sub> [mg/L]</b>	<b>BOD<sub>20</sub> [mg/L]</b>	<b>BOD<sub>20</sub>/COD [mg/L]</b>
<b>Bianco – Pre BMP</b>	207	98.9	112.9	-
<b>Bianco – Post BMP</b>	251	70.6	113	-
<b>Cottura Tal Quale</b>	330	28.3	155	47.0%
<b>Cottura - 7 gg a 50 °C</b>	399	197.4	212	53.1%
<b>Cottura + Enzima (12 U)</b>	307	-	85	27.7%
<b>Cottura + NaOH (pH 11)</b>	347	155.4	169	48.7%

I risultati mostrano concentrazioni di COD poco variabili e comprese tra 330 e 400 mg/L. Bassa variabilità anche per il BOD<sub>20</sub> ad eccezione del campione trattato con enzima che presenta valori dimezzati rispetto agli altri campioni. Il rapporto BOD/COD evidenzia come in media il 50% della sostanza organica non degradata anaerobicamente sia degradabile aerobicamente.

### 6.5.3 Stima del BMP con i due metodi - Campione portoghese

Il campione portoghese è stato sottoposto ad un test di BMP volumetrico al fine di valutarne l'entità di biodegradazione. Sullo stesso campione, in parallelo, è stata fatta una prova di BMP manometrico per avere un confronto della stima secondo i due metodi. L'esito del test volumetrico viene illustrato attraverso i grafici di produzione di metano e di produzione specifica (figura 6.9, 6.10).

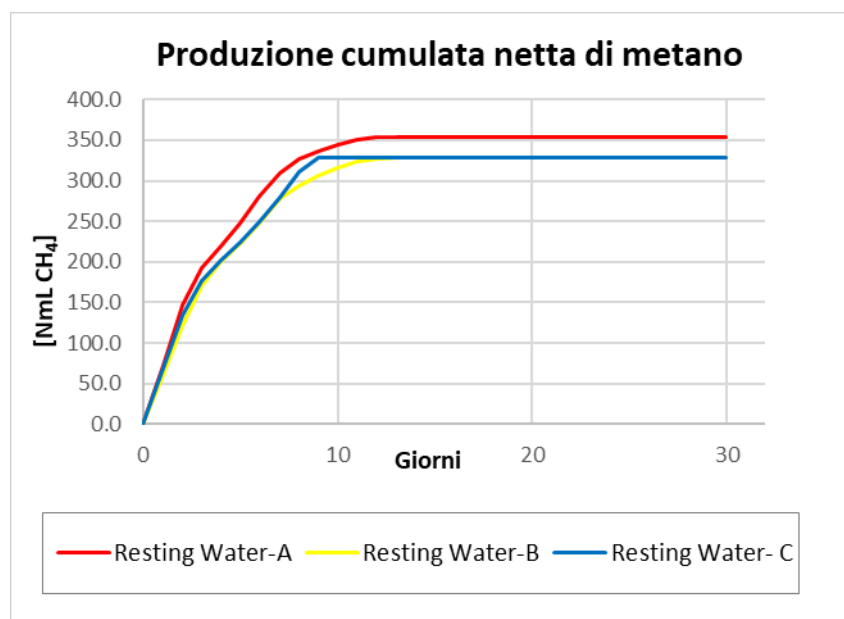


Figura 6.9 – Produzione cumulata netta di metano - Campione portoghese, gruppo 5.

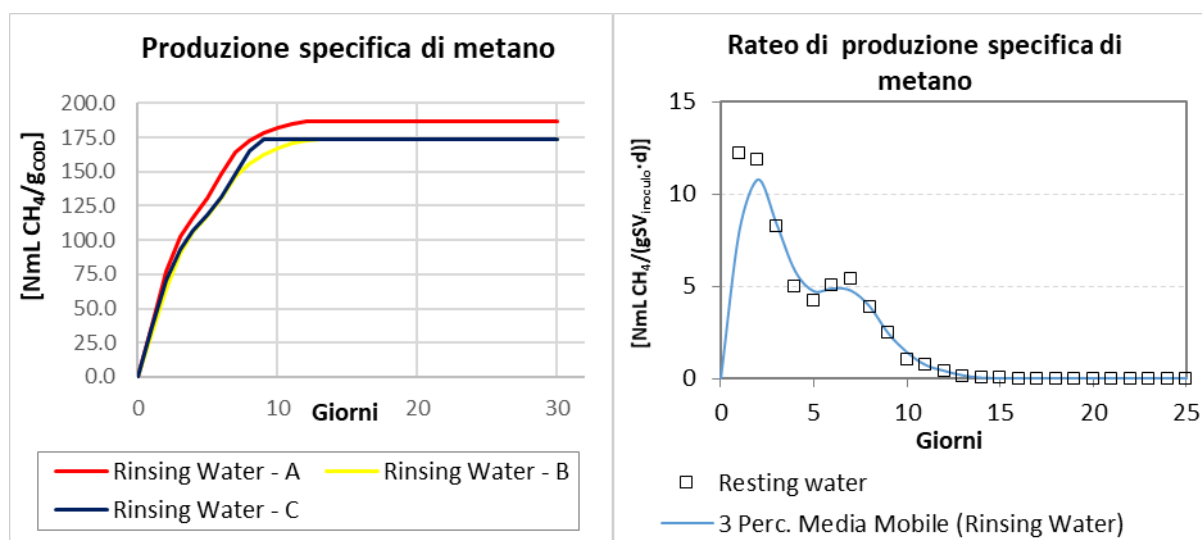


Figura 6.10 – Produzione specifica di metano e rateo di produzione – Campione portoghese, gruppo 5.

I risultati evidenziano una buona ripetibilità della prova con una biodegradabilità media del 54%. La prova può ritenersi conclusa entro i primi 15 giorni ma rispetto la prova volumetrica



effettuata sul campione di acqua di cottura prodotto in laboratorio durante il terzo ciclo di prove (paragrafo 6.3.2), essa presenta delle differenze. E' possibile notare infatti come nel campione di acqua da laboratorio la produzione si concentri nei primi 5 giorni di prova con un picco medio di produzione giornaliera pari a circa  $24 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{SV, inoculo}} \cdot \text{d})$  osservato tra il primo e secondo giorno di prova (figura 6.6). Al contrario nel campione portoghese la produzione è meno concentrata e presenta due picchi di produzione: il primo ha un valore medio di  $12.2 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{SV, inoculo}} \cdot \text{d})$  e si trova nei primi giorni di prova, il secondo invece si posiziona al settimo giorno di prova con un valore medio di  $5.4 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{SV, inoculo}} \cdot \text{d})$ . La presenza di due picchi di produzione posizionati a diverse fasi della prova può indicare la presenza di sostanze rapidamente biodegradabili che vengono degradate immediatamente e sostanze meno facilmente biodegradabili che hanno bisogno di più tempo per essere convertite dai microrganismi. È possibile ipotizzare dunque che il campione prodotto in laboratorio contenga sostanza organica più omogenea mentre quello ottenuto dalla ditta portoghese sia più diversificato, soprattutto se si considera che i lupini vengono lasciati a mollo in tale acqua per circa 24 ore e dunque il rilascio di sostanza organica risulta di diversa entità rispetto quello durante il solo tempo di cottura, come dimostrato anche dai diversi valori di COD. I risultati numerici dei BMP volumetrici vengono riportati in tabella 6.22, insieme ai risultati dei test di BMP manometrici svolti sullo stesso campione per confrontare la stima ottenuta secondo i due metodi:

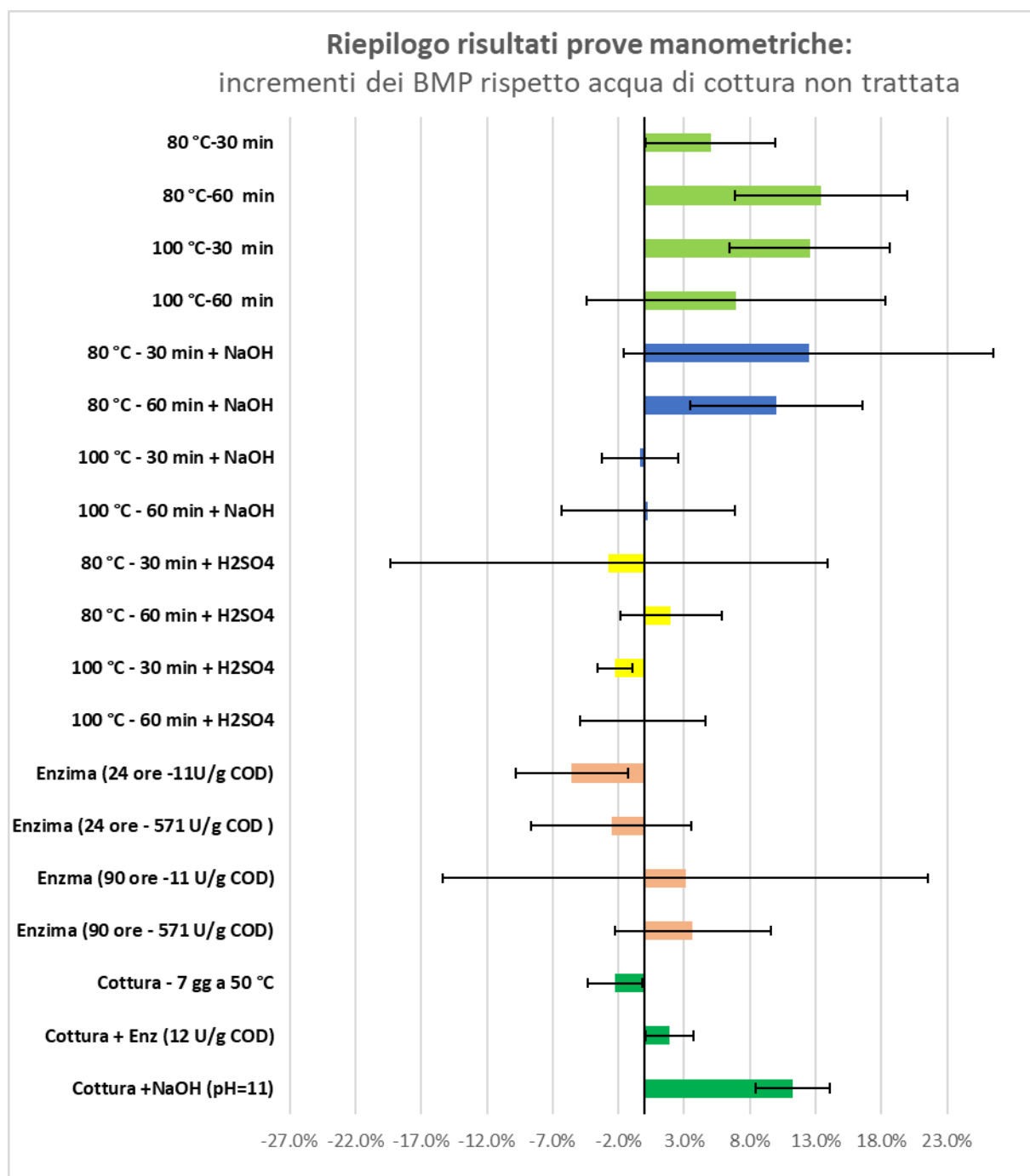
**Tabella 6.22** – Risultati numerici dei BMP per entrambi i metodi di stima - Campione portoghese, gruppo 5.

	<b>Produzione specifica</b> [NmL CH <sub>4</sub> /g COD]	<b>Biodegradabilità</b> [%]
<b>Resting Water - A</b>	186.6	56.5
<b>Resting Water - B</b>	174.0	52.7
<b>Resting Water - C</b>	174.0	52.7
<b>Media Metodo volumetrico</b>	178.2 ± 7.3	54.0 ± 2.2
<b>Resting Water - A</b>	185.4	56.2
<b>Resting Water - B</b>	203.2	61.6
<b>Resting Water - C</b>	179.7	54.4
<b>Media Metodo volumetrico</b>	189.7 ± 12.3	57.5 ± 3,7

Dal confronto emerge che il metodo manometrico fornisce una biodegradabilità media del refluo portoghese superiore rispetto la stima svolta tramite sistema volumetrico, con un valore pari al 57% rispetto al 54% ottenuto tramite AMPTS. Tale scarto è inferiore rispetto quello ottenuto durante il primo confronto (paragrafo 6.3.2) al termine del quale col metodo manometrico era stata ottenuta una biodegradabilità dell'acqua di cottura pari a 60.7% contro il 50.8% stimato tramite AMPTS.

## 6.6 RIEPILOGO E CONFRONTO DEI RISULTATI

In figura 6.11 vengono sintetizzati i risultati ottenuti sui BMP a seguito dei diversi pretrattamenti svolti sui campioni di acqua di cottura prodotti in laboratorio. Ogni gruppo di pretrattamento è rappresentato con un colore diverso e i risultati sono espressi in termini di incremento di biodegradabilità del refluo rispetto la biodegradabilità del campione di acqua di cottura non trattata relativa al gruppo di appartenenza.



**Figura 6.11** –Riepilogo dei risultati di BMP – Incremento rispetto campioni non pretrattati (%).

Dal confronto tra i diversi pretrattamenti è possibile dedurre che:

- 1) I trattamenti ad alta temperatura (100 °C) non apportano quasi mai benefici rilevanti alla biodegradabilità. Sia nel caso del trattamento termo-basico che in quello termo-acido non si ha incremento di produzione di metano per i campioni trattati a 100 °C, in alcuni casi si ha addirittura una diminuzione della biodegradabilità. Nei campioni pretrattati senza agenti chimici invece, solo il campione “100 °C-30 minuti” mostra miglioramenti sulla biodegradabilità (+ 12.5%) e prolungando ulteriormente il trattamento a 60 minuti questa diminuisce (+ 6.9%).
- 2) I trattamenti a bassa temperatura (80 °C) risultano più efficaci nel miglioramento delle caratteristiche del refluo e quindi nell’aumento della biodegradabilità. Il risultato migliore è stato ottenuto per il campione trattato termicamente (80 °C - 60 minuti) per il quale si ha avuto un incremento medio pari a +13.4%. Anche combinando l’effetto termico con quello basico è stata osservata una crescita nella biodegradabilità del refluo: i risultati più significativi riguardano il campione “80 °C - 60 minuti + NaOH” che mostra un incremento medio del 10.0%, risultati leggermente superiori ma con più variabilità sono stati osservati per il campione pretrattato con soda a 80 °C per 30 minuti (+ 12.5 %). Bisogna tenere presente però che i pH misurati al termine del pretrattamento termico variano tra 8 e 8.8 e risultano non tanto diversi da quelli misurati a fine trattamento termo-basico che variavano tra 8.9 e 9.3. Potrebbe essere dunque possibile che i due trattamenti abbiano apportato benefici analoghi per via delle condizioni simili a cui il campione è stato portato a fine processo.
- 3) Il trattamento termo-acido a base di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> non mostra invece alcun miglioramento sulla biodegradabilità del refluo, indipendentemente dalla temperatura e durata del processo. I risultati finali di BMP sono addirittura inferiori rispetto quelli dei campioni trattati solo termicamente. L’acido solforico si dimostra dunque inefficace per lo scopo. Non vale lo stesso per la soda, essa apporta dei miglioramenti sia se combinata all’effetto termico, sia se lasciata agire a temperatura ambiente a pH più estremi come dimostra il test inserito nel quinto gruppo di prove. Quest’ultimo fornisce uno dei risultati più rilevanti di tutti i cicli di prove poiché dimostra che trattando l’acqua di cottura con NaOH fino a raggiungere pH pari a 11, si riesce ad ottenere effetti sulla biodegradabilità quasi uguali a quelli ottenuti dai pretrattamenti termici e termo-basici sopra citati, a fronte di un minor dispendio energetico e di tempo (incremento della biodegradabilità pari a + 11.2%). Potrebbe essere interessante valutare gli effetti di un pretrattamento termo-basico lavorando a pH vicini a quelli raggiunti nel pretrattamento basico.

4) Infine, è possibile affermare che il trattamento enzimatico non incrementa in modo significativo la biodegradabilità del refluo. Dopo aver constatato nel quarto gruppo di prove che la dose pari a 11 U/g COD ha gli stessi effetti della dose pari a 571 U/g COD, ripetendo il test di BMP con una dose sufficientemente vicina (12 U/g COD) è stato osservato un incremento di biodegradabilità abbastanza limitato pari a +1.9%. Dai risultati del quarto gruppo di prove si nota inoltre che la biodegradabilità dei campioni trattati con enzima per 24 ore risulta addirittura inferiore rispetto quella del campione non trattato. Non è chiaro il motivo di quest'ultimo risultato, potrebbe essere legato semplicemente all'incertezza della stima dei risultati ottenuti oppure legata alle modalità di sottrazione del metano attribuito all'enzima per ricavare la produzione netta. In ogni caso la ripetizione del pretrattamento e il test svolto nel quinto gruppo di prove conferma che il pretrattamento enzimatico migliora in modo quasi trascurabile le caratteristiche del refluo pertanto è sconsigliato come pretrattamento visto che l'enzima comporta anche dei costi abbastanza elevati.

Nel complesso il pretrattamento termico (80 °C - 60 minuti) e termo-basico (80 °C - 30 minuti) hanno dato i risultati migliori con incrementi della biodegradabilità pari rispettivamente a +13.4% e +12.5%. Anche il pretrattamento basico con NaOH (pH=11) ha apportato un incremento simile e pari a +11.2%. Potrebbe essere interessante variare ulteriormente i parametri di questi ultimi pretrattamenti per indagare gli effetti sulla biodegradabilità.

### 6.6.1 Confronto dei BMP sui campioni di acqua di cottura non trattata

In tabella 6.23 vengono messi a confronto i risultati dei BMP delle diverse acque di cottura non trattate, prodotte durante i cinque cicli di prove per evidenziare meglio le caratteristiche ottenute in termini di biodegradabilità del campione non trattato e della massima biodegradabilità raggiunta attraverso pretrattamenti.

**Tabella 6.23** – Riepilogo dei risultati dei BMP svolti sui campioni di acqua di cottura non trattata.

Gruppo di appartenenza	Produzione specifica [Nml CH <sub>4</sub> /g COD]	Biodegradabilità [%]	Massima biodegradabilità raggiunta
<b>Gruppo 1</b>	203.5 ± 14.4	61.7 ± 4.4	69.9 % (+13.4%) per campione "80 °C – 60 min"
<b>Gruppo 2</b>	179.5 ± 11.1	54.4 ± 3.4	61.2% (+12.5%) per campione "80 °C - 30 min + NaOH"
<b>Gruppo 3</b>	203.5 ± 20.5	61.7 ± 6.2	62.9 % (+2.0%) per campione "80 °C - 60 min + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> "
<b>Gruppo 4</b>	217.4 ± 9.4	65.9 ± 2.9	68.3% (+3.6%) per campione "Enzima (90 ore - 571 U/g COD)"
<b>Gruppo 5</b>	201.6 ± 10.9	61.1 ± 3.3	67.9% (+11.2%) per campione "Cottura + NaOH (pH=11)"

Si osserva come la biodegradabilità si aggiri tra il 61% e 66% tranne che in occasione della seconda cottura per la quale è stato ottenuto un valore più basso e pari al 54%. Riguardo quest'ultimo risultato, è possibile che qualche diversità nella fase di cottura o nel lotto di lupini impiegato abbia portato ad avere un refluo con caratteristiche diverse rispetto gli altri campioni prodotti. Altro aspetto interessante riguarda il fatto che i pretrattamenti non siano riusciti a superare la soglia di biodegradabilità del 70%. Più volte infatti è stato ottenuto come massimo valore di biodegradabilità una stima di circa il 70%, tale valore potrebbe essere effettivamente il massimo raggiungibile in termini di biodegradabilità delle acque dei lupini, come suggerito anche dalle misure di BOD e dai rapporti BOD/COD proposti durante il terzo e quinto ciclo di prove secondo cui sembrerebbe che circa il 30% della sostanza organica presente nell'acqua di cottura non sia biodegradabile.

## 7. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi si è approfondito lo studio della biodegradabilità anaerobica di reflui generati a valle del processo di lavorazione dei lupini. Il processo lavorativo risulta molto dispendioso in termini di risorse idriche (24 L H<sub>2</sub>O/kg lupino trattato), per effetto del trattamento e dei numerosi successivi lavaggi (fino a 12), necessari per rimuovere quasi totalmente la lupanina. Tale alcaloide può causare problemi di tossicità per l'uomo ed è presente nel lupino in percentuali pari all'1-2% in peso, pertanto necessita di essere rimosso affinché il lupino possa essere commercializzato come alimento umano. L'80% circa del carico organico rimosso durante il processo lavorativo si trova associato alle prime fasi (cottura e primi 3 lavaggi), come evidenziato nel bilancio effettuato al paragrafo 3.5.2 e sulla base di dati precedentemente campionati presso un'azienda italiana produttrice di lupini (Battello, 2017).

Precedenti studi, descritti al paragrafo 4.2, hanno studiato la biodegradabilità di diversi campioni provenienti da alcune delle fasi di lavorazione dei lupini ottenendo limitati valori di biodegradabilità, in media vicini al 60%. Tali risultati sono stati attribuiti a problemi legati a sostanze difficili da biodegradare piuttosto che a fenomeni di inibizione del processo anaerobico, come dimostrato da alcune prove di attività metanigena svolte al termine delle prove di BMP. A partire da queste conclusioni, la presente tesi è stata orientata nello studio sperimentale di metodi di pretrattamento al fine di migliorare la biodegradabilità dei reflui in questione.

Sulla base dei dati di letteratura relativi alla composizione del lupino e alle possibili sostanze che con più probabilità vengono rilasciate nell'acqua in seguito alla fase di cottura e di lavaggio, si è deciso di applicare pretrattamenti di tipo termico, termo-basico, termo-acido ed enzimatico su campioni di acqua di cottura prodotti in laboratorio seguendo le stesse procedure utilizzate in ditta. In seguito ai pretrattamenti sono state fatte prove di biodegradabilità anaerobica (BMP) sui campioni pretrattati confrontando i risultati con quelli dei campioni non sottoposti a trattamento. L'acqua di cottura prodotta per il terzo e quinto ciclo di prove è stata sottoposta ad analisi di BOD, oltre che di COD, riportando un rapporto BOD<sub>20</sub>/COD pari rispettivamente a 70.8% e 73.9%, indice che non tutta la sostanza organica è biodegradabile.

I pretrattamenti termici e termo-chimici hanno causato un incremento del COD del campione tal quale per via dell'evaporazione di parte del volume. In seguito a due bilanci sul COD presente inizialmente e sul COD residuo nei campioni sottoposti a stress termico (tabella 6.5 e 6.9) è stato ottenuto uno scarto pari all'8.2% e all'8.8%, differenza che potrebbe essere dovuta alla volatilizzazione di una frazione estremamente volatile del contenuto organico inizialmente

presente. Una seconda spiegazione potrebbe essere legata all'incertezza delle misure di COD tramite kit. L'effetto dei pretrattamenti enzimatici è stato valutato invece attraverso la misura di proteine totali nei campioni pretrattati rispetto la misura sul campione tal quale, riscontrando una diminuzione del contenuto proteico di circa il 40%, indipendentemente dalla dose di enzima utilizzata. Il tempo di durata del contatto substrato-enzima sembra influire positivamente sull'idrolisi enzimatica, come dimostrato dalle misure di proteine sui campioni trattati 90 ore rispetto a quelli trattati 24 ore (tabella 6.15).

Le prove di BMP sui cinque campioni di acqua di cottura tal quale prodotta per i cinque cicli di prove hanno fornito valori di biodegradabilità variabili tra il 54.4% e il 65.9%. La produzione di biogas è concentrata nei primi dieci giorni di prova e la prova può ritenersi conclusa già dopo 15 giorni. Le curve di biogas presentano andamenti regolari e non sembrerebbe affetta da problemi di inibizione. Le curve di biogas ricavate dalle prove sui campioni sottoposti a pretrattamento mostrano andamento simile a quelle dei campioni non trattati. In termini di BMP sono stati riscontrati incrementi limitati di produzione specifica di metano ( $\text{Nml CH}_4/\text{g COD}$ ) e dunque di biodegradabilità. I pretrattamenti più efficaci risultano quelli di tipo termico e termo-basico a bassa temperatura ( $80\text{ }^\circ\text{C}$ ) che hanno mostrato incrementi massimi pari rispettivamente a +13.4% e +12.5% (Tabella 6.23). I pretrattamenti a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  combinati con NaOH e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  non mostrano alcun segno di miglioramento, nel caso del solo trattamento termico invece il campione trattato 30 minuti a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  apporta un incremento superiore (+12.5%). Infine, incrementi dello stesso rilievo sono stati ottenuti sulla prova relativa al campione trattato solo con soda ( $\text{pH}=11$ ) con un incremento pari a +11.2% mentre le prove sui campioni trattati con enzima mostrano incrementi trascurabili.

Nel complesso i massimi valori di biodegradabilità raggiunti sono di poco inferiori al 70%. Durante il corso delle prove sono stati fatti degli accertamenti per individuare eventuali problemi di inibizione. Dalle analisi svolte non sembrano esserci rischi di inibizione da  $\text{NH}_3$ , stimata in concentrazioni inferiori a  $10\text{ mg/L}$  e anche l'apporto di ioni solfato dovuto al pretrattamento acido con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  non sembra poter causare problemi di inibizione da  $\text{H}_2\text{S}$ .

Infine, attraverso il confronto tra metodo manometrico e volumetrico di determinazione del BMP, svolti su due campioni diversi di acque di cottura, si evidenzia una differenza nei risultati di BMP ottenuti e, quindi, di biodegradabilità. Tale differenza è risultata più marcata in un caso (acqua di cottura prodotta in laboratorio) e dell'ordine di 3-4 punti percentuali (in termini di biodegradabilità) nel caso di un'acqua di cottura di origine industriale.

Per concludere, dal presente lavoro è emerso che l'acqua di cottura dei lupini presenta valori di biodegradabilità compresi tra il 54.4% e il 65.9% e che sottoponendo tali acque a pretrattamenti termo-chimici o enzimatici non si riesce comunque ad incrementare in modo significativo la biodegradabilità, raggiungendo valori massimi pari al 70%. In futuro potrebbe essere interessante approfondire ulteriormente quei pretrattamenti che hanno dato segni di miglioramento, quali ad esempio il trattamento termico o quelli a base di NaOH, oltre che testare condizioni di lavoro differenti durante il processo anaerobico, svolgendo prove di BMP in condizioni termofile anziché mesofile. Infine, potrebbe essere risolutivo effettuare uno studio approfondito sulle singole sostanze presenti nei reflui, per verificare che effettivamente esse siano sostanze difficili da biodegradare, come ipotizzato sulla base dei risultati di questo lavoro e sulla base dei dati di bibliografia ottenuti in merito alla composizione chimica del seme di lupino.



## BIBLIOGRAFIA

1. L. Appels, J. Degrève, B. Van der Bruggen, J. Van Impe, R. Dewil (2011), *Influence of low temperature thermal pre-treatment on sludge solubilisation, heavy metal release and anaerobic digestion*, *Bioresource Technology* 101: 5743 – 5748.
2. J. Ariunbaatar, A. Panico, G. Esposito, F. Pirozzi, P.N.L. Lens (2014), *Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste*, *Applied Energy* 123:143 – 156.
3. J. Ariunbaatar, A. Panico, L. Frunzo, G. Esposito, P.N.L. Lens, F. Pirozzi (2014), *Enhanced anaerobic digestion of food waste by thermal and ozonation pretreatment methods*, *Journal of Environmental Management* 146: 142 e 149,
4. G. Aytimur, S. Atalay (2004), *Treatment of an Alkaloid Industry Wastewater by Biological Oxidation and/or Chemical Oxidation*, *Energy Sources*, 26:7, 661 - 670.
5. M. Badshah, D. M. Lam, J. Liu, B. Mattiasson (2012), *Use of an Automatic Methane Potential Test System for evaluating the biomethane potential of sugarcane bagasse after different treatments*, *Bioresource Technology* 114: 262 – 269.
6. C. B. M. Barbeitos (2016), *Towards the development of a process for lupin beans detoxification wastewater with lupanine recovery*, Tesi di laurea, Técnico Lisboa.
7. M.Barjenbruch, O.Kopplow (2003), *Enzymatic, mechanical and thermal pre-treatment of surplus sludge*, *Advances in Environmental Research* 7: 715–720.
8. S. Battello (2017), *Valorizzazione di reflui alimentari contenenti alcaloidi. Studio particolare della lavorazione dei lupini*, Tesi di Laurea, Politecnico di Torino.
9. Bioprocess Control (2013), *AMPTS II & AMPTS II light: Automatic Methane Potential Test System. Operation and Maintenance Manual*, versione 3.0.
10. G. Bochmann, B. Drog, W. Fuchs (2015), *Anaerobic Digestion of Thermal Pretreated Brewers' Spent Grains*, *Environmental Progress & Sustainable Energy* (Vol.34, No.4).
11. F.E. Carvajal-Larenas, A.R. Linnemann, M.J.R. Nout, M. Koziol, M.A.J.S. Van Boekel (2015), *Lupinus mutabilis: Composition, Uses, Toxicology and Debittering*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

12. Y. Chen, J. J. Cheng, K. S. Creamer (2008), *Inhibition of anaerobic digestion process: A review*, *Bioresource Technology* 99: 4044 – 4064.
13. A.G. Costa, G.C. Pinheiro, F.G.C. Pinheiro, A.B. Dos Santos, S.T. Santaella, R.C. Leitao (2014), *The use of thermochemical pretreatments to improve the anaerobic biodegradability and biochemical methane potential of the sugarcane bagasse*, *Chemical Engineering Journal* 248: 363 – 372.
14. R. J. S. de Castro, H. H. Sato (2014), *Protease from Aspergillus oryzae: Biochemical Characterization and Application as a Potential Biocatalyst for Production of Protein Hydrolysates with Antioxidant Activities*, Harshadrai M. Rawel.
15. N. Ertas, N. Bilgiçli (2012), *Effect of different debittering processes on mineral and phytic acid content of lupin (Lupinus albus L.) seeds*, *J Food. Sci. Technol.*, 51(11): 3348 – 3354.
16. E. Ficara, F. Malpei, E. Martinucci, I. Porqueddu (2014), *La misura della degradabilità anaerobica*, Ed. Polo Territoriale di Cremona, Milano (Italia) [ISBN 978-88-97962-26-7].
17. D. Gregg, J.N. Saddler (1996), *A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process.*, citato in: A.T.W.M. Hendriks, G. Zeeman (2008), *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*, *Bioresource Technology* 100:10 – 18.
18. A.T.W.M. Hendriks, G. Zeeman (2008), *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*, *Bioresource Technology* 100: 10 – 18.
19. N. Ivo Achu, (2012). *Anaerobic digestion of crop and waste biomass: Impact of feedstock characteristics on process performance*. Lund University (Media-Tryck).
20. F. Kamran (2017), *Enzymatic Hydrolysis of Lupin (Lupinus angustifolius) Protein: Isolation and Characterization of Bioactive Peptides*, Tesi di Dottorato, Western Sydney University.
21. D. Klupšaitė, G. Juodeikienė (2015), *Legume: composition, protein extraction and functional properties. A review*, *Chemical Technology*, 66 (1): 1392 – 1231.
22. M. Kroc, W. Rybinski, P. Wilczura, K. Kamel, Z. Kaczmarek, P. Barzyk, W. Swiecicki (2017), *Quantitative and qualitative analysis of alkaloids composition in the seeds of a white lupin (Lupinus albus L.) collection*, *Genet. Resour. Crop. Evol.*, 64: 1853 – 1860.

23. H. Li, Y. Jin, R.B. Mahar, Z. Wang, Y. Nie (2007), *Effects and model of alkaline waste activated sludge treatment*, *Bioresource Technology* 99: 5140 – 5144.
24. X. Liu, W. Wang, X. Gao, Y. Zhou, R. Shen (2011), *Effect of thermal pretreatment on the physical and chemical properties of municipal biomass waste*, *Waste Management* 32: 249 – 255.
25. C. Ma, J. Liua, M. Yea, L. Zoua, G. Qiana, Y. Lib (2018), *Towards utmost bioenergy conversion efficiency of food waste: Pretreatment, co-digestion, and reactor type*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 90: 700 – 709.
26. Mascheroni C. (2017), *Prove di ultrafiltrazione per il recupero di energia e risorse da acque di lavorazione dei lupini*, Tesi di laurea, Politecnico di Milano.
27. J. N. Meegoda, B. Li, K. Patel, L. B. Wang (2018), *A Review of the Processes, Parameters, and Optimization of Anaerobic Digestion*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2018, 15, 2224.
28. A.A. Mohamed, P. Rayas-Duarte (1994), *Composition of Lupinus albus*, *Cereal Chemistry*, 72(6): 643 - 647.
29. F. Monlau, P. Kaparaju, E. Trably, J.P. Steyer, H. Carrere (2014), *Alkaline pretreatment to enhance one-stage CH<sub>4</sub> and two-stage H<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> production from sunflower stalks: Mass, energy and economical balances*, *Chemical Engineering Journal* 260: 377 – 385.
30. H. C. Moon, I. S. Song (2011), *Enzymatic Hydrolysis of Food Waste and Methane Production Using UASB Bioreactor*, *International Journal of Green Energy*, 8:3, 361 - 371.
31. S. Muranyi (2016), *Properties of protein isolates from lupin (Lupinus angustifolius L.) as affected by the isolation method*, Tesi di dottorato, Technische Universität München.
32. E. Neyens, J.A. Baeyens (2003), *Review of thermal sludge pre-treatment processes to improve dewaterability* citati in: J. Ariunbaatar, A. Panico, G. Esposito, F. Pirozzi, P.N.L. Lens (2014), *Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste*, *Applied Energy* 123: 143 – 156.
33. P. M. Ngoma, S. Hiligsmann, E.S. Zola, M. Ongena, P. Thonart (2015), *Impact of Different Plant Secondary Metabolites Addition: Saponin, Tannic Acid, Salicin and Aloin an Glucose Anaerobic Co-Digestion*, *Ferment Technol*, 4: 113, DOI: 10.4172/2167-7972.1000113.

34. Z. Nigussie (2012), *Contribution of White Lupin (Lupinus albus L.) for Food Security in North-Western Ethiopia: A Review*, Asian Journal of Plant Science, 11(5): 200 - 205.
35. R. T. Özdemir (2006), *Anaerobic Treatment of Opium Alkaloid Wastewater and Effect of gamma-rays on Anaerobic Treatment*, Tesi di Laurea, Middle East Technical University.
36. D. Popp, H. Harms, H. Sträuber (2016), *The alkaloid gramine in the anaerobic digestion process—inhibition and adaptation of the methanogenic community*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 100: 7311– 7322.
37. A. Protot, L. Julien, D. Christophe, L. Partick (2011), *Sludge disintegration during heat treatment at low temperature: a better understanding of involved mechanisms with a multi-parametric approach* citati in: J. Ariunbaatar, A. Panico, G. Esposito, F. Pirozzi, P.N.L. Lens (2014), *Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste*, Applied Energy 123: 143 – 156.
38. R. Rafique, T. G. Poulsen, A. Nizami, Z. Asam, J. D. Murphy, G. Kiely (2010), *Effect of thermal, chemical and thermo-chemical pre-treatments to enhance methane production*, Energy 35 (2010): 4556 e 4561.
39. S. Rattan, A. K. Parande, V. D. Nagaraju, G. K. Ghiwari (2015), *A comprehensive review on utilization of wastewater from coffee processing*, Environ. Sci. Pollut. Res, 22: 6461 – 6472.
40. R. T. Romano, R. Zhang, S. Teter, J. A. McGarvey (2009), *The effect of enzyme addition on anaerobic digestion of Jose Tall Wheat Grass*, Bioresource Technology 100: 4564 – 4571.
41. H. Sakar, C. B. Canbolat, A. Karagunduz, B.Keskinler (2016), *Sulfate removal from nanofiltration concentrate of alkaloid wastewater by electrodialysis*, Desalination and Water Treatment, 57:44, 21003 -21014.
42. C. Sambusiti, E. Ficara, F. Malpei, J.P. Steyer, H. Carrère (2013), *Benefit of sodium hydroxide pretreatment of ensiled sorghum forage on the anaerobic reactor stability and methane production*, Bioresource Technology 144: 149 – 155.
43. R.E. Speece (1996), *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*, Vanderbilt University, [ISBN] 0965022609.
44. A. I. Vavouraki, E. M. Angelis, M. Kornaros (2012), *Optimization of thermo-chemical hydrolysis of kitchen wastes*, Waste Management 33: 740 – 745.

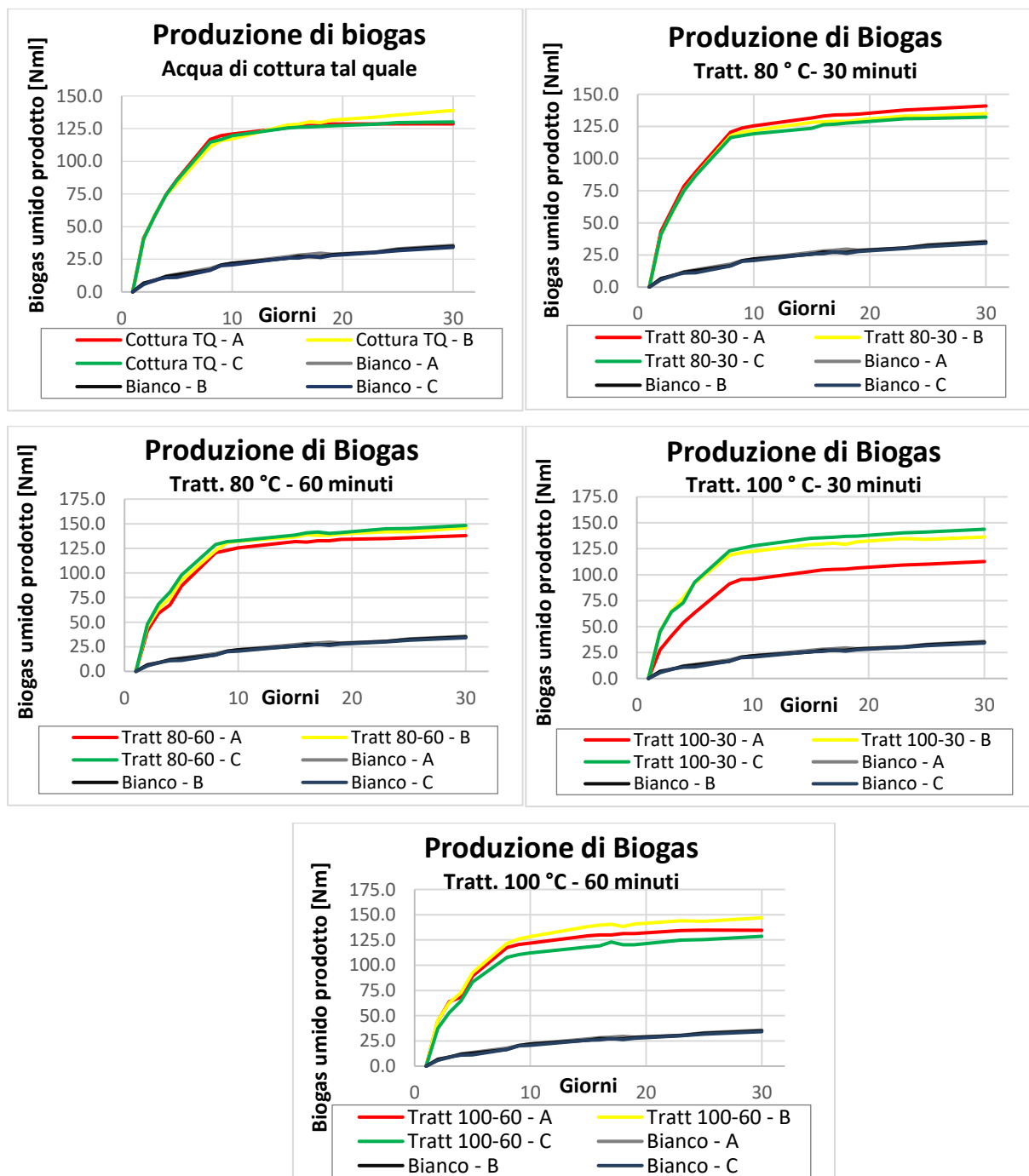
45. M. X. Zhao, Q. Yan, W.Q. Ruan, H.F. Miao, H.Y. Ren, Y. Xu(2011), *Enhancement of substrate solubilization and hydrogen production from kitchen wastes by pH pretreatment*, Environmental Technology, 32:2: 119 - 125.
46. Y. Zheng, J. Zhao, F. Xu, Y. Li (2014), *Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas*, Progress in Energy and Combustion Science 42: 35 e 53.
47. K. Zieminski, I. Romanowska, M. Kowalska (2012), *Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to improve biogas production*, Waste Management 32: 1131 – 1137.

# APPENDICE

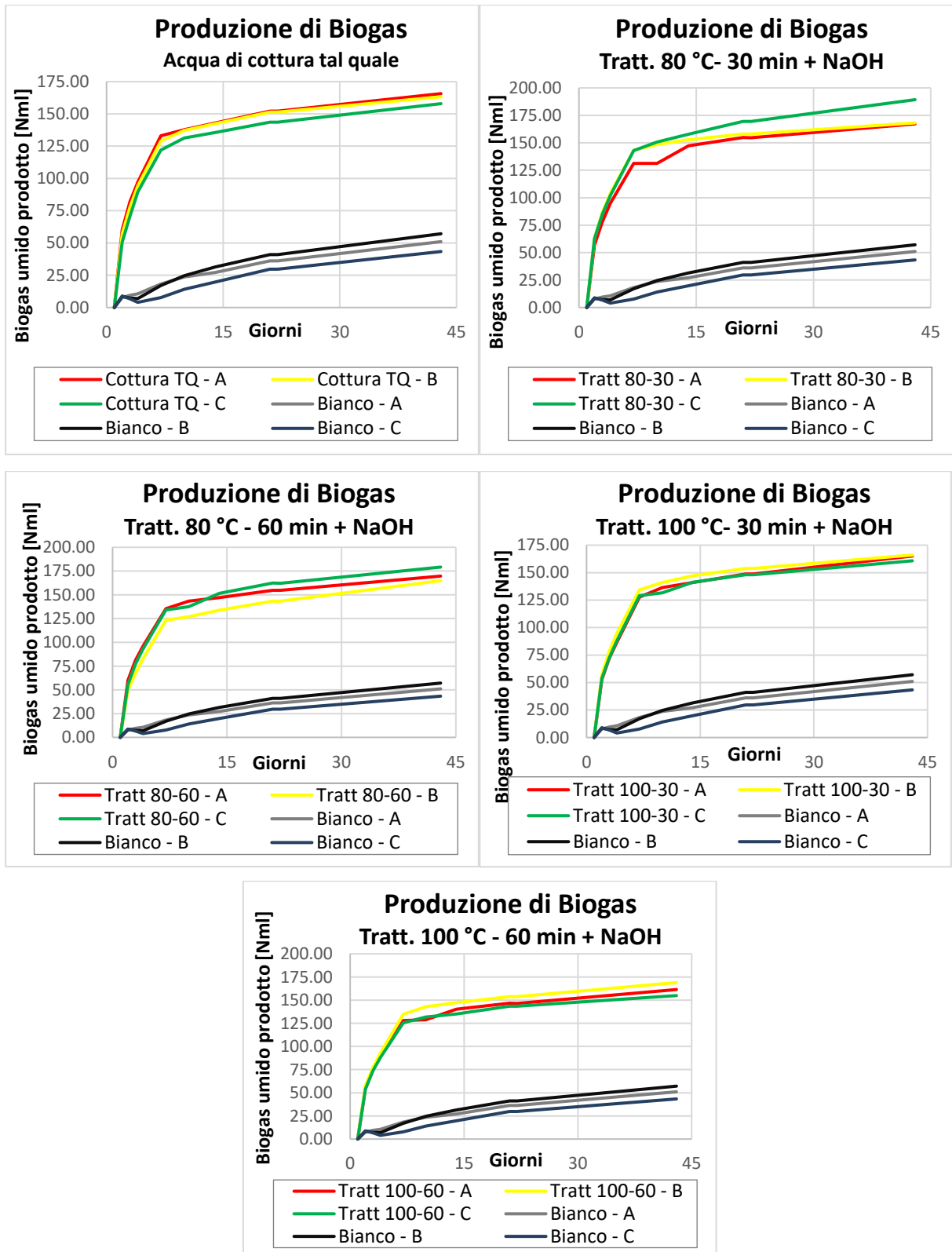
## 1. CURVE CUMULATE DI BIOGAS

In questa sezione è possibile consultare le curve cumulate di biogas lordo prodotto nel tempo per i diversi gruppi di prove. Insieme ad esse viene raffigurata la produzione del bianco, successivamente sottratto alla produzione lorda per ricavare la produzione netta di biogas.

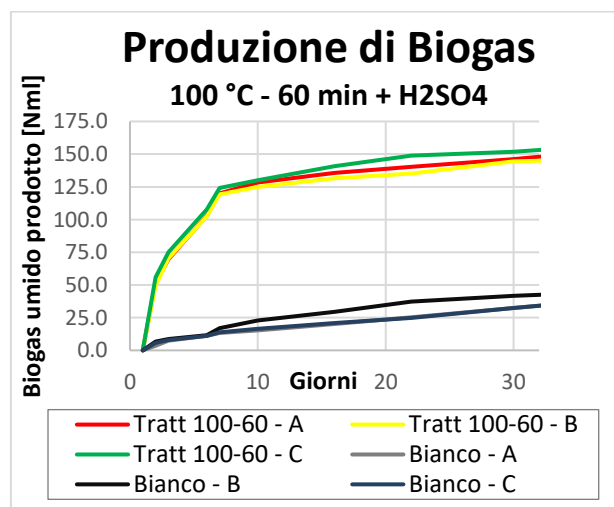
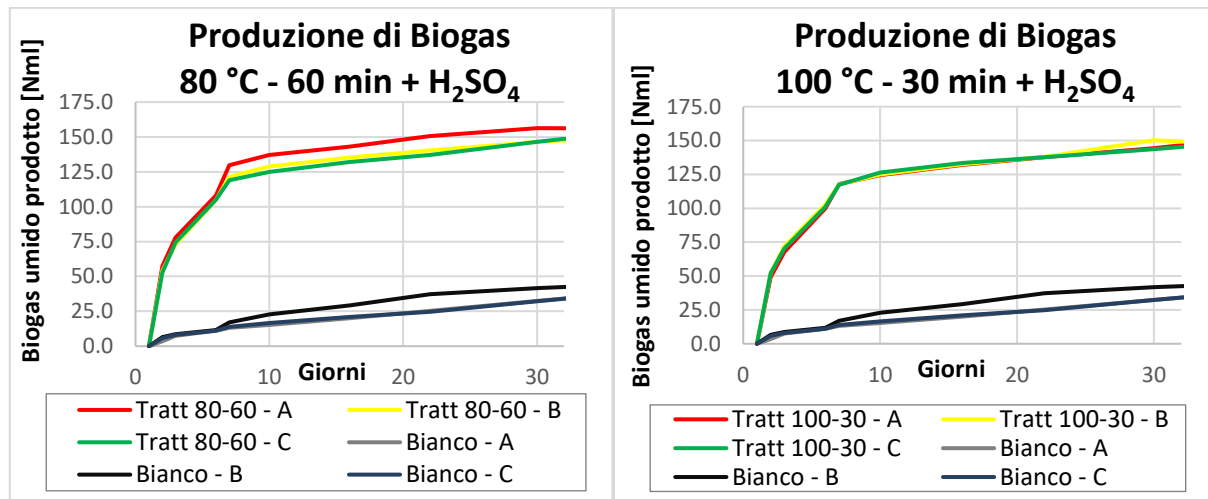
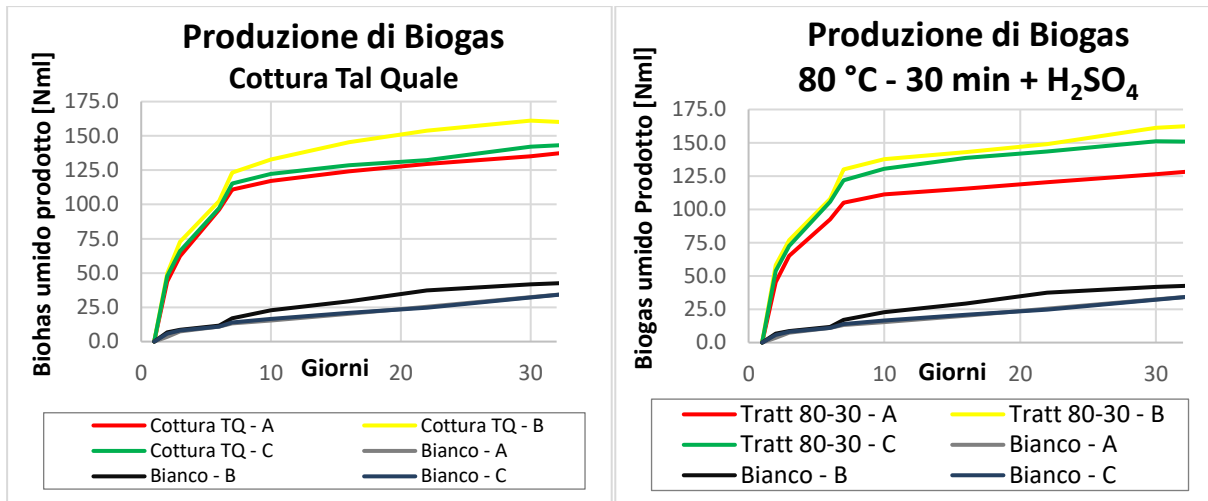
### 1.1 Primo gruppo di prove – Pretrattamento termico



1.2 Secondo gruppo di prove- Pretrattamento termo – basico

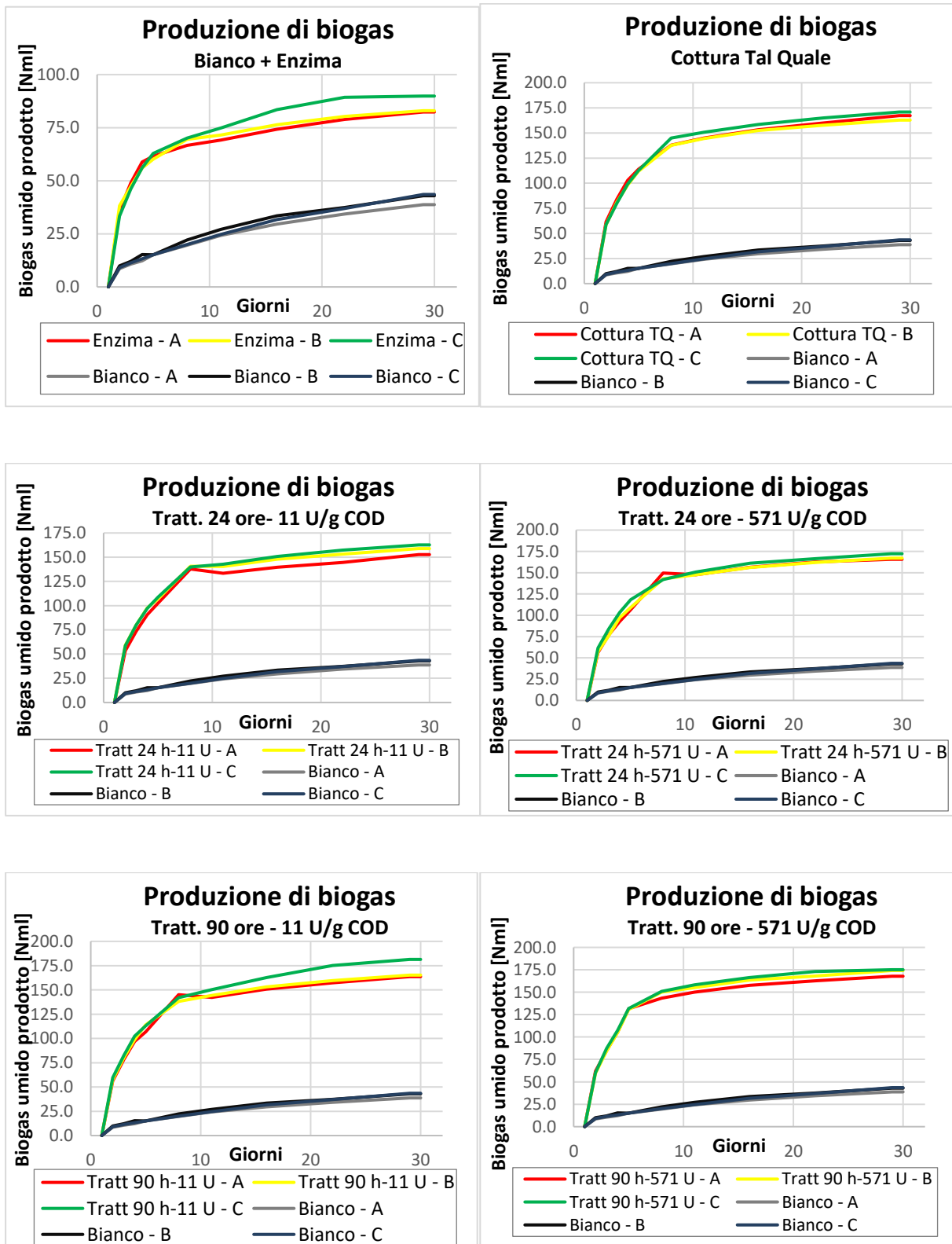


1.3 Terzo gruppo di prove- Pretrattamento termo – acido

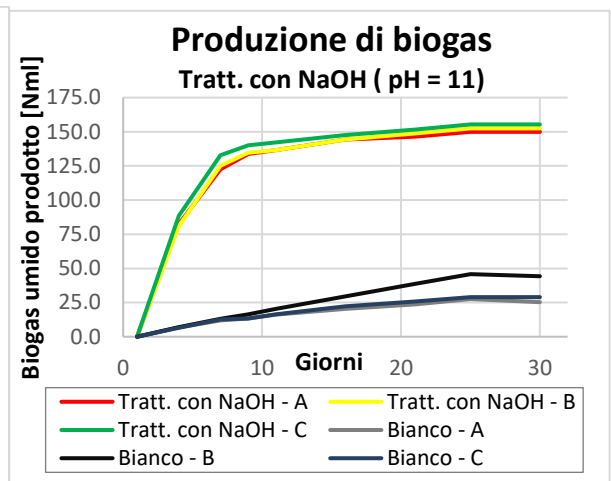
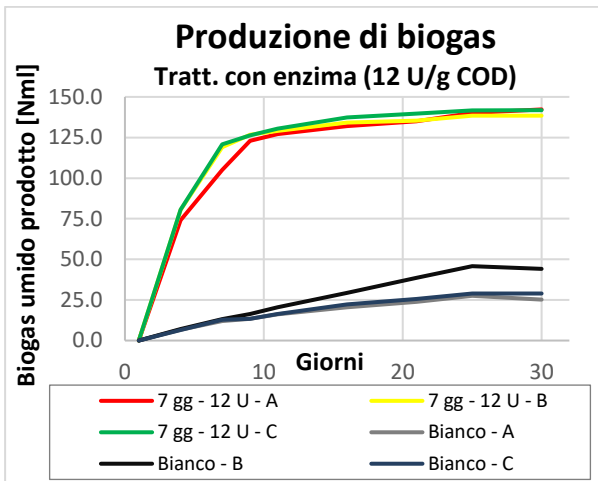
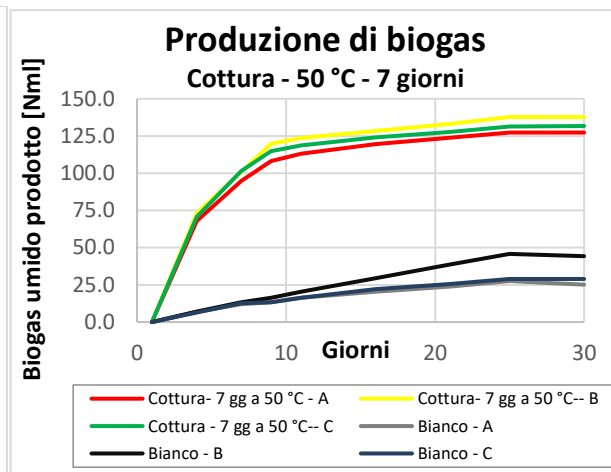
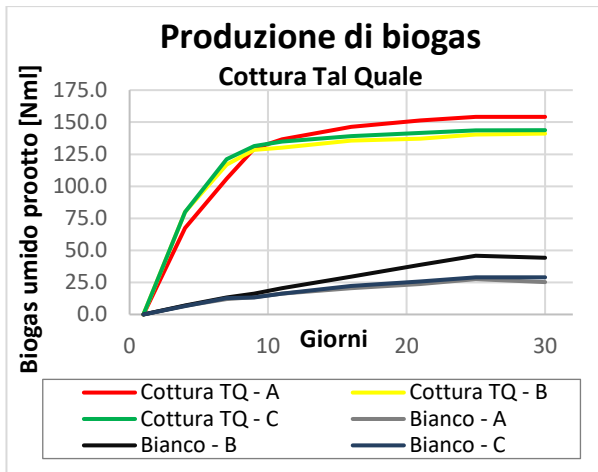




1.4 Quarto gruppo di prove- Pretrattamento enzimatico



1.5 Quinto gruppo di prove- Pretrattamenti misti



## 2. STIMA SOLFATI E ACIDO SOLFIDRICO

Vengono riportate le stime di concentrazione massima attesa di acido solfidrico nel mix di prova.

Bottiglia di prova	Stima $\text{SO}_4^{2-}$ [mg/L]	Stima $\text{S}^{2-}$ [mg/L]	Massimo $\text{H}_2\text{S}$ atteso [mg/L]
80 °C - 30 min + H2SO4-A	132.2	44.1	46.9
80 °C - 30 min + H2SO4-B	130.0	43.4	46.1
80 °C - 30 min + H2SO4-C	130.0	43.4	46.1
80 °C - 60 min + H2SO4-A	125.7	42.0	44.6
80 °C - 60 min + H2SO4-B	125.7	42.0	44.6
80 °C - 60 min + H2SO4-C	124.9	41.7	44.3
100 °C - 30 min + H2SO4-A	116.1	38.8	41.2
100 °C - 30 min + H2SO4-B	116.2	38.8	41.2
100 °C - 30 min + H2SO4-C	116.2	38.8	41.2
100 °C - 60 min + H2SO4-A	105.8	35.3	37.5
100 °C - 60 min + H2SO4-B	105.8	35.3	37.6
100 °C - 60 min + H2SO4-C	106.0	35.4	37.6