



Università
degli Studi di
Messina



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



REACT EU

UNIVERSITÀ DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA

Dottorato di Ricerca (D.M.45/2013)

“Ingegneria e Chimica dei Materiali e delle Costruzioni”

XXXVII Ciclo S.S.D. ING-IND/22

*Valorizzazione degli scarti di lavorazione industriale
del pesce azzurro in composti nutraceutici,
bioenergia e fertilizzanti organici*

Candidata:
Altea Pedullà

Coordinatore:
Edoardo Proverbio

Tutor:
Prof. Lucio Maria Bonaccorsi

Co-tutor:
Prof. Paolo Salvatore Calabrò

INDICE

INDICE.....	1
INDICE DELLE FIGURE.....	7
INTRODUZIONE.....	11
1 INTRODUZIONE ALL'ECONOMIA CIRCOLARE E ALLA BIORAFFINAZIONE.....	17
1.1 Economia Circolare.....	18
1.1.1 Strategia dell'Unione Europea per la transizione verso l'economia circolare.....	24
1.2 Bioraffinazione.....	29
1.3 Struvite: un promettente biofertilizzante	32
1.4 Ruolo dei solventi nei processi di bioraffinazione.....	36
1.4.1 N-esano.....	39
1.4.2 d-Limonene.....	42
1.4.3 Etanolo.....	46
1.4.4 2-Metiltetraidrofurano	49
1.4.5 Cirene	51
1.5 I colori del futuro	53
1.5.1 Green Chemistry	53
1.5.2 Blue economy.....	61
2 APPLICAZIONE DELLA BLUE ECONOMY ALL'INDUSTRIA ITTICA	65

2.1 Trasformazione blu	66
2.2 Consumo di pesce.....	69
2.3 Scarti di pesce: un sottoprodotto di valore	73
2.3.1 Valorizzazione degli scarti del pesce in prodotti per la salute umana	76
2.3.2 Prodotti della valorizzazione del pesce non destinati al consumo umano	81
2.3.3 Produzione di farina e olio di pesce	83
2.4 Acidi grassi Omega-3	85
2.4.1 Produzione e consumo di Omega-3.....	86
2.4.2 Benefici apportati dal consumo di Omega-3	88
2.4.3 Estrazione convenzionale dell'olio di pesce per la produzione di Omega-3	92
2.4.4 Alternative Green per l'estrazione di olio di pesce .	93
2.5 Nuovo approccio per l'estrazione dell'olio di pesce.....	96
2.6 Scarti del pesce come fertilizzanti	98
2.7 Valorizzazione degli scarti di tonno: potenzialità e sostenibilità nella filiera ittica.....	104
3 DIGESTIONE ANAEROBICA.....	109
3.1 Fasi della digestione anaerobica.....	111
3.2 Parametri della digestione anaerobica	117
3.2.1 Temperatura	117
3.2.2 pH	119

3.2.3 Concentrazione di acidi grassi volatili e rapporto FOS/TAC	120
3.2.4 Rapporto C/N.....	124
3.2.5 Carico organico	127
3.2.6 Tempo di Residenza Idraulico	127
3.2.7 Composti inibenti.....	129
3.2.8 Crescita microbica	131
3.3 Test di biometanazione (BMP)	134
3.3.1 Gestione dell'inoculo e del substrato.....	135
3.3.2 Soliti totali e solidi volatili.....	136
3.3.3 Modalità di allestimento e conduzione della prova.....	138
3.3.4 Soluzioni nutrienti.....	140
3.3.5 Avvio e termine dell'esperimento.....	141
3.3.6 Modalità di misura del metano prodotto.....	142
3.3.7 Cinetiche di reazione nella digestione anaerobica.....	143
3.4 Potenziale teorico di metano	145
3.5 Valorizzazione del digestato	146
3.6 Classificazione dei processi e delle tecnologie di digestione anaerobica.....	149
3.7 Vantaggi della co-digestione anaerobica	153
4 MATERIALI E METODI PER LA VALORIZZAZIONE DEGLI SCARTI DEL PESCE	157

4.1 Test in batch per la valutazione dell'effetto dei solventi sulla digestione anaerobica	158
4.2 Filiera del tonno: Callipo s.r.l.	165
4.3 Preparazione dei materiali per il processo di bioraffinazione degli scarti della filiera ittica	167
4.4 Estrazione dell'olio di pesce	171
4.4.1 Determinazione acidi grassi	177
4.5 Test in semi-continuo	178
4.5.1 Caratterizzazione dei materiali utilizzati nei test in semi-continuo	179
4.5.2 Avvio e svolgimento del test	181
4.6 Test di fitotossicità.....	185
4.7 Valorizzazione del digestato per la produzione di struvite	188
5 RISULTATI E DISCUSSIONE SULLA PRODUZIONE DI BIOPRODOTTI E BIOENERGIA	191
5.1 Risultati dei test di biometanazione	193
5.1.1 Produzione di metano	193
5.1.2 Comparazione dei risultati.....	205
5.1.3 Analisi del digestato	207
5.1.4 Parametri cinetici	210
5.2 Risultati delle estrazioni di olio di pesce	215
5.3 Test in semi-continuo	221
5.3.1 Produzione di metano	223

5.3.2	Analisi settimanali	227
5.3.3	Confronto tra i risultati dei test BMP e in semi-continuo	232
5.3.4	Considerazioni conclusive sui test in semi-continuo... ..	233
5.4	Risultati dei test di fitotossicità	235
5.5	Risultati test per la produzione di struvite	238
	Conclusioni e prospettive.....	243
	Bibliografia.....	249

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1 Confronto tra economia lineare e circolare	22
Figura 2 Gerarchia di gestione dei rifiuti [11]	29
Figura 3 Ciclo di bioraffinazione con impiego di solventi.....	36
Figura 4 Formula strutturale di n-esano	40
Figura 5 Formula strutturale di d-Limonene.....	43
Figura 6 Formula strutturale dell'etanolo	47
Figura 7 Formula strutturale del 2-Meox.....	50
Figura 8 Formula strutturale del cirene	52
Figura 9 Blue economy.....	62
Figura 10 Obiettivi per lo sviluppo sostenibile riportati nell'Agenda 2030 [78].....	64
Figura 11 Produzione mondiale di prodotti ittici [87].....	70
Figura 12 Emissioni di gas serra lungo tutta la filiera di alcune tipologie di alimento [93].....	72
Figura 13 Percentuali di pesce scartato o processato per scopi alimentari [94]	74
Figura 14 Utilizzo di farina e olio di pesce [84]	84
Figura 15 Materia prima utilizzata per la riduzione in farina di pesce e olio di pesce, 2020 [107].....	85
Figura 16 Rappresentazione schematica del processo di estrazione dell'olio di pesce.....	97

Figura 17 Flussi di input e output in un reattore di digestione anaerobica	111
Figura 18 Rappresentazione semplificata del processo di digestione anaerobica [140].....	112
Figura 19 Fasi di crescita e densità batterica [181].....	132
Figura 20 Soluzioni nutrienti.....	141
Figura 21 Trappola alcalina.....	143
Figura 22 Design dell'esperimento	158
Figura 23 Preparazione del substrato.....	160
Figura 24 Reattori batch	163
Figura 25 Tonno Yellowfin	166
Figura 26 Interiora	168
Figura 27 Teste di tonno	168
Figura 28 Ossa del tonno, fase di asciugatura	169
Figura 29 Ossa del tonno	169
Figura 30 Ossa del tonno triturate, post trattamento a 70°C.....	170
Figura 31 Ossa del tonno triturate, post trattamento a 550°C.....	170
Figura 32 Orbital incubator.....	173
Figura 33 Estrazione dalle interiora con tre diversi solventi (d-Limonene, 2-Meox, etanolo): Fase solida e fase liquida.....	174
Figura 34 Estrazione dalle teste con tre diversi solventi (etanolo, d-Limonene, olio essenziale): Fase solida e fase liquida.....	174
Figura 35 Rotavapor	176
Figura 36 Olio di pesce estratto con d-Limonene	176

Figura 37 Reattori in semi-continuo	182
Figura 38 Messa in dimora delle piantine - Misuratore di pH e umidità	187
Figura 40 Schema di processo	192
Figura 41 Produzione netta cumulata di metano - d-Limonene I fase	194
Figura 42 Produzione netta cumulata di metano - d-Limonene II fase	195
Figura 43 Produzione netta cumulata di metano - Etanolo I fase	196
Figura 44 Produzione netta cumulata di metano - Etanolo II fase.....	197
Figura 45 Produzione netta cumulata di metano, riferita al solo etanolo - Etanolo I fase.....	198
Figura 46 Produzione netta cumulata di metano - n-Esano I fase	201
Figura 47 Produzione netta cumulata di metano - n-Esano II fase.....	201
Figura 48 Produzione netta cumulata di metano – 2-Meox I fase.....	202
Figura 49 Produzione netta cumulata di metano – 2-Meox II fase	203
Figura 50 Produzione netta cumulata di metano – Cirene I fase.....	204
Figura 51 Produzione netta cumulata di metano – Cirene II fase	205
Figura 52 Confronto tra i BMP di ogni ciclo	205
Figura 53 Test con d-Limonene: analisi del digestato	208
Figura 54 Test con etanolo: analisi del digestato.....	208
Figura 55 Test con n-esano: analisi del digestato.....	209
Figura 56 Test con 2-Meox: analisi del digestato.....	210
Figura 57 Test con cirene: analisi del digestato	210
Figura 58 Prodotti delle estrazioni di olio di pesce	217

Figura 59 Produzione specifica cumulata di metano	223
Figura 60 Produzione specifica di metano.....	226
Figura 61 Produzione cumulata di metano	227
Figura 62 pH – andamento giornaliero	228
Figura 63 rapporto FOS/TAC - andamento settimanale	231
Figura 64 VFA - andamento settimanale.....	231
Figura 65 Rendimento di rimozione di N-NH ₄ ⁺ - digestato B.....	239
Figura 66 Rendimento di rimozione di P-PO ₄ ³⁻ - digestato B.....	240
Figura 67 Rendimento di rimozione di N-NH ₄ ⁺ - digestato C.....	241
Figura 68 Rendimento di rimozione di P-PO ₄ ³⁻ - digestato C.....	241

INTRODUZIONE

La sostenibilità è stata definita come “la capacità di soddisfare i bisogni del presente senza compromettere la capacità delle generazioni future di soddisfare i propri bisogni”. Tale affermazione, tratta dal rapporto Brundtland del 1987, chiarisce la necessità di modificare il pensiero comune nell’ottica del benessere della nostra specie. Le generazioni precedenti hanno attentato alla salute del pianeta sperperando risorse in maniera scellerata, reputandole infinite e prontamente disponibili. Dai tempi dell’industrializzazione la coscienza ambientale è cresciuta e maturata, è sempre più evidente come sia necessario un cambio di rotta per il benessere della popolazione presente e futura. Nonostante il dibattito filosofico apra nuove porte a idee e orizzonti promettenti, la realtà dei fatti è ben lontana da una soluzione che soddisfi la definizione di sostenibilità.

Il libro *Energia per l’Astronave Terra* di Armaroli e Balzani offre una metafora potente per comprendere al meglio i limiti di fronte ai quali la specie umana è posta. Gli autori descrivono la Terra come un’astronave, con risorse limitate che devono essere gestite con attenzione per garantire la sopravvivenza dell’umanità. Questa visione anticipava l’attuale dibattito sulla sostenibilità, sottolineando che il nostro pianeta è un sistema chiuso, dove lo spreco e l’uso indiscriminato delle risorse possono portare a conseguenze disastrose. L’uomo rappresenta l’equipaggio dell’astronave, responsabile non solo della propria sopravvivenza ma anche di quella delle generazioni future.

L'ambiente, come sottolineano Armaroli e Balzani, è la base su cui poggiano la nostra società e la nostra economia. Le sfide ambientali, come l'inquinamento, la deforestazione e il cambiamento climatico, minacciano la capacità delle generazioni future di soddisfare i propri bisogni. La coscienza ambientale richiede la conservazione degli ecosistemi naturali, la riduzione delle emissioni di carbonio e la gestione responsabile delle risorse.

Oggi, il concetto di sostenibilità si fonda sulla necessità di bilanciare la crescita economica, la tutela dell'ambiente e il benessere sociale. Tuttavia, queste tre dimensioni sono spesso in conflitto tra loro. Da un lato, la crescita economica è essenziale per migliorare il tenore di vita delle persone, ma se perseguita senza riguardo per l'ambiente, può portare a devastanti conseguenze ecologiche e sociali. Dall'altro, la conservazione degli ecosistemi naturali e la gestione responsabile delle risorse sono fondamentali per garantire che le future generazioni possano prosperare.

L'innovazione e la tecnologia possono essere potenti alleati nella lotta per la sostenibilità, come suggerito nel libro. La creazione di posti di lavoro verdi, l'uso efficiente delle risorse e l'adozione di tecnologie pulite non solo riducono l'impatto ambientale, ma possono anche stimolare la crescita economica e migliorare la qualità della vita. Tuttavia, affinché queste soluzioni siano efficaci, devono essere integrate in un sistema che valorizzi la giustizia sociale e l'equità, garantendo a tutti l'accesso alle risorse e ai benefici della crescita economica.

Nonostante le sfide, c'è motivo di speranza. L'adozione di tecnologie verdi e l'investimento in energie rinnovabili stanno dimostrando che è possibile conciliare la crescita economica e sociale con la tutela

dell'ambiente. Queste innovazioni non solo riducono la dipendenza dai combustibili fossili, ma creano anche nuove opportunità economiche e promuovono una società più equa e responsabile.

La metafora della “*Astronave Terra*” permette di comprendere a pieno quali siano i pericoli legati all'ignorare i limiti del nostro pianeta. Questo avvertimento è particolarmente rilevante quando si parla di risorse marine, che sono spesso considerate infinite solo perché non sono visibili come le risorse terrestri. Infatti, il mare, pur rivestendo il 70% della superficie terrestre, non è affatto una risorsa inesauribile. La blue economy, che abbraccia le attività economiche legate all'oceano, rappresenta una sfida enorme per la sostenibilità. L'uso spropositato delle risorse marine, come la pesca intensiva e l'inquinamento, mette a rischio la salute degli ecosistemi marini e la sicurezza alimentare globale.

Gli oceani sono un sistema complesso e delicato, che può facilmente essere destabilizzato dalle attività umane. La blue economy deve quindi essere vista non solo come un'opportunità economica, ma come un imperativo etico: è necessario ripensare il rapporto dell'uomo con il mare, non come una risorsa da sfruttare senza limiti, ma come un ecosistema da proteggere e valorizzare in modo sostenibile.

È necessario abbandonare l'idea di essere passeggeri e diventare invece membri responsabili di un equipaggio che lavora insieme per garantire un futuro sostenibile per tutti. La blue economy è una parte fondamentale di questa visione, offrendo una strada verso un uso sostenibile delle risorse marine.

Il presente lavoro di tesi si inserisce in questo contesto proponendo una strategia di valorizzazione degli scarti di lavorazione del pesce. Il settore

ittico è un ampio settore che include diversi processi di produzione come filettatura, salatura, affumicatura, inscatolamento, ecc. Al giorno d'oggi, si stima che oltre il 70% delle catture totali di pesce vengano processate, generando una grande quantità di rifiuti solidi e sottoprodotti, che spesso rappresentano più del 50% del peso totale del pesce.

La bioraffinazione, un processo che trasforma le biomasse in bioenergia e bioprodotto, si inserisce perfettamente in questo contesto, offrendo soluzioni innovative per la valorizzazione dei rifiuti organici e promuovendo la sostenibilità. Le bioraffinerie operano su principi simili a quelli delle raffinerie petrolchimiche, ma utilizzano biomassa rinnovabile come materia prima. Questo approccio non solo riduce la dipendenza dai combustibili fossili, ma genera anche una vasta gamma di prodotti a valore aggiunto, come biocarburanti, bioplastiche, prodotti chimici e fertilizzanti.

Il processo di bioraffinazione proposto nel presente elaborato nasce dall'esigenza di gestire al meglio il flusso di scarti provenienti da un'azienda locale, la Callipo s.r.l., che basa la sua produzione sulla lavorazione del tonno. Tuttavia, tale approccio, se adattato, può essere implementato su una vasta gamma di scarti di pesce di piccola e grande taglia. L'obiettivo ultimo è quello di produrre in maniera sostenibile e poco energivora prodotti di valore.

L'elaborato è stato suddiviso in cinque capitoli.

Nel primo capitolo, vengono esplorati i principi cardine dell'economia circolare, della bioraffinazione. Questa sezione fornisce una panoramica completa sui concetti base necessari per comprendere appieno la ricerca condotta. Si discuteranno le basi teoriche e pratiche di ciascun

argomento, ponendo le fondamenta per la comprensione dei capitoli successivi.

Il secondo capitolo si focalizza sulla blue economy, con un'attenzione particolare alle filiere ittiche del pesce. Vengono esaminati i processi di estrazione dell'olio di pesce e le sue proprietà, esplorando i vari campi di applicazione degli scarti del pesce. Questa sezione mette in luce come le risorse marine possono essere gestite in modo sostenibile, trasformando i rifiuti in risorse preziose.

Nel terzo capitolo si approfondiscono vari aspetti della digestione anaerobica, riportando i fattori chiave delle diverse fasi del processo e i parametri principali che ne influenzano l'efficacia. Viene discussa la procedura impiegata per la valutazione del massimo potenziale metanigeno di un substrato (test BMP), impiegata nella fase sperimentale del presente elaborato. Si discutono inoltre i vantaggi della co-digestione anaerobica, con particolare attenzione alle sinergie e ai benefici ambientali del processo.

Nel quarto capitolo, sono presentati i materiali e i metodi utilizzati durante la ricerca. Questa sezione include i dettagli sull'attività sperimentale per la valutazione preliminare dell'effetto di diversi solventi sul processo di digestione anaerobica in batch. Successivamente vengono riportate le procedure impiegate per l'estrazione dell'olio di pesce da diversi scarti del tonno e viene descritta la messa in opera dei test in semi-continuo per valutare la produzione di metano generata da scarti provenienti da diverse estrazioni. Infine, sono riportate le procedure per i test di fitotossicità del digestato e di estrazione di struvite. Sono descritti i protocolli sperimentali e le tecniche utilizzate, fornendo una chiara visione delle procedure adottate.

Infine, l'ultimo capitolo presenta i risultati ottenuti da ciascun test. Questa sezione discute i dati raccolti, analizzando l'efficacia dei metodi impiegati. I risultati saranno interpretati alla luce dei concetti discussi nei capitoli precedenti, offrendo una visione completa delle potenzialità e delle sfide legate all'applicazione dei principi di economia circolare e blue economy nel contesto della bioraffinazione e della gestione sostenibile delle risorse marine.

1 INTRODUZIONE ALL'ECONOMIA CIRCOLARE E ALLA BIORAFFINAZIONE

La transizione verso un modello di economia circolare rappresenta una delle sfide più urgenti e ambiziose del nostro tempo. All'interno di questo scenario, l'Unione Europea ha adottato una strategia per promuovere l'economia circolare, mirata a ridurre al minimo la produzione di rifiuti, mantenere il valore dei prodotti e dei materiali il più a lungo possibile attraverso il riuso, la riparazione, il riciclo e la rigenerazione, evitando così che diventino rapidamente obsoleti o inutilizzabili, e promuovere l'uso efficiente delle risorse.

La bioraffinazione si sviluppa come una componente chiave di questa transizione permettendo la conversione di biomasse in una gamma di prodotti bio-based ad alto valore aggiunto, tra cui bioenergia, biochemicals e biomateriali. In particolare, la digestione anaerobica rappresenta un processo fondamentale nello scenario della bioraffinazione, convertendo i rifiuti organici in biogas e digestato.

Parallelamente, l'uso di solventi nei processi di bioraffinazione gioca un ruolo cruciale nell'estrazione dei composti bioattivi. Solventi di origine biologica offrono alternative più sostenibili rispetto ai solventi tradizionali derivati dal petrolio, contribuendo a ridurre l'impatto ambientale dell'intera filiera.

Ognuno di questi temi verrà esplorato ed approfondito nel seguente capitolo al fine di fornire al lettore una panoramica attuale del contesto in cui si è sviluppata l'attività di ricerca del presente lavoro di tesi.

1.1 Economia Circolare

Nonostante l'evoluzione dei sistemi economici ed il progresso tecnologico procedano in maniera incalzante, il modello di economia che guida la società non si è ancora totalmente discostato da quello acquisito durante gli anni dell'industrializzazione: si tratta dell'ormai consolidato modello "take-make-dispose", ovvero il modello economico lineare. Questo modello prevede l'estrazione delle risorse (take), la loro trasformazione in prodotti (make), e infine lo smaltimento dei rifiuti generati (dispose) senza considerare il riutilizzo o il riciclo (Figura 1). Durante il secolo scorso, la questione dell'impatto ambientale era considerata minore, in quanto la semplicità ed il basso costo di approvvigionamento delle risorse favorivano una modalità di impiego dei prodotti tale per cui non vi era l'urgenza di ridurre la produzione di scarti. Ad oggi, la crisi delle risorse e l'aumento della popolazione mondiale, con conseguente aumento dei consumi, stanno mettendo in crisi questo modello di economia, in quanto il progressivo esaurimento delle materie prime collide con la necessità di una produzione più intensa e con un minore impatto ambientale.

Per affrontare questa emergenza, che sta diventando sempre più pressante, è fondamentale ridurre al minimo sia le risorse impiegate nei processi produttivi (input) sia i rifiuti generati (output). Ciò implica non solo diminuire la quantità di materie prime, energia e acqua utilizzate

per la produzione, ma anche sviluppare soluzioni innovative per gestire i rifiuti e gli scarti, trasformandoli in nuove risorse. In altre parole, è necessario passare da un modello in cui i prodotti vengono semplicemente consumati e poi scartati, a un modello in cui i prodotti e i materiali vengono utilizzati e riutilizzati al massimo delle loro potenzialità, riducendo così al minimo le emissioni e l'impatto ambientale.

Il meccanismo di funzionamento del modello take-make-dispose prevede che le industrie impieghino risorse e materie prime per fabbricare un prodotto, il quale viene venduto a un consumatore finale, che lo conferisce per lo smaltimento quando non serve più al suo scopo. Il limite intrinseco di questo modello può essere riassunto in due fasi principali di perdita: durante il processo produttivo e al termine della vita utile del prodotto.

Il processo produttivo di un prodotto prevede l'impiego di quantità significative di materiale, le quali non entrano a far parte del vero e proprio ciclo di vita del prodotto stesso ma vengono "perse" come rifiuti ed emissioni della catena di produzione. Queste perdite si sommano a quelle legate allo smaltimento del prodotto a fine vita, in quanto molti materiali non vengono recuperati o riciclati. Molti materiali hanno tutt'ora tassi di recupero molto bassi, cioè solo una piccola frazione dei materiali può essere effettivamente recuperata e riutilizzata rispetto alla quantità di materie prime impiegate nella produzione. Questo significa che la produzione continua a dipendere in gran parte da nuove risorse piuttosto che da materiali riciclati. Inoltre, non tutti i materiali sono riciclabili: solo alcune tipologie di rifiuti vengono effettivamente trasformate in materie prime seconde, cioè materiali recuperati dai

rifiuti attraverso processi di riciclo e reintrodotti nel ciclo produttivo come risorse alternative alle materie prime vergini.

La perdita di materia non è però l'unico anello debole di un modello di economia lineare; anche l'uso dell'energia richiede un'attenta considerazione. Nel sistema lineare, lo smaltimento di un prodotto avviene principalmente attraverso il conferimento in discarica, ma questo comporta la perdita di tutta l'energia residua contenuta nel prodotto stesso. Per energia residua si intende l'energia che è stata impiegata per la produzione e che rimane intrinsecamente legata ai materiali e al prodotto finale, come l'energia incorporata nelle materie prime, nella lavorazione e nel trasporto. Per recuperare parte di questa energia, vengono impiegate soluzioni come il riciclo e la termovalorizzazione. Tuttavia, la soluzione più auspicabile rimane senza dubbio il riuso, poiché riutilizzare un prodotto significa evitare l'immissione di nuova materia prima e nuova energia nel ciclo produttivo. Queste soluzioni, ovvero riuso, riciclo e recupero, sono incoraggiate dall'Unione Europea secondo una gerarchia specifica di gestione dei rifiuti, che verrà discussa in maniera approfondita nel paragrafo 1.1.1.

I processi di estrazione, lavorazione ed impiego delle materie prime producono un impatto ambientale a causa dell'elevata richiesta di energia e delle relative immissioni nell'atmosfera di CO₂ (anidride carbonica), ma non solo, gli stessi processi comportano l'immissione di diverse sostanze dannose agli ecosistemi, al suolo, all'acqua e al genere umano.

Un necessario cambio di rotta riguardo il modello economico attualmente più impiegato non è giustificato esclusivamente da

motivazioni di tipo ambientalistico, ma anche politiche, in quanto il bisogno di materie prime, in stati in cui esse sono carenti o assenti, comporta una dipendenza per l'approvvigionamento di queste verso altri paesi; un'economia rivolta al riuso ed al riciclo può comportare, anche se solo in parte, una maggiore autonomia e indipendenza.

I limiti del modello take-make-dispose, il progressivo esaurimento delle risorse, l'aumento della popolazione e quindi dei consumi globali, e la necessità di rispondere alle crescenti sfide ambientali, rendono urgente l'adozione di un nuovo modello economico. In questo nuovo paradigma, il processo produttivo non segue più un andamento lineare, che porta all'impovertimento delle risorse e alla produzione di rifiuti, ma si evolve verso un modello circolare, in cui il concetto di "fine vita" viene completamente rivoluzionato. L'economia circolare rappresenta un approccio innovativo che mira a ridurre gli sprechi e a massimizzare l'utilizzo delle risorse attraverso cicli continui di produzione, consumo e recupero. Questo approccio sostenibile è diventato sempre più rilevante nel contesto attuale caratterizzato da crescenti preoccupazioni ambientali e dalla necessità di affrontare sfide quali il cambiamento climatico e la perdita di biodiversità. Esso trova le sue fondamenta in condivisione, prestito, ricondizionamento e riciclo dei prodotti, in modo da prolungarne la vita utile; essi sono progettati per essere riutilizzati, smontati, rimessi a nuovo o riciclati, in modo da ridurre al minimo la produzione di rifiuti.



Figura 1 Confronto tra economia lineare e circolare

Questo nuovo modello di economia fonda le sue radici sulla necessità di conciliare smaltimento dei rifiuti e riduzione dell'impiego delle materie prime, si affaccia sul panorama delle fonti di energia di tipo rinnovabile e riduce l'uso di sostanze dannose che potrebbero inficiare il riutilizzo ed il riciclo di materiali di scarto. Il termine *progettare* acquisisce un nuovo significato, non più sola progettazione di un prodotto, ma anche del "rifiuto" che deriverà da quel prodotto, con l'obiettivo di giungere a fine vita con elementi smontabili, riutilizzabili o riciclabili. In questo modo il ciclo di vita di un prodotto viene esteso, riducendo i rifiuti e la domanda di nuove materie prime. Gli elementi del prodotto, ove possibile, una volta terminata la propria funzione, vengono reimmessi nel ciclo produttivo, acquisendo dunque ulteriore valore.

Il motivo per cui un sistema circolare è facilmente conciliabile con le fonti di energia di tipo rinnovabile è da ricercarsi nel fatto che un sistema che riusa le materie prime è fortemente meno energivoro di un sistema

di tipo lineare, in cui queste materie hanno un ciclo di vita molto breve e, pertanto, è necessario estrarne sempre di nuove. Attualmente il 45% delle emissioni di anidride carbonica è causato dalla produzione di prodotti di uso quotidiano [1]. La fase che richiede maggiore energia nel ciclo di vita di un prodotto è, spesse volte, l'estrazione delle materie prime; riducendo al minimo questa fase è possibile minimizzare l'impiego di energia e ciò permetterebbe un passaggio più efficace verso le fonti rinnovabili. Queste considerazioni comportano un naturale risvolto: l'uso razionale delle materie prime contribuisce a diminuire le emissioni di gas serra nell'ambiente. Un modello circolare di economia non soltanto porterebbe giovamento sotto un punto di vista ambientale, ma rappresenterebbe un'opportunità di risparmio fino a 630 miliardi di dollari per alcuni dei settori manifatturieri dell'UE [2]. Il raggiungimento di un'economia circolare a regime permetterebbe di ridurre la pressione ambientale, minimizzando l'estrazione di materie prime, riducendo le emissioni di gas serra e di sostanze tossiche e inquinanti, ma anche di migliorare la qualità di vita dell'uomo, aumentando la crescita economica e l'occupazione, ma anche consentendo ai consumatori di fare uso di prodotti innovativi e durevoli, favorendo un risparmio economico non indifferente.

In Europa, l'economia circolare è al centro dell'agenda politica, con l'adozione di legislazioni e politiche volte a promuovere pratiche sostenibili e a ridurre l'impatto ambientale delle attività industriali. La strategia europea per l'economia circolare, insieme al pacchetto normativo sull'economia circolare, fornisce un quadro normativo completo per guidare la transizione verso un'economia più circolare e sostenibile.

1.1.1 Strategia dell'Unione Europea per la transizione verso l'economia circolare

Negli ultimi anni il Parlamento Europeo ha attuato strategie sempre più stringenti per favorire la transizione da un modello di economia lineare ad uno circolare, premiando la progettazione di prodotti più sostenibili, impiegando politiche di riduzione di rifiuti mediante il “diritto alla riparazione” e ponendo maggiore attenzione su settori con domanda di risorse elevata (tecnologico, tessile, delle costruzioni etc.), ma anche scoraggiando l'impiego dell'obsolescenza programmata - strategia peculiare del modello di industria lineare - ed inoltre introducendo norme più severe sul riciclo. L'Europa ha adottato diverse iniziative per promuovere e sostenere l'economia circolare, riconoscendola come un elemento chiave per affrontare le sfide ambientali e promuovere la sostenibilità. A partire dal 2015 la Commissione Europea ha adottato un nuovo pacchetto per l'economia circolare, concentrandosi su diverse aree chiave, tra cui il miglioramento del design dei prodotti, la promozione della riciclabilità, il sostegno alla riconversione industriale e una revisione delle proposte legislative sui rifiuti. Alcuni degli interventi proposti dall'UE per favorire la transizione ad un'economia circolare sono stati:

- Finanziamenti provenienti da Horizon 2020 e dai fondi strutturali;
- Azioni per ridurre i rifiuti alimentari e strumenti per raggiungere l'obiettivo di 50% di rifiuti in meno entro il 2030;
- Sviluppo di norme di qualità per le materie prime seconde;
- Revisione del regolamento relativo ai concimi per agevolare il riconoscimento dei concimi organici e di quelli ricavati dai rifiuti nel mercato unico e sostenere il ruolo dei bionutrienti.

Inoltre sono state effettuate altre proposte riguardanti la riparabilità e il riutilizzo dei prodotti, una migliore gestione delle acque e una maggiore attenzione sui prodotti in plastica [3].

Nel 2018 la Direttiva sull'economia circolare (2018/851/UE) ha stabilito obiettivi più ambiziosi per il riciclo dei rifiuti, limitando l'uso di discariche, andando ad integrare la direttiva sui rifiuti (2008/98/CE) che aveva già come obiettivo una migliore gestione dei rifiuti, la riduzione degli sprechi e l'aumento del riciclo e del riuso dei materiali [4].

L'iniziativa più significativa annunciata dall'Europa è stata il *Green Deal*, nel 2019; esso mira a rendere l'Europa il primo continente climaticamente neutro entro il 2050 e rappresenta una risposta alle sfide ambientali, climatiche e sociali che l'UE e il mondo intero devono affrontare. Gli obiettivi principali del *Green Deal* includono la riduzione delle emissioni di gas serra, il miglioramento dell'efficienza energetica, l'adozione di fonti energetiche rinnovabili, la promozione dell'agricoltura sostenibile e della mobilità pulita, nonché la protezione della biodiversità e degli ecosistemi. Il *Green Deal* si propone anche di promuovere la crescita economica sostenibile e l'innovazione attraverso investimenti in tecnologie pulite e nella creazione di nuovi posti di lavoro nell'economia verde. Inoltre, mira a garantire una transizione equa per tutti, proteggendo i lavoratori e le comunità colpite dai cambiamenti strutturali legati alla transizione verso un'economia più sostenibile. Esso è un piano ambizioso e trasversale che coinvolge diversi settori, compresi l'energia, l'industria, l'agricoltura, i trasporti, l'ambiente e la politica sociale. Il suo obiettivo è quello di fornire una visione integrata e coerente per affrontare le sfide ambientali e

climatiche, promuovendo allo stesso tempo una crescita economica sostenibile [5]. Tra le iniziative chiave si evidenziano:

- Rendere l'UE il primo continente a impatto climatico zero entro il 2050;
- Ridurre le emissioni nette di gas serra del 55% entro il 2030, rispetto ai livelli del 1990;
- Piantare 3 miliardi di alberi entro il 2030.

Nel 2020 la Commissione Europea ha presentato "Un nuovo piano d'azione per l'economia circolare - Per un'Europa più pulita e più competitiva" [6]. Questo piano d'azione rappresenta un elemento fondamentale del *Green Deal* europeo ed è strettamente collegato alla strategia industriale europea. Il piano d'azione definisce un quadro globale per le azioni volte ad accelerare la transizione verso un "modello di crescita rigenerativa" che contribuirà in modo significativo al raggiungimento della neutralità climatica entro il 2050 e alla separazione della crescita economica dall'uso delle risorse. Al contempo, si assicura la competitività a lungo termine dell'UE senza compromettere nessuno stato.

Il piano d'azione per l'economia circolare comprende 35 punti d'azione, con un'enfasi strategica sui prodotti sostenibili. Questo piano sottolinea iniziative legate alla progettazione dei prodotti, ai processi produttivi e alla possibilità di dare ai consumatori e agli acquirenti pubblici la capacità di fare scelte informate. Le iniziative mirano alle principali catene di valore dei prodotti, con un interesse particolare ai prodotti alimentari. È stata prevista anche una revisione del quadro normativo in materia di gestione dei rifiuti. Tra i vari punti di questo piano, viene posta enfasi sui prodotti di natura organica; la Commissione si impegna,

infatti, a garantire la sostenibilità dei materiali rinnovabili di origine biologica, adottando azioni in linea con la strategia e il piano d'azione per la bioeconomia. Si stima che il 20% degli alimenti prodotti nell'UE venga perso o sprecato, nonostante la catena alimentare ponga notevoli pressioni sulle risorse e sull'ambiente. In conformità agli obiettivi di sviluppo sostenibile e nell'ambito della revisione della direttiva 2008/98/CE, la Commissione propone un obiettivo di riduzione degli sprechi alimentari come parte integrante del prossimo Piano agricolo dell'UE, nell'ambito della strategia Farm-to-Fork, che affronterà in modo completo la catena del valore alimentare [7]. Inoltre, la Commissione si impegna a esaminare misure specifiche per promuovere la sostenibilità della distribuzione e del consumo alimentare. Un ulteriore tema critico è il nuovo regolamento sul riutilizzo dell'acqua [8], che promuove approcci circolari al riutilizzo dell'acqua in agricoltura, mentre la Commissione promuove il riutilizzo e l'efficienza dell'acqua, anche nei processi industriali. Inoltre, sarà sviluppato un piano integrato di gestione dei nutrienti per garantire un'applicazione più sostenibile dei nutrienti e stimolare i mercati dei nutrienti recuperati. La Commissione sta valutando anche la possibilità di rivedere le direttive sul trattamento delle acque reflue e dei fanghi di depurazione, considerando anche i mezzi naturali per la rimozione dei nutrienti, come le alghe.

L'UE fornisce finanziamenti e incentivi per sostenere progetti e iniziative legate all'economia circolare attraverso programmi come Horizon Europe, LIFE e il fondo Europeo per gli investimenti strategici (EFSD). Questi finanziamenti possono essere utilizzati per sostenere la ricerca e lo sviluppo, l'innovazione tecnologica, la trasformazione industriale e l'adozione di pratiche commerciali sostenibili [9], [10].

L'obiettivo dell'Unione Europea è quello di adottare un approccio integrato e multisetoriale per promuovere l'economia circolare, con una combinazione di politiche legislative, finanziamenti, incentivi e partenariati per sostenere la transizione verso un'economia più sostenibile e circolare. Un elemento chiave di questa strategia è la gerarchia dei rifiuti (Figura 2), un principio guida che stabilisce l'ordine di priorità delle azioni da intraprendere per gestire i rifiuti in modo da ridurre il loro impatto ambientale. La gerarchia dei rifiuti, che pone al primo posto la prevenzione della produzione di rifiuti, seguita dal riutilizzo, dal riciclo, dal recupero energetico e, solo come ultima risorsa, dallo smaltimento in discarica, rappresenta una delle fondamenta su cui l'UE costruisce il suo impegno verso una gestione più efficiente delle risorse. Attraverso questa gerarchia, l'UE mira a minimizzare la produzione di rifiuti e a massimizzare il riutilizzo e il riciclo, promuovendo così un ciclo di vita dei prodotti che mantenga il loro valore il più a lungo possibile, contribuendo a ridurre la pressione sulle risorse naturali e a favorire un'economia che sia davvero sostenibile e rispettosa dell'ambiente.



Figura 2 Gerarchia di gestione dei rifiuti [11]

1.2 Bioraffinazione

I concetti cardine dell'economia circolare, risparmio, riuso e riciclo, potrebbero indurre a pensare che questa sia applicabile in maniera esclusiva ai prodotti di derivazione industriale chimica o metallurgica, tralasciando, di fatto, il ciclo produttivo delle biomasse. Nel contesto dell'urgente necessità di ridurre l'impatto ambientale delle attività umane e di promuovere uno sviluppo sostenibile, la bioraffinazione si afferma come un'innovativa strategia per sfruttare al meglio le risorse biologiche e ridurre la dipendenza dai combustibili fossili.

La bioraffinazione è un processo integrato che mira a trasformare biomasse rinnovabili, come legno, paglia, scarti agricoli e zootecnici e alghe, in una vasta gamma di prodotti utili tra cui biocarburanti, bioplastiche, prodotti chimici e biofertilizzanti. Questo approccio consente di valorizzare l'intera biomassa utilizzando ogni sua componente in modo efficiente e sostenibile.

Uno dei principali vantaggi della bioraffinazione è la sua capacità di ridurre le emissioni di gas serra e l'uso di risorse non rinnovabili. Trasformando biomasse in biocarburanti è possibile ridurre la dipendenza dai combustibili fossili e contribuire alla mitigazione dei cambiamenti climatici. Ad esempio, il processo di idrolisi enzimatica può convertire la cellulosa presente nella biomassa in zuccheri fermentabili che possono poi essere utilizzati per produrre biocarburanti come l'etanolo [12].

Inoltre, la produzione di bioprodotto chimici e materiali biodegradabili può contribuire a ridurre l'inquinamento causato da materiali plastici convenzionali. Ad esempio, i polimeri bioplastici derivati da biomasse possono essere utilizzati per sostituire plastica convenzionale in una varietà di applicazioni, dalla produzione di imballaggi alla produzione di utensili domestici [13].

La bioraffinazione si basa su una serie di processi tecnologici avanzati, tra cui la fermentazione, la pirolisi, l'idrolisi e l'estrazione, che consentono di separare e convertire i diversi componenti della biomassa in prodotti ad alto valore aggiunto. Questi processi possono essere applicati su scala industriale, rendendo la bioraffinazione una soluzione economica e scalabile per la produzione sostenibile di energia e materiali [14], [15].

Un altro aspetto importante della bioraffinazione è la sua flessibilità e adattabilità a diverse risorse e condizioni locali. Poiché può essere applicata a una vasta gamma di biomasse e integrata con altre attività agricole e industriali, la bioraffinazione non solo promuove l'efficienza nell'uso delle risorse, ma può anche stimolare lo sviluppo economico e sociale nelle comunità rurali e nelle regioni agricole, creando nuove

opportunità di lavoro, valorizzando i sottoprodotti agricoli e rafforzando l'economia locale[16].

Tuttavia, nonostante il suo potenziale, la bioraffinazione affronta ancora diverse sfide, tra cui la necessità di sviluppare tecnologie più efficienti ed economiche, la creazione di mercati stabili per i bioprodotto e la promozione di politiche pubbliche e incentivi che favoriscano la transizione verso un'economia basata sulla biomassa.

Il trattamento dei rifiuti organici non è una pratica nata negli ultimi decenni, già da tempo essi vengono lavorati attraverso il compostaggio per ottenere compost, un ammendante del terreno che permette di migliorarne le proprietà. Il compostaggio è un processo che avviene in presenza di ossigeno, pertanto, necessita di aerazione forzata e questo può comportare un'elevata spesa energetica. Inoltre, il compost non è un prodotto competitivo sul mercato in quanto ha un basso valore economico, la produzione è elevata e la qualità del prodotto può essere compromessa dalla presenza di contaminanti (metalli o plastiche), e questo rende gli utenti finali restii all'acquisto [17]. I limiti di questa tipologia di fine vita ha fatto sì che fosse necessario sviluppare nuove metodologie di valorizzazione dei rifiuti organici.

Negli ultimi decenni si è molto diffuso l'impiego del processo di digestione anaerobica, una tipologia di trattamento dei rifiuti che permette di valorizzarli producendo biogas, nel quale è presente metano, che può essere utilizzato come biocombustibile per la produzione di energia. Il digestato prodotto dalla digestione anaerobica può poi essere usato direttamente come ammendante o trattato per produrre compost.

Entrambi i processi sopracitati prevedevano, fino a poco tempo fa, un'unica linea di trasformazione, ottenendo come prodotti finali compost o biogas, entrambi non particolarmente competitivi sul mercato. La corsa all'innovazione, l'implementazione dell'economia circolare come modello industriale e la necessità di trovare nuove fonti di estrazione di prodotti di valore ha fatto sì che si estendesse il concetto di bioraffinazione anche ai rifiuti, e non esclusivamente a colture selezionate. L'implementazione di tali processi permette di dare nuova vita al rifiuto, non più considerato come un componente di cui disfarsi, ma come una fonte di materie prime seconde, rinnovabile e facilmente disponibile. In questo contesto la digestione anaerobica diventa l'ultimo anello della catena.

1.3 Struvite: un promettente biofertilizzante

La struvite è un composto chimico solitamente associato alla precipitazione di fosfati e ammoniaca. In particolari condizioni, molecole magnesio, ammonio e fosfato si aggregano formando cristalli, che possono precipitare e depositarsi nelle tubazioni e negli impianti di trattamento delle acque reflue urbane e industriali, nonché in sistemi di trattamento delle acque potabili. La formazione di struvite può essere problematica perché può accumularsi e ostruire le tubazioni, riducendo l'efficienza degli impianti di trattamento delle acque e causando costosi problemi di manutenzione. Tuttavia, la struvite non è completamente indesiderata, la sua composizione è infatti particolarmente adatta per l'impiego come fertilizzante essendo essa composta da nutrienti largamente impiegati in agricoltura. Il suo impiego consente di ridurre la dipendenza dai fertilizzanti chimici e di utilizzare i nutrienti

recuperati da processi di vario genere in modo sostenibile. Pertanto, la gestione della struvite coinvolge sia la prevenzione della sua formazione indesiderata negli impianti di trattamento delle acque, sia il suo recupero e utilizzo come risorsa fertilizzante.

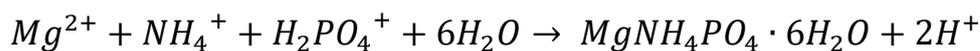
Ogni anno nell'Unione Europea vengono prodotti 180 Mt di digestato proveniente da bioreattori anaerobici, il quale contiene elevate quantità di azoto (3 kg/m^3) e fosforo (1 kg/m^3) [18]. Il recupero di questi elementi sta acquisendo sempre più interesse scientifico. Diversi studi si sono concentrati sulla precipitazione di struvite da acque reflue di diversa natura, percolato di discarica, letami e fanghi anaerobici, valutando diverse combinazioni dei parametri critici e differenti additivi [19], [20], [21], [22], [23].

La formazione della struvite è il risultato dell'interazione tra il magnesio (Mg^{2+}), l'ammonio (NH_4^+), e il fosfato (PO_4^{3-}) con sei molecole d'acqua ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Il suo peso specifico è $1,711 \text{ g/cm}^3$ con un peso molecolare di $245,41 \text{ g/mol}$; è caratterizzata da una struttura ortorombica complessa e si presenta come polvere cristallina bianca, ma può assumere anche altre forme fisiche come cristalli singoli, scaglie o masse gelatinose, con dimensioni dei cristalli che variano da $15 \mu\text{m}$ a $3,5 \text{ mm}$, in base alle condizioni di produzione [24], [25].

La solubilità della struvite è significativamente variabile in base alle condizioni a cui è sottoposta, infatti ha una scarsa solubilità in condizioni alcaline, mentre diventa altamente solubile in condizioni acide ($0,033 \text{ g/100 ml}$ a 25°C in $0,001 \text{ N HCl}$ e $0,178 \text{ g/100 ml}$ a 25°C in $0,01 \text{ N HCl}$) [19]. La sua solubilità in acqua a 25°C è di $0,018 \text{ g/100 ml}$ con una costante di solubilità di $10^{-13,26}$. Pertanto, la struvite viene considerata un fertilizzante a lento rilascio; queste caratteristiche, assieme alla sua

capacità di innalzare il pH del terreno, la rendono particolarmente utile in terreni acidi. Infatti, la sua lenta dissoluzione favorisce una somministrazione graduale dei nutrienti, riducendo le perdite, migliorando l'efficienza di utilizzo del fosforo e contenendo fenomeni come la lisciviazione e la volatilizzazione, migliorando l'efficienza del fertilizzante. L'aumento della solubilità in condizioni acide favorisce il rilascio di nutrienti in modo sincrono con le esigenze delle colture [26].

La precipitazione della struvite avviene in una concentrazione equimolare di Mg^{2+} , NH_4^+ e PO_4^{3-} in condizioni leggermente alcaline. La reazione di formazione dei cristalli di struvite [27] è la seguente:



Al fine di raggiungere l'equimolarità è spesso necessario additivare fonti di magnesio, la più comune è il cloruro di magnesio ($MgCl_2$), ampiamente disponibile e solubile in acqua, il che lo rende una scelta frequente per la precipitazione della struvite [28].

I principali parametri che influenzano la produzione di struvite sono il rapporto molare tra ammonio, fosfato e magnesio, il pH e il tipo di reattore impiegato.

La cristallizzazione della struvite si verifica in un intervallo di pH da 7,0 a 11,5, con un pH ottimale tra 8,5 e 9,5 [29]. Un pH più alto accelera la crescita dei cristalli, migliora l'efficienza di rimozione dei nutrienti e influisce sulla purezza dei cristalli, riducendone la dimensione media e modificandone la distribuzione. Tuttavia, il pH influisce anche sulla conversione dell'ammonio (NH_4^+) in ammoniaca (NH_3). A pH superiori a 10,5, la concentrazione di NH_4^+ diminuisce poiché l'azoto si volatilizza sotto forma di NH_3 .

Di particolare interesse è il recupero del fosforo, esso, infatti è uno dei nutrienti principali per le colture. Attualmente, il fosforo utilizzabile viene estratto dalle rocce fosfatiche, con la Cina che detiene il 42% delle riserve mondiali [30]. Tuttavia, le riserve globali potrebbero esaurirsi nei prossimi 90-300 anni a causa del crescente tasso di estrazione per soddisfare la domanda agricola. A tal proposito, il suo recupero da fonti di scarto acquisisce significativo interesse scientifico nella produzione di biofertilizzanti. In questo contesto hanno particolare rilevanza i sottoprodotti della filiera ittica, i quali possono rappresentare un'interessante fonte di fosforo, magnesio e azoto.

In generale, l'impiego della struvite come fertilizzante contribuisce a ridurre l'inquinamento delle acque superficiali causato dall'eccesso di nutrienti. Il suo recupero dai flussi di rifiuti, come le acque reflue, supporta l'economia circolare, riducendo la dipendenza dalle riserve di fosfato di roccia non rinnovabili. Inoltre, la sua caratteristica di fertilizzante a lento rilascio la rende più adatta allo spargimento sul suolo, rispetto ad esempio al digestato proveniente da digestione anaerobica, che pur essendo particolarmente ricco di nutrienti prontamente disponibili, va incontro a fenomeni di lisciviazione e eutrofizzazione dei terreni.

1.4 Ruolo dei solventi nei processi di bioraffinazione

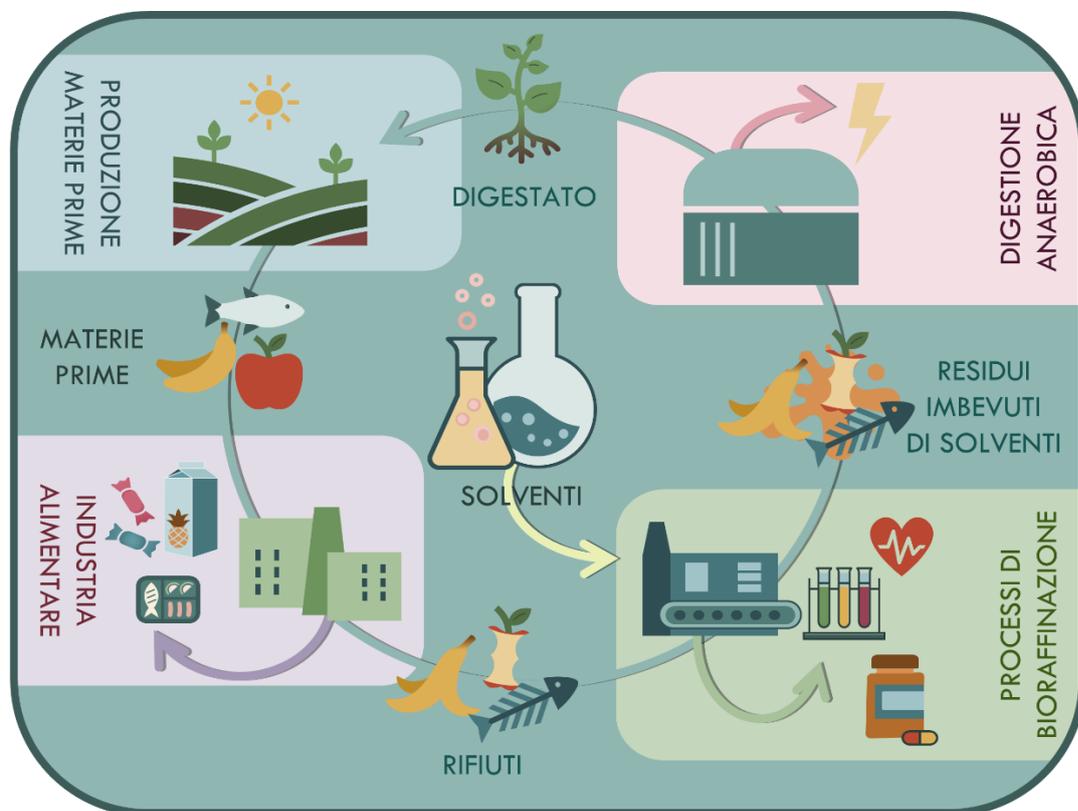


Figura 3 Ciclo di bioraffinazione con impiego di solventi

Oggi, la maggior parte dei processi industriali utilizza solventi per estrarre composti ad alto valore, consumando grandi quantità di solvente che spesso vengono assorbite dagli scarti e dispersi. Sin dagli albori dell'industria chimica, le materie prime utilizzate sono state principalmente di origine fossile, molto reattive ma anche tossiche e pericolose per l'ambiente e la salute umana. Sebbene l'uso di solventi derivati dal petrolio sia ancora prevalente, molti processi estrattivi si sono orientati verso l'impiego di solventi di origine biologica, come l'etanolo e il d-Limonene [31], poiché i 12 principi della chimica verde, elencati per la prima volta da Paul T. Anastas e John C. Warner nel libro

“Green Chemistry: Theory and Practice”, incoraggiano le industrie farmaceutiche e nutraceutiche a seguire politiche più sostenibili [32].

La chimica verde, inserendosi nel contesto della bioraffinazione, offre una risposta fondamentale alle sfide ambientali e sociali dell'attuale industria chimica. Essa si basa sulla progettazione di processi chimici sostenibili, sull'ottimizzazione delle risorse, sul recupero e riciclo dei reagenti, e sull'adozione di materiali più sicuri ed efficienti [33].

Il presente lavoro di tesi ha previsto, in fase preliminare, uno studio sistematico dell'effetto dei solventi sul processo di digestione anaerobica (Figura 3). I solventi testati sono stati scelti in base al loro impiego nell'industria chimica; è stato testato un solvente derivante dal petrolio (n-esano), nonostante sia noto per la sua tossicità e pericolosità per la salute umana e l'ambiente [34], [35], poiché è tutt'oggi largamente utilizzato in diversi processi estrattivi. Tuttavia, ci sono crescenti sforzi per sostituire l'esano con alternative più sicure ed ecologiche [36]. Data la sua elevata pericolosità, negli ultimi anni, si stanno sviluppando sempre più alternative, come ad esempio il 2-metilossolano (2-Meox), un solvente prodotto dall'acido levulinico che deriva dalle biomasse [37]. Le caratteristiche di questo solvente lo rendono particolarmente interessante per i processi estrattivi; il suo punto di ebollizione, ad esempio, è sufficientemente basso da favorirne la rimozione dai prodotti finali ($\approx 80^{\circ}\text{C}$) [38]. Test di estrazione dell'olio di soia hanno dimostrato una capacità di solubilizzazione simile all'n-esano ed, inoltre, una maggiore solubilizzazione di composti più polari come fosfolipidi o antiossidanti [39].

È stato inoltre preso in esame il cirene (diidrolevo-glucosenone), un composto organico fortemente polare derivato da biomassa [40],

attualmente impiegato principalmente nella sintesi chimica e nella produzione di materiali, ma che sta dando risultati promettenti nei processi estrattivi [41], [42]. Questo composto è non tossico, biodegradabile e rinnovabile, e grazie alle sue peculiari caratteristiche è considerato un buon sostituto di composti organici polari pericolosi per la salute e l'ambiente. Il cirene è un solvente ad alto punto di ebollizione (227 °C), il che potrebbe rappresentare una sfida durante la fase di separazione del solvente nell'estrazione; tuttavia, la sua alta miscibilità in acqua favorisce la rimozione tramite un'estrazione liquido-liquido, semplificando il recupero e il riciclo del solvente [43], [44].

Uno dei solventi più comuni presi in esame è l'etanolo, che ha un ampio spettro di applicazioni. Attualmente il suo principale impiego è come biocombustibile [45], ma è anche largamente utilizzato nel settore chimico e farmaceutico. L'etanolo viene estratto da vari tipi di biomassa tramite fermentazione, e la produzione di etanolo di "seconda generazione" (che utilizza materiali di scarto non alimentari come residui agricoli o lignocellulosici) sta guadagnando terreno [46]. Infine, il d-Limonene è un prodotto della lavorazione degli agrumi impiegato nella produzione di saponi, profumi e disinfettanti. Inoltre, è stato utilizzato come solvente verde in varie applicazioni, grazie alla sua origine naturale e alla sua bassa pericolosità [47]. Anche se il suo punto di ebollizione rende i processi estrattivi più energivori [48], le sue proprietà antibatteriche possono rendere problematico l'impiego di substrati imbevuti di d-Limonene nei processi di digestione anaerobica. I principali studi legati alla capacità inibente del d-Limonene riguardano la bioraffinazione delle bucce di arancia, dove inibisce sia i batteri metanigeni che quelli idrolitico-acidogenici; tuttavia, la concentrazione limite tollerata dai batteri è ancora controversa [49], [50]. Diversi

pretrattamenti come aerazione, trattamenti biologici ed esplosione di vapore [51] sono stati esaminati per ridurre o eliminare il d-Limonene dalle bucce di arancia; tuttavia, ogni pretrattamento comporta dei costi. Pertanto, è importante valutare la resa economica ottenuta tramite l'incremento della produzione di metano e la spesa necessaria al pretrattamento.

1.4.1 N-esano

Il n-esano è un alcano lineare con la formula chimica $C_{10}H_{16}$. È un liquido incolore, volatile e infiammabile con un lieve odore simile a quello della benzina. È insolubile in acqua ma solubile in solventi organici come etanolo, etere etilico e acetone. È un componente del petrolio grezzo e viene sintetizzato principalmente attraverso l'impiego della distillazione frazionata, che si basa sulla separazione dei suoi componenti in base alla loro massa molare e al loro punto di ebollizione. Le particolari caratteristiche chimico-fisiche conferiscono al prodotto importantissime qualità solventi e diluenti in grado di solubilizzare diversi composti organici e che ne consentono l'applicazione con elevate prestazioni nei processi di estrazione degli oli vegetali.

Tabella 1 Proprietà generali di n-esano [52]

n-esano	
Formula molecolare	C ₆ H ₁₄
Numero CAS	110-54-3
Colore	Incolore
Odore	Simile agli idrocarburi
Origine	Petrolio
Polarità	non-polare
Peso molecolare (g/mol)	86,18
Punto di ebollizione (°C; 1013 hPa)	69,35
Punto di fusione (°C; 1013 hPa)	-95,35
Pressione di vapore (hPa, 20 °C)	17
Densità (g/cm ³ ; 20°C)	0,661
Viscosità (mPa*s; 20 °C)	0,31
Solubilità (mg/L; 25 °C)	9,5

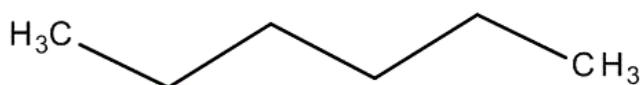


Figura 4 Formula strutturale di n-esano

Il n-esano è ampiamente utilizzato come solvente in diversi processi industriali. È particolarmente apprezzato per la sua capacità di sciogliere oli e grassi, rendendolo utile nell'estrazione di oli vegetali da semi oleosi come la soia, il mais e la colza [53]. È anche impiegato nella produzione di adesivi, sigillanti, vernici e inchiostri. Grazie alle sue proprietà solventi; l'n-esano è utilizzato per la pulizia e lo sgrassaggio di componenti meccanici ed elettronici. È efficace nella rimozione di oli, grassi e altre impurità da superfici metalliche e plastiche. Nell'industria chimica, è utilizzato come intermedio nella sintesi di vari composti chimici. È impiegato nella produzione di polimeri, elastomeri e altri

materiali sintetici. Inoltre, è utilizzato come standard di riferimento in cromatografia gassosa e in altri metodi analitici.

Uno degli impieghi principali dell'n-esano è nell'estrazione di oli vegetali da semi oleosi. Il processo di estrazione con solvente utilizza l'n-esano per sciogliere l'olio contenuto nei semi, che viene poi separato dal solvente tramite distillazione. Questo metodo è preferito per la sua efficienza e capacità di estrarre elevate quantità di olio.

Nonostante sia tutt'ora largamente impiegato, la sua tossicità per l'uomo e per l'ambiente è universalmente riconosciuta. Esso rientra nell'elenco delle sostanze chimiche classificate come CMR ("Carcinogenic, Mutagenic, Reprotoxic" – Cancerogene, Mutagene e Tossiche per la riproduzione). Questa sostanza può essere nociva se ingerita e penetra nelle vie respiratorie, è tossica per la vita acquatica con effetti di lunga durata, è sospettata di nuocere alla fertilità e può causare danni agli organi attraverso esposizione prolungata o ripetuta, causa irritazione della pelle e può indurre sonnolenza o vertigini. L'esposizione ad alte concentrazioni può causare effetti neurotossici, inclusi danni ai nervi periferici, noti come neuropatia periferica.

Pertanto, sono in corso ricerche per trovare alternative più sicure e sostenibili. Solventi come il 2-metiltetraidrofurano (2-Meox) e il d-Limonene stanno emergendo come potenziali sostituti. Questi solventi offrono proprietà simili all'n-esano ma con un profilo di sicurezza e impatto ambientale più favorevole [39].

1.4.2 d-Limonene

Il d-Limonene è un monoterpene, incolore e liquido a temperatura ambiente, la sua formula empirica è C₁₀H₁₆; esso ha una solubilità molto bassa (0,101 mmol/L) in quanto è una molecola idrofoba, è estremamente volatile (37,87 kJ/mol), caratteristica comune ad altri oli essenziali [54]. Possiede due isomeri ottici: d-Limonene e l-Limonene, il primo ha una fragranza tipica di arancia, il secondo è caratterizzato da un odore di trementina, il miscuglio racemico prende il nome di dipene [50].

Tabella 2 Proprietà generali del d-Limonene [52]

d-Limonene	
Formula molecolare	C ₁₀ H ₁₆
Numero CAS	5989-27-5
Colore	Incolore
Odore	Caratteristico, agrumato
Origine	Biologica
Polarità	non-polare
Peso molecolare (g/mol)	136,24
Punto di ebollizione (°C; 1013 hPa)	176,0
Punto di fusione (°C; 1013 hPa)	-74,0
Pressione di vapore (hPa, 20 °C)	2,1
Densità (g/cm ³ ; 20°C)	0,844
Viscosità (mPa*s; 20 °C)	0,846
Solubilità (mg/L; 25 °C)	5,69

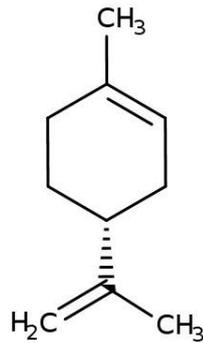


Figura 5 Formula strutturale di d-Limonene

Il d-Limonene è utilizzato come bio-solvente in molte applicazioni industriali. La sua capacità di sciogliere grassi e resine lo rende ideale per l'uso in prodotti per la pulizia, sverniciatori e solventi per la rimozione di grassi e oli. Inoltre, è impiegato nei processi di estrazione di oli essenziali e composti bioattivi da piante e materiali naturali. Esso è un intermedio chimico per la sintesi di altri terpenoidi e composti aromatici che hanno applicazioni in fragranze, aromi e prodotti farmaceutici. Nell'industria cosmetica, il d-Limonene è utilizzato per le sue proprietà aromatiche e solventi. Si trova in profumi, lozioni, shampoo e altri prodotti per la cura personale.

Inoltre, Il d-Limonene è utilizzato come principio attivo in alcuni insetticidi e repellenti naturali. È efficace contro una vasta gamma di insetti, inclusi formiche, pulci e scarafaggi, e rappresenta un'alternativa meno tossica ai pesticidi chimici tradizionali. La sua origine naturale lo rende un'alternativa ecologica ai solventi derivati dal petrolio.

Il d-Limonene non possiede gruppi funzionali che lo rendano suscettibile all'idrolisi; il suo anello cicloesenico e il gruppo etilenico sono chimicamente resistenti a questo processo. La degradazione biologica del d-Limonene è stata osservata in alcune specie di

microrganismi. I test standard di degradazione aerobica indicano che il d-Limonene viene rimosso in ambiente acquoso fino al 94% in 14 giorni [55]. Tuttavia, è possibile che parte di questa riduzione sia da attribuire all'evaporazione del composto durante il processo.

Il d-Limonene è senza dubbio un prodotto di valore, ma comporta una serie di svantaggi nel processo di digestione anaerobica; esso, infatti, è un composto citotossico, inibente dei batteri idrolitici, fermentativi e metanigeni [56]. Durante il processo di digestione anaerobica si è osservato che il d-Limonene viene parzialmente rimosso; infatti, la concentrazione finale è molto inferiore rispetto a quella iniziale; tale fenomeno è stato spiegato mediante due possibili eventi: il d-Limonene potrebbe essere trasformato in p-cimene o volatilizzato a causa delle temperature di lavoro del reattore. È stato infatti evidenziato che in ambiente anaerobico, nonostante il d-Limonene venga consumato dopo cinque giorni dall'avvio dell'esperimento, l'effetto di inibizione sui batteri si protrae fino al decimo giorno; una plausibile spiegazione di tale fenomeno risiede nel fatto che anche i prodotti di degradazione del d-Limonene possono inibire il processo di digestione anaerobica [57]. Il crescente interesse dell'effetto di questo solvente sul processo di digestione anaerobica è per lo più legato all'impiego dei rifiuti agroindustriali come fonte di materia organica.

Le bucce d'arancia contengono oltre 5 kg di olio per 1000 kg di biomassa, di cui il 90% è d-Limonene [58]. Nonostante la vasta letteratura sulla digestione anaerobica delle bucce di agrumi, non esiste una risposta univoca sull'impatto reale del d-Limonene sulle prestazioni del processo e sull'opportunità di eseguire pretrattamenti per la sua rimozione. Le soglie di inibizione del d-Limonene nel liquido di miscelazione dei digestori anaerobici alimentati con bucce di arancia variano da 24 mg/L

[56] a 2000 mg/L [57]. La strategia per superare gli effetti del d-Limonene include la co-digestione con altri substrati o la riduzione della sua concentrazione tramite pretrattamenti come trattamenti fungini, estrazione di vapore o combinazione di esplosione di vapore e condensazione.

L'effetto inibente sul processo di digestione anaerobica è legato all'interazione dei terpeni e dei terpenoidi con la membrana cellulare. Gli idrocarburi ciclici devono prima dissolversi nel mezzo acquoso che circonda i microrganismi. Nonostante la loro bassa solubilità in acqua, la presenza di batteri può aumentare la velocità di dissoluzione attraverso la produzione di composti tensioattivi che emulsionano l'olio essenziale. Successivamente, il composto attraversa l'involucro cellulare, che varia tra i diversi tipi di microrganismi. I batteri Gram-negativi, ad esempio, possono tollerare concentrazioni più elevate di composti lipofilici grazie alla loro parete cellulare esterna idrofila. Tuttavia, questi composti possono ancora attraversare la parete cellulare tramite diffusione. Una volta che l'idrocarburo raggiunge la membrana citoplasmatica, la sua ripartizione determina l'accumulo nella membrana, modificandone la struttura e la permeabilità. Gli idrocarburi ciclici tendono ad accumularsi nella parte interna del doppio strato lipidico, alterando la conformazione delle proteine incorporate e aumentando la fluidità della membrana. Questo può portare alla fuoriuscita del contenuto cellulare e, in caso di perdita massiccia, alla morte cellulare. Oltre a questi effetti fisici, i componenti degli oli essenziali possono anche interagire direttamente con le proteine della membrana, alterando le loro funzioni [50].

Una tecnica efficace per ridurre l'inibizione dei batteri anaerobici da parte del d-Limonene a valle dei processi estrattivi è senza dubbio

recuperare e riutilizzare il d-Limonene, in modo tale da ridurre la concentrazione nel substrato. Secondo Gutierrez et al. [51] la rimozione del 70% di d-Limonene dalle bucce d'arancia può comportare un aumento della produzione di metano di quasi 30%.

1.4.3 Etanolo

L'etanolo, noto anche come alcool etilico, è un composto chimico con la formula chimica C_2H_5OH . È un alcol semplice con un gruppo etile (C_2H_5) legato a un gruppo idrossile ($-OH$). Si presenta come un liquido incolore, volatile, e infiammabile con un caratteristico odore alcolico. È miscibile con acqua e molti solventi organici, rendendolo un versatile solvente nella chimica e in diverse applicazioni industriali.

L'etanolo è ampiamente utilizzato come solvente nei laboratori chimici e nell'industria. È efficace nel dissolvere una vasta gamma di composti chimici, inclusi resine, coloranti, farmaci, e oli essenziali [59]. Esso è anche utilizzato per l'estrazione di composti bioattivi, come antiossidanti e saccariti, in processi di bioraffinazione, ad esempio, dei rifiuti di grano saraceno [60]. La sua miscibilità con acqua e altri solventi organici lo rende ideale per molteplici applicazioni. Esso è utilizzato come intermedio nella sintesi di numerosi composti chimici. Viene impiegato nella produzione di etere etilico, acetaldeide, acido acetico e numerosi esteri e derivati etilici. È anche utilizzato nella produzione di plastificanti, solventi per vernici, e inchiostri. Viene principalmente impiegato come combustibile [45] e additivo per carburanti. Il bioetanolo è prodotto dalla fermentazione di biomassa e può essere miscelato con benzina per ridurre le emissioni di gas serra. La miscela

più comune è l'E85, che contiene l'85% di etanolo e il 15% di benzina [61].

Tabella 3 Proprietà generali dell'etanolo [52]

Etanolo	
Formula molecolare	C ₂ H ₆ O
Numero CAS	64-17-5
Colore	Incolore
Odore	Alcolico
Origine	Biologica
Polarità	Polare
Peso molecolare (g/mol)	46,07
Punto di ebollizione (°C; 1013 hPa)	78,0
Punto di fusione (°C; 1013 hPa)	-114,0
Pressione di vapore (hPa, 20 °C)	59
Densità (g/cm ³ ; 20°C)	0,789
Viscosità (mPa*s; 20 °C)	1,2
Solubilità (mg/L; 25 °C)	1000

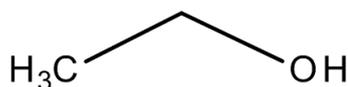


Figura 6 Formula strutturale dell'etanolo

Grazie alle sue proprietà antimicrobiche, l'etanolo è utilizzato come disinfettante e antisettico. È efficace contro una vasta gamma di batteri, virus e funghi, ed è comunemente impiegato in soluzioni per la pulizia delle mani e disinfettanti per superfici. Esso trova anche largo impegno nell'industria farmaceutica, dove è utilizzato come solvente per estrarre principi attivi dalle piante e per la produzione di tinture, soluzioni orali e iniettabili. È anche impiegato nella formulazione di molti farmaci e prodotti medicamentosi.

L'etanolo di origine biologica è attualmente il più sintetizzato tra tutti i biosolventi e viene prodotto attraverso la trasformazione biologica degli zuccheri. Questi processi utilizzano materie prime commestibili (canna da zucchero e mais) o non commestibili (cellulosa). Le ricerche attuali si concentrano sulla produzione di etanolo di seconda generazione, che utilizza materie prime lignocellulosiche non alimentari come residui agricoli, paglia, e legno. Questo approccio mira a migliorare la sostenibilità della produzione di etanolo riducendo la competizione con le colture alimentari [62].

L'impiego di etanolo nella digestione anaerobica ha mostrato effetti significativi sull'efficienza del processo. Studi di letteratura hanno evidenziato che l'etanolo può alleviare efficacemente l'inibizione dovuta all'acidificazione, ridurre significativamente la durata della fase di latenza e stimolare notevolmente la crescita di metanigeni. Ad esempio, Wu et al. [63] hanno riportato che l'uso di etanolo ha portato a rese di metano superiori del 50% rispetto al gruppo di controllo. Inoltre, l'etanolo è in grado di stimolare le comunità microbiche che favoriscono lo scambio diretto interspecie di elettroni (Direct Interspecies Electron Transfer, DIET) [64], [65]. Un pretrattamento di fanghi attivi tramite fermentazione biologica con etanolo ha mostrato un incremento nella produzione di metano, con il fango pretrattato che presentava un'elevata conduttanza, indicativa della partecipazione del metabolismo sintrofico DIET [66].

Il fenomeno del DIET è un meccanismo emergente nella digestione anaerobica che facilita la cooperazione tra microrganismi per la decomposizione della materia organica e la produzione di metano. Tradizionalmente, la digestione anaerobica avviene attraverso il trasferimento interspecie di idrogeno (H_2) o formiato come vettori

intermedi, che consentono agli organismi acetogenici di produrre questi composti, poi utilizzati dai metanigeni per produrre metano. Nel DIET, invece, gli elettroni vengono trasferiti direttamente tra i microrganismi senza l'intermediazione di composti come l'idrogeno. Questo processo può avvenire attraverso il contatto diretto tra le cellule mediante strutture conduttive chiamate pili elettricamente conduttivi o nanofili, oppure tramite materiali conduttivi presenti nell'ambiente, come particelle di magnetite o carbone attivo. Questo tipo di scambio elettronico diretto può essere più efficiente rispetto ai tradizionali meccanismi mediati da idrogeno, poiché elimina la necessità di generare e consumare questi intermedi, riducendo le perdite di energia e migliorando la cinetica del processo di metanogenesi [67].

1.4.4 2-Metiltetraidrofurano

Il tetraidro-2-metilfurano, noto anche come 2-metiltetraidrofurano (2-MeOx), è un composto organico eterociclico appartenente alla famiglia dei furanici. La sua formula chimica è $C_5H_{10}O$ e si presenta come un liquido incolore con un odore leggermente etereo.

La sua struttura è caratterizzata da un anello di tetraidrofurano con un gruppo metilico ($-CH_3$) sostituito in posizione 2. È un solvente bio-based utilizzato principalmente per l'estrazione di prodotti naturali e dei loro componenti. A livello industriale, viene prodotto a partire da sottoprodotti agricoli come stoppie di mais, bagassa di canna da zucchero e paglia di riso.

Tabella 4 Proprietà generali del 2-MeOx [52]

Tetraidro-2-metilfurano	
Formula molecolare	C ₅ H ₁₀ O
Numero CAS	96-47-9
Colore	Incolore
Odore	Etereo
Origine	biologica
Polarità	Medio-polare
Peso molecolare (g/mol)	86,13
Punto di ebollizione (°C; 1013 hPa)	78,0
Punto di fusione (°C; 1013 hPa)	-136,0
Pressione di vapore (hPa, 20 °C)	136
Densità (g/cm ³ ; 20°C)	0,855
Viscosità (mPa*s; 20 °C)	0,576
Solubilità (mg/L; 25 °C)	140

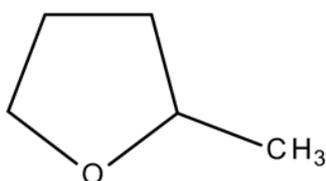


Figura 7 Formula strutturale del 2-Meox

Il 2-Meox possiede proprietà che lo rendono un eccellente bio-solvente per estrazioni. Il suo punto di ebollizione è sufficientemente elevato da permettere una buona temperatura di estrazione, ma abbastanza basso da poter essere facilmente rimosso dai prodotti residui. Inoltre, la sua densità e viscosità sono simili a quelle dell'esano, noto per la sua efficacia nelle estrazioni [38].

Diversi studi hanno dimostrato che i solventi green a base biologica, come il 2-Meox, possono rappresentare valide alternative all'esano per

l'estrazione di sostanze aromatiche come il d-Limonene dai residui di buccia d'arancia. Questo permette di sviluppare bioraffinerie sostenibili per la valorizzazione dei rifiuti di agrumi.

Recentemente, la direttiva (UE) 2023/175 ha riconosciuto che l'Autorità europea per la sicurezza alimentare ha valutato la sicurezza dell'uso del 2-Meox come solvente da estrazione negli alimenti. È stato stabilito che è appropriato autorizzare l'uso del 2-Meox per l'estrazione nella produzione e nel frazionamento di grassi, oli e burro di cacao, nonché nella preparazione di prodotti a base di proteine sgrassate, farine sgrassate, germi di cereali sgrassati e aromatizzanti naturali. In passato, la direttiva 2009/32/CE indicava solo l'esano come solvente da estrazione per questi trattamenti specifici.

1.4.5 Cirene

Il diidrolevoglucosenone, noto commercialmente come cirene, è un solvente ecologico, biodegradabile e rinnovabile, derivato da fonti biologiche come i carboidrati. Questo composto non è mutageno e non presenta tossicità riproduttiva. La sua struttura chimica distintiva include un anello ossiranico unito a un gruppo carbonilico, caratteristiche che gli conferiscono proprietà uniche, facendone una valida alternativa ai solventi tradizionali di origine petrolchimica.

Viene prodotto attraverso un processo a due fasi: inizialmente si ottiene il levoglucosenone (LGO) da materie prime cellulosiche come il mirtillo nero, la pannocchia di mais, il legno di pioppo e la bagassa di canna da zucchero. Successivamente, l'idrogenazione del LGO porta alla formazione del Cirene [41].

Tabella 5 Proprietà generali del cirene [52]

Diidrolevogluosenone	
Molecular formula	C ₆ H ₈ O ₃
Number CAS	53716-82-8
Color	colorless
Odor	-
Origin	bio-based
Polarity	polar
Molecular weight (g/mol)	128,13
Boiling point (°C; 1013 hPa)	227,0
Fusion point (°C; 1013 hPa)	-20,0
Vapor pressure (hPa, 20 °C)	28
Density (g/cm ³ ; 20°C)	1,25
Viscosity (mPa*s; 20 °C)	13,81
Solubility (mg/L; 25 °C)	560

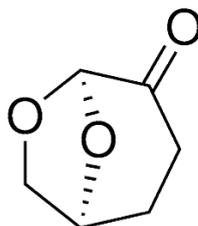


Figura 8 Formula strutturale del cirene

Grazie al suo profilo ecologico e alle sue proprietà chimico-fisiche, il cirene è una valida alternativa ai solventi organici tradizionali, come dimetilsolfossido (DMSO), dimetilformammide (DMF) e n-metil-2-pirrolidone (NMP), quest'ultimo soggetto a restrizioni nell'Unione Europea per motivi di sicurezza [68]. Il cirene è un solvente altobollente (227 °C), ciò potrebbe rappresentare una problematica durante la fase di separazione del solvente nell'estrazione; tuttavia, la sua alta miscibilità in acqua facilita la rimozione del solvente dalle miscele di

reazione tramite estrazione liquido-liquido e permettendone il riutilizzo dopo la distillazione dell'acqua. Il suo alto punto di ebollizione consente inoltre di eseguire reazioni su un ampio intervallo di temperature [43].

1.5 I colori del futuro

Nel panorama globale attuale, la sostenibilità ambientale è diventata una priorità imprescindibile per il progresso sociale ed economico. In questo contesto si distinguono due pilastri fondamentali: la *green chemistry* e la *blue economy*. La chimica verde si dedica allo sviluppo di processi chimici che minimizzano l'uso e la generazione di sostanze pericolose, promuovendo l'uso di materie prime rinnovabili e tecnologie a basso impatto ambientale. Dall'altra parte, la *blue economy* si concentra sull'uso sostenibile delle risorse marine, promuovendo innovazioni che valorizzano gli ecosistemi oceanici e migliorano la qualità della vita delle comunità costiere. Entrambe le discipline sono essenziali per disegnare un futuro dove l'industria e l'ambiente coesistano in armonia, tinto dei toni di sostenibilità e innovazione.

1.5.1 Green Chemistry

L'economia circolare spinge intensamente la ricerca verso processi di lavorazione sempre più sostenibili e a basso impatto ambientale. Questo ha avuto un forte impatto sull'industria chimica, che si è trovata di fronte alla opportunità di un cambiamento verso approcci più sostenibili. La necessità di sviluppare una chimica più sostenibile è emersa negli anni '90, in risposta a una crescente consapevolezza ambientale e alla necessità di ridurre l'impatto negativo delle attività chimiche sull'ambiente e sulla salute umana anche in funzione dei costi del

risanamento ambientale. La chimica tradizionale spesso comporta l'uso di sostanze tossiche, processi inefficienti e la generazione di grandi quantità di rifiuti pericolosi. Di fronte a queste sfide, scienziati e ricercatori hanno iniziato a esplorare modi per minimizzare l'impatto ambientale della chimica, portando alla nascita della chimica verde.

Conosciuta anche come chimica sostenibile, la chimica verde rappresenta un campo di ricerca e sviluppo in costante crescita che mira a progettare prodotti e processi chimici per ridurre o eliminare l'uso e la generazione di sostanze pericolose. Questo approccio è basato su dodici principi fondamentali, elaborati da Paul Anastas e John Warner nel 1998 [69], che offrono un quadro per rendere la chimica più sicura, efficiente e sostenibile.

I dodici principi della chimica verde sono:



Prevenzione

È meglio prevenire i rifiuti piuttosto che trattarli o pulirli dopo che sono stati creati.



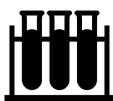
Economia dell'atomo

Progettare metodi di sintesi per massimizzare l'incorporazione di tutti i materiali utilizzati nel processo nel prodotto finale.



Sintesi chimiche meno pericolose

Progettare metodi di sintesi per utilizzare e generare sostanze che possiedono poca o nessuna tossicità per la salute umana e l'ambiente.



Prodotti chimici più sicuri

I prodotti chimici dovrebbero essere progettati per preservare l'efficacia riducendo al contempo la tossicità.



Solventi e ausiliari più sicuri

L'uso di sostanze ausiliarie (ad esempio solventi, agenti di separazione) dovrebbe essere reso non necessario ove possibile e, quando utilizzato, innocuo.



Efficienza energetica

I requisiti energetici dei processi chimici dovrebbero essere riconosciuti per i loro impatti ambientali ed economici e dovrebbero essere ridotti al minimo.



Risorse rinnovabili

Le materie prime dovrebbero essere rinnovabili piuttosto che esauribili ogniqualvolta ciò sia tecnicamente ed economicamente fattibile.



Riduzione dei derivati

Se possibile, i derivati chimici dovrebbero essere ridotti al minimo o evitati, poiché richiedono reagenti aggiuntivi e possono generare rifiuti.



Catalisi

I reagenti catalitici (il più selettivi possibile) sono superiori ai reagenti stechiometrici.



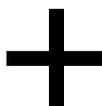
Degradabilità

I prodotti chimici devono essere progettati in modo che al termine della loro funzione si decompongano in prodotti di degradazione innocui e non persistano nell'ambiente.



Analisi in tempo reale

Le metodologie analitiche devono essere ulteriormente sviluppate per consentire il monitoraggio e il controllo in tempo reale e durante il processo prima della formazione di sostanze pericolose.



Chimica intrinsecamente più sicura

Le sostanze e la forma di una sostanza utilizzata in un processo chimico devono essere scelte per ridurre al minimo il potenziale di incidenti chimici, tra cui rilasci, esplosioni e incendi.

Il primo principio della chimica verde sostiene che sia meglio prevenire la produzione di rifiuti piuttosto che trattarli e smaltirli una volta prodotti. Il 70% di rifiuti pericolosi prodotti provengono dall'industria chimica; perciò, tale approccio ha un doppio vantaggio, da un lato si riducono i costi in termini economici, di impatto ambientale e sociale dovuti alla produzione di rifiuti; dall'altro un minor impiego di risorse all'origine comporta un investimento minore. Molti sottoprodotti tossici derivano da specifiche reazioni di sintesi come alogenazione, ossidazione, alchilazione, nitratura e solfonazione che sono largamente applicate in diversi settori industriali. Esistono tutt'ora diversi esempi di processi che hanno beneficiato dell'applicazione del primo principio della chimica verde come la produzione di vernici senza solventi e detergenti privi di fosforo [70]. Di rilevante interesse è la riduzione dell'impiego di solventi nei processi industriali; per esempio, quasi l'80% di rifiuti prodotti dall'industria farmaceutica provengono dall'impiego di solventi. Un esempio virtuoso è il nuovo processo di produzione della sertralina, un farmaco appartenente alla classe degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina, in cui l'introduzione dell'etanolo come unico solvente elimina la necessità di utilizzare, distillare e recuperare quattro diversi solventi (cloruro di metilene, tetraidrofurano, toluene e esani), riducendo così il consumo di solventi da 250 a 25 litri per kg di sertralina [71].

Il secondo principio è intrinsecamente connesso al primo. Il termine economia atomica rappresenta la volontà di massimizzare l'incorporazione di tutti i materiali utilizzati nel processo nel prodotto finale concentrandosi sulla prevenzione dei rifiuti a livello molecolare. Questo concetto ha portato alla riprogettazione delle reazioni sintetiche esistenti, migliorando le rese e l'efficienza. Il rendimento nell'economia

atomica viene calcolato come il rapporto tra la massa molecolare del prodotto desiderato e la massa totale di tutti i reagenti. Un esempio notevole è la sintesi dell'ibuprofene, dove si è passati dal processo tradizionale, che aveva una bassa efficienza (40%) e alti sprechi, ad un nuovo metodo "verde", che ha raggiunto un'efficienza fino al 99% convertendo quasi tutti i prodotti intermedi nel prodotto finale o riciclandoli, riducendo così in modo significativo i rifiuti ed i costi di produzione [72].

I processi chimici spesso impiegano reagenti tossici durante alcune loro fasi, anche quando il prodotto finale non è pericoloso. Il terzo principio della chimica verde mira a riprogettare questi processi per rendere la sintesi chimica meno pericolosa. La sostituzione di sostanze chimiche dannose con enzimi biologici può rendere molti processi industriali più puliti ed economici. Un esempio di applicazione di questo principio è la sostituzione del COCl_2 (dicloruro di carbonile, un reagente con un'elevata reattività chimica e altamente tossico per le vie respiratorie) con l'anidride carbonica, ed eliminando il CH_2Cl_2 (diclorometano, sostanza nota per i suoi effetti tossici sull'essere umano e sull'ambiente), nella sintesi del polycarbammato (PC), un polimero utilizzato in diverse applicazioni industriali [73].

Il quarto principio si concentra sulla produzione di prodotti chimici più sicuri; essi devono essere progettati per svolgere la loro funzione riducendo al minimo la loro tossicità. Un esempio di applicazione di questo principio è lo sviluppo di insetticidi e pesticidi mirati solo agli organismi bersaglio e che si decompongono in sostanze innocue per l'ambiente.

L'uso di solventi e agenti di separazione dovrebbe essere minimizzato o reso innocuo. Il quinto principio incoraggia la riduzione delle sostanze ausiliarie e l'adozione di alternative sicure. Il riciclaggio dei solventi nei processi chimici spesso è inefficiente e dispendioso; pertanto, si punta all'impiego di solventi stabili, a bassa volatilità, facili da usare e riciclare. I liquidi ionici, che sono sali liquidi a temperatura ambiente, rappresentano una valida alternativa ai solventi organici convenzionali grazie alla loro bassa volatilità e sicurezza [74].

Di fondamentale importanza è la valutazione energetica di ogni processo produttivo; il sesto principio della chimica verde suggerisce che i metodi sintetici, ove possibile, dovrebbero essere eseguiti a temperatura ambiente e pressione atmosferica. L'attenzione a questo tema ha permesso di sviluppare nuovi processi che valorizzano ogni fonte energetica e di calore della linea produttiva.

Il settimo principio della chimica verde promuove l'uso di materie prime rinnovabili quando accettabile dal punto di vista tecnico ed economico. Ad esempio, è più conveniente utilizzare materie prime rinnovabili per produrre materiali biodegradabili piuttosto che materiali plastici non degradabili. Questo ha portato allo sviluppo di materiali plastici biodegradabili, che hanno un futuro promettente nell'industria alimentare. La politica, i cambiamenti legislativi e la domanda globale di risorse alimentari ed energetiche influenzano certamente lo sviluppo degli imballaggi biodegradabili. Il principio include anche l'uso di tecnologie energetiche rinnovabili, come l'energia solare, eolica, idroelettrica, da biomassa e i biocarburanti. Negli ultimi dieci anni, sono stati compiuti notevoli progressi nello sviluppo di combustibili, sostanze chimiche e materiali da materie prime rinnovabili. Ad esempio, il Brasile garantisce indipendenza energetica e occupazione con la produzione di

bioetanolo dalla canna da zucchero [75]. Nel caso delle bioplastiche, l'uso di materie prime rinnovabili riduce il consumo energetico e le emissioni di CO₂.

Secondo l'ottavo principio la derivatizzazione non necessaria (uso di gruppi protettori, protezione/deprotezione, modifiche temporanee di processi fisico-chimici) dovrebbe essere ridotta o evitata quando possibile, poiché tali passaggi richiedono reagenti aggiuntivi e possono generare rifiuti. In alternativa, dovrebbero essere utilizzati processi biologici per evitare la sintesi di prodotti per i quali non esistono enzimi per la degradazione. Un esempio tipico è la produzione di antibiotici basati sulla penicillina, dove i processi chimici classici sono stati sostituiti da processi enzimatici. La 6-aminopenicillina viene ottenuta mediante reazione con l'enzima penicillinamide immobilizzato, eliminando diversi passaggi chimici e l'uso di condizioni inadatte come basse temperature (-60°C) e solventi organici, semplificando così la produzione [76].

I catalizzatori sono sostanze che aumentano la velocità di una reazione chimica, tornando alla loro forma iniziale al termine del processo. Il loro principio si basa sull'abbassamento dell'energia di attivazione necessaria per la reazione, permettendo ai reagenti di trasformarsi in prodotti più rapidamente ed efficacemente. I catalizzatori possono essere di natura chimica (come metalli o acidi) o biologica (come gli enzimi). Il nono principio incoraggia l'uso di catalizzatori biodegradabili, che riducono il consumo energetico, evitano i composti organoclorurati e diminuiscono l'uso di acqua e il rilascio di acque reflue. Gli enzimi si distinguono per la loro specificità in termini di stereochimica e selettività chimica. I biocatalizzatori offrono vantaggi come l'elevata velocità di reazione e la specificità catalitica, sebbene

abbiano una sensibilità al calore e una stabilità limitate. Un esempio è la sintesi del catecolo, tradizionalmente derivato dal benzene, che comporta vari stadi di reazione e produce sottoprodotti indesiderati. Questo processo è stato sostituito da una sintesi biocatalitica che utilizza D-glucosio e *Escherichia coli* geneticamente modificato, eseguita in un solo stadio senza sottoprodotti, risultando economicamente sostenibile [72].

Il fine vita dei prodotti chimici è di fondamentale importanza. Il decimo principio sostiene che i prodotti chimici devono essere progettati per degradarsi in prodotti innocui al termine della loro funzione, evitando così di persistere nell'ambiente. Questo obiettivo può essere raggiunto modificando i parametri tecnologici e le sostanze ausiliarie nel processo produttivo per prevenire la formazione di sostanze nocive e massimizzare il riciclo dei rifiuti.

L'undicesimo principio dell'analisi in tempo reale per la prevenzione dell'inquinamento richiede lo sviluppo di metodologie analitiche che permettano il monitoraggio e il controllo in tempo reale dei processi chimici, prevenendo così la formazione di sostanze pericolose.

Il dodicesimo e ultimo principio favorisce la chimica intrinsecamente sicura per la prevenzione degli incidenti e richiede la scelta di sostanze nei processi chimici che minimizzino il rischio di incidenti chimici, come rilasci, esplosioni e incendi. Un esempio è l'uso crescente di CO₂ supercritica che sostituisce i solventi organici, essendo non tossica, non esplosiva e rispettosa dell'ambiente. La sicurezza si raggiunge a vari livelli, dell'uso di dispositivi di protezione individuale, all'implementazione di controlli amministrativi e pratiche di lavoro, fino

ai controlli ingegneristici e alla sostituzione di procedure con alternative più sicure.

Nonostante i notevoli progressi, la chimica verde affronta diverse sfide. la transizione dalle materie prime fossili a quelle rinnovabili richiede innovazioni tecnologiche e cambiamenti infrastrutturali significativi. Inoltre, l'implementazione su larga scala dei principi della chimica verde richiede investimenti iniziali che possono essere proibitivi per alcune industrie. La ricerca continua a esplorare nuove reazioni catalitiche, solventi più sicuri e materiali biodegradabili. Ad esempio, il d-Limonene, un solvente derivato dagli agrumi, è stato studiato come alternativa ecocompatibile ai solventi organici tradizionali. Inoltre, l'uso di catalizzatori a base di metalli non preziosi sta guadagnando attenzione per sostituire i metalli rari e costosi utilizzati nelle reazioni industriali.

1.5.2 Blue economy

All'interno del contesto dell'economia circolare, in tempi più recenti, nasce una nuova filosofia economica, che prende il nome di Economia Blu. Il termine *blue economy* viene attribuito all'economista Gunter Pauli, che dal 2010 pone l'attenzione sulle risorse marine e non solo; egli si concentra sul modo in cui la natura è capace di riutilizzare e trasformare ciò che è "rifiuto" e pone l'attenzione sulla possibilità di sviluppare un'economia che prende esempio dagli ecosistemi, creando un sistema in cui non esistono scarti, ma risorse, in modo tale da ridurre le emissioni e l'impatto ambientale, ma anche creare ricchezza. La *blue economy* può essere definita un modello di business sostenibile, che

nasce dall'esigenza di porre l'attenzione sulla salute degli oceani e sfruttarne in maniera produttiva e virtuosa tutte le potenzialità [77].

Il mare è una risorsa vastissima, ricca di opportunità, tra le quali si ricordano il potenziale energetico ed ittico, alla quale sono legate molte attività economiche, come ad esempio la pesca o il trasporto marittimo; esso però rischia di diventare un'immensa discarica se non si effettua un'inversione di rotta, contrastando il comportamento scellerato dell'uomo e delle industrie attuato finora.

Il principio cardine di un'economia sostenibile è quello di creare valore con ciò che è disponibile localmente, inibendo la globalizzazione e favorendo la diversità. Pauli sottolinea la possibilità di sviluppare nuovi processi o implementare quelli già esistenti per trovare soluzioni alle problematiche ambientali e, allo stesso tempo, ottenere benefici in campo economico e sociale. Oltre ad essere una fonte energetica di valore imparagonabile, ancora tutta da attenzionare, il mare è da sempre una risorsa alimentare per l'uomo.



Figura 9 Blue economy

Il modello economico della *blue economy* mira ad integrare la sostenibilità delle risorse sia marine che costiere (Figura 9). I punti salienti di questo modello economico possono essere riassunti in:

- Sfruttare le energie rinnovabili: il mare non è solo una risorsa in termini di approvvigionamento alimentare, esso può anche fornire energia rinnovabile da diverse fonti; gli impianti eolici Offshore installati al largo delle coste rappresentano una fonte significativa di energia rinnovabile; nuove tecnologie in fase di sviluppo come la produzione di energia dalle onde e dalle maree mostrano risultati promettenti per il futuro.
- Favorire la pesca sostenibile: è fondamentale per garantire la disponibilità a lungo termine delle risorse ittiche. Questo implica la gestione delle quote di pesca, la riduzione delle catture accessorie e la protezione degli habitat marini.
- Favorire l'acquacoltura sostenibile: l'allevamento di pesci e molluschi può ridurre la pressione e l'impoverimento degli oceani. Tuttavia, essa comporta una serie di aspetti negativi come il rilascio di nutrienti negli ambienti acquatici, l'uso di antibiotici, la distruzione di ecosistemi, problematiche legate agli allevamenti intensivi (proliferazione di malattie); inoltre spesso la produzione di mangimi per i pesci di allevamento richiede la pesca di specie selvatiche, che comporta la riduzione di alcune popolazioni marine. La ricerca e l'innovazione in questo settore mirano a rendere l'acquacoltura più sostenibile e meno impattante sugli ecosistemi marini.
- Sfruttare tutte le risorse del mare: il pesce non è solamente una risorsa alimentare. Esistono diversi settori che utilizzano risorse marine per la produzione di prodotti farmaceutici, cosmetici, nutraceutici e integratori. La *blue economy* si pone l'obiettivo di

ottimizzare tali processi per ridurre al minimo gli sprechi e valorizzare le risorse.

Inoltre, la blue economy mira sviluppare azioni contro la pesca illegale e l'inquinamento degli oceani. Benefici collaterali dell'applicazione di questo nuovo modello economico possono essere la creazione di nuovi posti di lavoro, la riduzione della povertà, la conservazione della vita marina e degli oceani e la protezione delle comunità costiere.



Figura 10 Obiettivi per lo sviluppo sostenibile riportati nell'Agenda 2030 [78]

Numerose organizzazioni e governi stanno implementando politiche per promuovere la blue economy. L'Unione Europea, ad esempio, ha lanciato la Strategia per la Crescita Blu, che mira a sostenere lo sviluppo sostenibile delle industrie marine e marittime. A livello globale, l'Organizzazione delle Nazioni Unite ha riconosciuto l'importanza della blue economy nell'Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile, in particolare nell'Obiettivo 14 (Figura 10) [79].

2 APPLICAZIONE DELLA BLUE ECONOMY ALL'INDUSTRIA ITTICA

L'attenzione rivolta ai prodotti del mare è un punto critico dell'economia circolare; infatti, se per quanto riguarda la bioraffinazione di prodotti lignocellulosici la ricerca è già ad uno stadio avanzato, il settore marino è ancora agli esordi. La valorizzazione degli scarti delle filiere della pesca è un settore non ancora totalmente esplorato, nonostante sia ormai consolidato il fatto che alcuni sottoprodotti del pesce abbiano un elevato potere nutrizionale; la motivazione è principalmente da ricercarsi nella serie di problemi tecnici che possono nascere dall'impiego di scarti ittici come prodotti per l'alimentazione umana. Lo sviluppo di nuove tecniche lavorazione potrebbe comportare un "risparmio" di oltre 35.837.000 tonnellate di biomassa attualmente inutilizzata [80].

Come l'agricoltura, anche l'acquacoltura è considerata un metodo ormai consolidato per abbattere la fame nel mondo e fornire nutrimento; questa metodologia, tuttavia, negli anni sta portando ad un impoverimento delle risorse marine; si consideri che oltre 30 milioni di tonnellate di pescato ogni anno vengono impiegati nella produzione di olio e farina di pesce e oltre il 70% di questi sono utilizzati come mangimi per l'acquacoltura [81].

Nel presente capitolo verranno esplorati in maniera più approfondita i punti cardine della blue economy, offrendo una panoramica sul consumo di pesce e la produzione di scarti. Saranno inoltre evidenziate le diverse tecniche di valorizzazione di tali scarti e verrà fatto un focus sui prodotti di valore derivanti dalla filiera ittica. Saranno inoltre riportate le

caratteristiche principali del tonno, specie utilizzata nel presente lavoro di ricerca.

2.1 Trasformazione blu

La produzione globale di pesce e frutti di mare ha raggiunto livelli senza precedenti, rappresentando una risorsa vitale per la sicurezza alimentare e il sostentamento economico in tutto il mondo. Tuttavia, la crescita esponenziale della domanda alimentare, insieme alle sfide ambientali e alla necessità di una gestione sostenibile delle risorse, richiede un approccio integrato e orientato al futuro.

La produzione totale di pesce è aumentata costantemente nel corso degli anni, raggiungendo il picco di 179 milioni di tonnellate nel 2018. Tuttavia, la sostenibilità delle risorse ittiche marine è una preoccupazione importante, con solo il 64,6% [82] degli stock valutati come sostenibili nel 2019, secondo il rapporto SOFIA 2022 della FAO. Nonostante le sfide, ci sono segnali positivi, con gli stock pescati in modo sostenibile che rappresentano l'82,5% del volume totale degli sbarchi nel 2019, indicando un miglioramento nella gestione delle risorse [83].

La FAO promuove la trasformazione blu come strategia chiave per affrontare le sfide della sicurezza alimentare e della sostenibilità ambientale, con un'attenzione particolare alla parità di genere e alla giustizia sociale. L'adozione di politiche e pratiche rispettose del clima e dell'ambiente è essenziale per guidare questa trasformazione, insieme all'innovazione tecnologica.

L'uso diretto di animali acquatici per il consumo umano ha registrato un aumento notevole nel corso degli anni. Dal 67% negli anni '60, è salito all'89% circa nel 2020, rappresentando oltre 157 milioni di tonnellate

della produzione totale di pesca e acquacoltura, escluse le alghe. Il restante 11% (più di 20 milioni di tonnellate) è stato destinato a scopi non alimentari. Di questo, l'81% (oltre 16 milioni di tonnellate) è stato trasformato in farina e olio di pesce, mentre le restanti 4 milioni di tonnellate sono state utilizzate per una varietà di scopi, come allevamento, esca, usi farmaceutici e alimentazione animale [84].

I prodotti della pesca e dell'acquacoltura sono trasformati in una vasta gamma di alimenti che dipendono dalla specie, dal metodo di conservazione e dalla forma del prodotto. Grazie a significativi miglioramenti nella lavorazione, nella refrigerazione, nello stoccaggio e nel trasporto, è stato possibile prolungare la durata di conservazione dei prodotti, distribuirli su lunghe distanze e attraversare i confini, offrendo così una varietà crescente di scelte ai consumatori [85].

La pesca e l'acquacoltura sono elementi vitali dei sistemi alimentari globali, ma richiedono una gestione oculata e orientata al futuro per garantire la sostenibilità delle risorse e il benessere delle comunità coinvolte. Attraverso la trasformazione blu e l'adozione di pratiche sostenibili, si può costruire un futuro in cui la pesca e l'acquacoltura contribuiscano in modo equo ed equilibrato alla sicurezza alimentare globale e allo sviluppo sostenibile.

Nei prossimi dieci anni, l'acquacoltura deve espandersi in modo sostenibile per soddisfare la crescente domanda di alimenti acquatici, generando al contempo nuove fonti di reddito e occupazione o garantendo quelle esistenti. Ciò richiede efficaci quadri di governance, innovazioni tecnologiche, opportunità di investimento e sviluppo delle catene del valore.

L'obiettivo è aumentare la produzione globale di acquacoltura dal 35% al 40% entro il 2030, secondo i contesti nazionali e regionali. La FAO e i suoi partner devono applicare e condividere sistemi di gestione della pesca efficaci, che ripristinino gli ecosistemi a uno stato sano e produttivo, ricostruendo nel contempo le risorse sfruttate.

Inoltre, le riserve ittiche dovrebbero essere mantenute ai livelli che producono il massimo rendimento sostenibile, facendo in modo che il 100% delle risorse ittiche e degli habitat acquatici sia sotto una gestione efficace. La promozione di diete sane e l'inclusione di alimenti acquatici nelle strategie nazionali di sicurezza alimentare e nutrizione sono altrettanto cruciali e richiedono iniziative che migliorino la consapevolezza dei consumatori e aumentino la disponibilità di alimenti acquatici sani, sicuri e nutrienti per tutti. I sistemi acquatici hanno un grande potenziale per sostenere milioni di vite e mezzi di sussistenza e contribuire alla sicurezza alimentare. Se trasformati e ampliati in modo positivo, possono affrontare la sfida di nutrire una popolazione in crescita preservando al contempo le risorse naturali e gli ecosistemi che le sostengono.

La Trasformazione Blu è una strategia visionaria che mira a potenziare il ruolo dei sistemi alimentari acquatici fornendo i quadri giuridici, politici e tecnici necessari per sostenere la crescita e l'innovazione. Essa propone una serie di azioni volte a sostenere la resilienza nei sistemi alimentari acquatici e garantire che la pesca e l'acquacoltura crescano in modo sostenibile [86].

2.2 Consumo di pesce

Il consumo pro capite globale di pesce è aumentato da 9 a 20 kg l'anno negli ultimi cinquanta anni, con un tasso di crescita medio annuo di circa l'1,5%, per un aumento del consumo alimentare totale pari al 122% dal 1990 al 2018; lo sviluppo del settore ha comportato una maggiore diversificazione dell'offerta attraverso differenti filiere produttive. Si prevede che la produzione alimentare acquatica aumenterà di un ulteriore 15% entro il 2030 [86].

Per ovviare all'incremento della domanda, l'approvvigionamento di pesce non avviene esclusivamente tramite la pesca, ma anche mediante acquacoltura. Negli ultimi anni, la produzione globale di prodotti ittici ha mostrato un trend in crescita (Figura 11) con un aumento del 16% tra il 2010 e il 2016. Tuttavia, le due componenti principali, la pesca e l'acquacoltura, mostrano andamenti diversi: la pesca si è stabilizzata intorno ai 91 milioni di tonnellate, mentre l'acquacoltura continua a espandersi. I pesci più pescati a livello globale includono acciughe, merluzzi, sardine e tonni [87].

Nel panorama mondiale, l'UE si distingue tra i produttori nei settori della pesca e dell'acquacoltura, contribuendo nel 2021 al 4% per le catture e all'1% per l'acquacoltura della produzione globale nel 2021. Il consumo pro capite a livello europeo è in media più alto rispetto a quello mondiale, attestandosi attorno a 24 kg all'anno, che corrispondono ad un consumo apparente di 10,6 milioni di tonnellate in peso vivo equivalente [88]. Pertanto, l'UE è uno dei principali mercati per il pesce e i prodotti ittici, importando una quantità significativa di pesce per soddisfare la domanda interna.

Tuttavia, il consumo varia ampiamente all'interno dell'UE, oscillando dai 56 kg in Portogallo ai 6 kg di peso vivo equivalente pro capite in Ungheria. I principali prodotti consumati includono tonno (prevalentemente in scatola), salmone, merluzzo, gamberi, cozze, nasello e aringa.

Il settore import/export del mercato ittico europeo è estremamente vivo. Infatti, circa il 70% dell'offerta di pesce a livello europeo proviene da importazioni, i prodotti maggiormente importati sono salmone, merluzzo, tonno e gamberetti. Allo stesso tempo, quasi il 20% della produzione europea viene esportata, tra i prodotti maggiormente esportati spiccano l'aringa, lo sgombro, il tonno ma anche farina e olio di pesce.

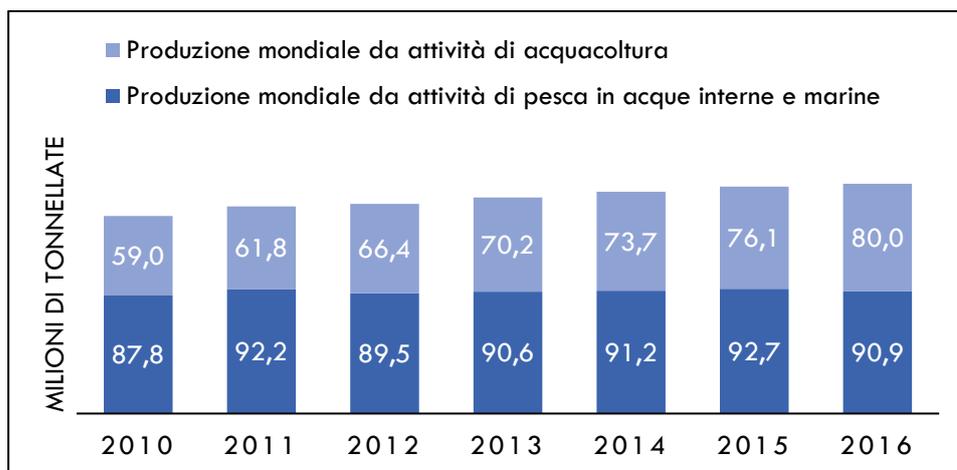


Figura 11 Produzione mondiale di prodotti ittici [87]

L'Italia ha una lunga tradizione di consumo di pesce, con un consumo pro capite di circa 29 kg all'anno, uno dei più alti in Europa. I pesci più consumati includono tonno, orata, branzino, merluzzo e alici. La dieta mediterranea, che pone un forte accento sul consumo di pesce, contribuisce a questi elevati livelli di consumo. Circa un italiano su tre

consuma pesce regolarmente e la maggior parte delle persone dichiara di consumarlo due o tre volte alla settimana. Il 42% degli italiani mangia pesce una sola volta a settimana, mentre solo in 2,5% afferma di non consumarlo mai [89]

Da una ricerca realizzata da ISNART (Istituto Nazionale Ricerche Turistiche) [90] è stato evidenziato che il consumo di pesce negli ultimi anni è rimasto invariato per circa due terzi della popolazione, mentre le persone con redditi più alti ne hanno aumentato la frequenza; il consumo di pesce fresco viene prediletto principalmente al sud Italia e dalle persone con maggiori risorse economiche, mentre il 32,1% della popolazione sceglie principalmente pesce surgelato.

Tuttavia, la produzione interna di pesce non basta per soddisfare il consumo di pesce, pertanto l'Italia importa una quantità significativa di pesce da altri paesi europei e non [91].

Sgradita conseguenza di un incremento dei consumi è il relativo aumento di rifiuti; la lavorazione del pesce, infatti, è caratterizzata dal fatto che alcune parti della materia prima (teste, code, lische etc.) non sono commestibili, e pertanto il 20-80% del pescato, a seconda dell'origine, è da scartare [92]. Un ulteriore dato allarmante è legato alle emissioni delle filiere produttive del pesce; non è possibile considerare il pesce a priori più sostenibile della carne, in quanto, a seconda che provenga da acquacoltura o pesca, le emissioni ad esso correlate possono raggiungere valori pari a 6,6 kg di CO₂ equivalente per ogni chilogrammo di pesce [81].

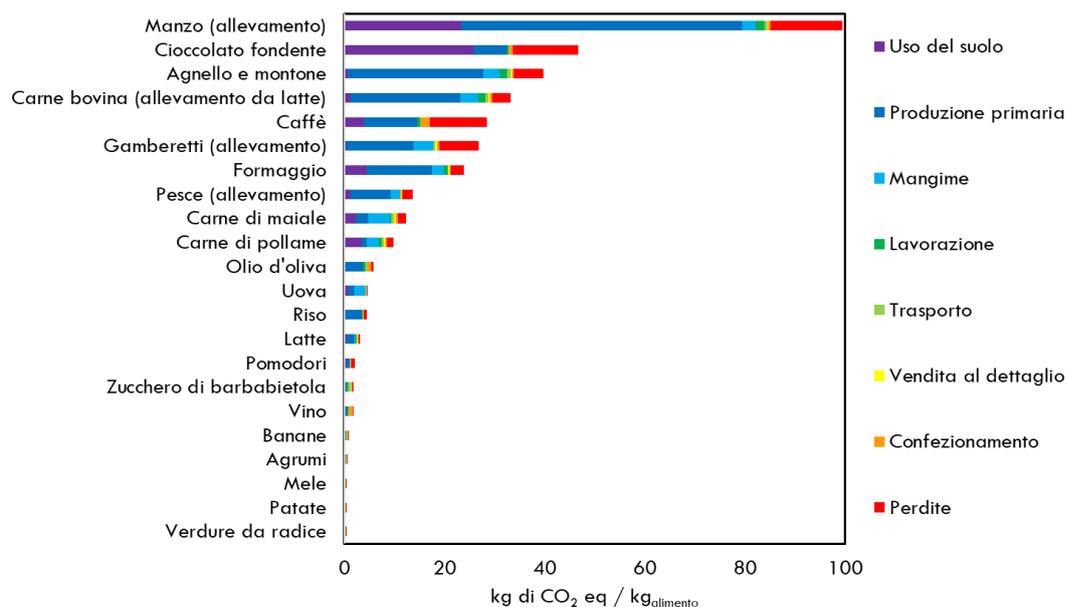


Figura 12 Emissioni di gas serra lungo tutta la filiera di alcune tipologie di alimento [93]

Il grafico riportato in Figura 12 mostra l'impatto ambientale di vari alimenti, misurato in termini di emissioni di CO₂ equivalenti per chilogrammo di alimento (kg CO₂ eq/kg) e suddiviso per ciascuna delle fasi della filiera di produzione dell'alimento.

La carne, in particolare quella di manzo, è l'alimento con il maggior impatto ambientale. Si notano emissioni di CO₂ molto elevate e in gran parte dovute alla fase di allevamento (denominata produzione primaria), ma anche all'uso del suolo e alle perdite. Questi alti valori sono legati principalmente all'allevamento intensivo, che richiede grandi quantità di terreno per il pascolo o la produzione di mangimi, e all'elevato consumo di risorse naturali. Gli altri tipi di carne, come il maiale e il pollame, presentano un impatto ambientale inferiore rispetto alla carne bovina, ma comunque rilevante.

Il pesce ha un impatto ambientale inferiore rispetto alla carne bovina, ma comunque rilevante, soprattutto per quanto riguarda la fase di

allevamento. Rispetto alla carne di maiale e pollame, il pesce ha un impatto simile o leggermente superiore a seconda della specie e del tipo di allevamento. Crostacei di piccola taglia come i gamberetti hanno un impatto ambientale piuttosto elevato, anch'essi a causa della gestione degli allevamenti ma anche a causa dell'impiego di mangimi e alle perdite nel sistema produttivo.

Dal grafico emerge chiaramente che le proteine animali, sia carne che pesce, hanno un impatto ambientale molto più elevato rispetto agli alimenti di origine vegetale (come frutta, verdura, riso e patate). La carne di manzo è decisamente la più impattante, seguita da gamberetti, agnello, e pesce di allevamento, mentre carne di maiale e pollame hanno un'impronta più contenuta. Il pesce di allevamento presenta comunque un impatto ambientale più alto rispetto alla maggior parte degli alimenti vegetali.

2.3 Scarti di pesce: un sottoprodotto di valore

La produzione di scarti nel settore ittico è un problema significativo. Si stima che, a livello globale, circa il 35% del pescato ogni anno in tutto il mondo viene sprecato, e della restante parte solo il 30% non si trasforma in scarto; ciò significa che l'80% del pesce lavorato per fini alimentari non è commestibile (visceri, teste, code etc.) (Figura 13) [94]. Gli scarti provengono principalmente da:

- Scarti di lavorazione: parti non edibili come teste, pinne, lische e viscere;
- Spreco alimentare: pesce non consumato e scartato a livello di distribuzione e consumo domestico.

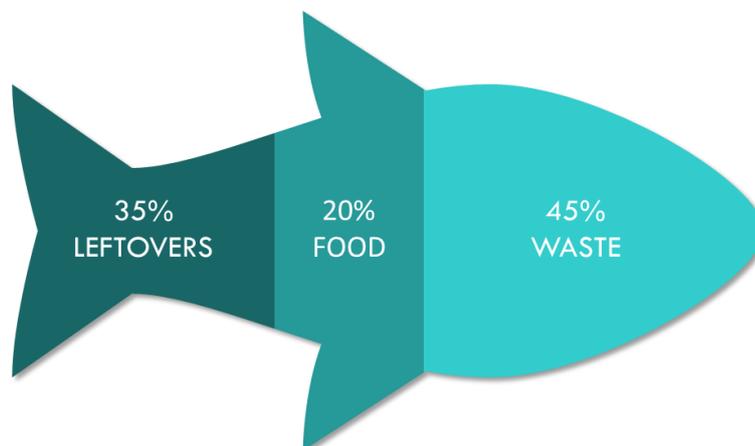


Figura 13 Percentuali di pesce scartato o processato per scopi alimentari [94]

In Europa, la percentuale di scarti può variare, ma si stima che circa il 20-25% del pesce venga scartato durante la lavorazione e la distribuzione. In Italia, la situazione è simile, con una significativa quantità di scarti provenienti dai mercati ittici e dai processi di trasformazione.

Inoltre, non tutto il pesce viene impiegato a scopi alimentari, in quanto buona parte di esso è utilizzato come fonte di materie prime quali proteine, acidi grassi, oli essenziali, largamente impiegati nell'industria farmaceutica (circa 22 milioni di tonnellate ogni anno) [95].

Quanto esposto finora rende evidente il fatto che ci sia una forte necessità di valorizzare gli scarti del pesce; a dar valore a questo bisogno non è soltanto la volontà di migrare verso un'economia di tipo circolare, ma anche la possibilità di produrre in maniera più sostenibile sostanze benefiche per il corpo umano e provenienti dalla fauna marina.

Per affrontare questi problemi, sono necessarie strategie di gestione sostenibile e innovazioni tecnologiche, come per esempio una maggiore educazione del consumatore, il miglioramento delle tecniche di lavorazione e l'implementazione di politiche e regolamenti che

incentivino la riduzione degli scarti lungo tutta la filiera ittica. Tuttavia, tra le strategie più promettenti si distingue la possibilità di valorizzare gli scarti per la produzione di composti a valore aggiunto.

A tal proposito, la ricerca si sta concentrando sull'utilizzo dei sottoprodotti delle filiere ittiche per la produzione di mangimi, oli, fertilizzanti e biocarburanti, ma non solo. Diversi studi hanno evidenziato l'importanza nutrizionale dei sottoprodotti del pesce, che contengono fino al 25% di grassi e dal 15% al 30% di proteine grezze, tra cui collagene e gelatina [96], [97], [98]. Inoltre, anche le lisce possono rappresentare un prodotto di valore, esse sono infatti una ricca fonte di minerali come fosforo, calcio, potassio, sodio e ferro [99].

Tuttavia, l'impiego di sottoprodotti della filiera ittica per il consumo umano presenta diverse sfide legate alla sicurezza alimentare. I sottoprodotti della pesca possono essere soggetti a contaminazioni microbiologiche se non trattati e conservati adeguatamente. Batteri patogeni come *salmonella*, *listeria* ed *escherichia coli* possono proliferare, rappresentando un rischio significativo per la salute umana. Un ulteriore fattore allarmante è la presenza di contaminanti chimici, come metalli pesanti (mercurio, piombo), residui di pesticidi e antibiotici, comuni nei sottoprodotti della pesca. Questi contaminanti possono accumularsi nei tessuti dei pesci e trasferirsi nei sottoprodotti utilizzati per il consumo umano. Inoltre, le proteine e i lipidi dei sottoprodotti del pesce possono subire ossidazione, portando a problemi di gusto e odore nei prodotti alimentari. L'ossidazione lipidica è particolarmente problematica, poiché può ridurre la shelf life degli alimenti e compromettere la loro qualità sensoriale [100]. Ognuna di queste problematiche rappresenta una sfida per la ricerca che,

nonostante i limiti, punta a trasformare gli scarti del pesce in un'immensa risorsa.

2.3.1 Valorizzazione degli scarti del pesce in prodotti per la salute umana

Tabella 6 ingredienti funzionali dai sottoprodotti della pesca e rispettivi benefici [92]

Prodotto	Derivazione	Potenziali benefici
Collagene e gelatina	Lisca di pesce, squame, pinne	Agente anti-tensione
Carotenoidi	Astaxantina, fucoxantina	Malattie neurodegenerative
Vitamine e minerali	Pesci marini	Crescita e fisiologia del corpo
Calcio	Lische di pesce	Agente anticancerogeno e antitumorale
Peptidi bioattivi	Proteine del pesce	Controllo dell'obesità
Proteine isolate del pesce	Carne del pesce	Integratore proteico
Taurina	Merluzzo, sgombro	Prevenzione delle malattie cardiovascolari, morbo di Alzheimer e fibrosi cistica
Minerali	Lische di pesce	Crescita e metabolismo
Omega-3	Olio di pesce	Prevenzione delle malattie cardiovascolari e delle funzioni cerebrali

Il consumo di pesce ha senza dubbio effetti positivi sull'organismo. Per tale ragione spesso parte del pescato viene impiegato per la produzione

di integratori o per l'estrazione di composti nutraceutici utili al metabolismo dell'uomo. Per tanto, acquisisce rilevanza scientifica lo studio di tecniche di estrazione di prodotti di valore dagli scarti del pesce e non solo da pesce fresco. Nella Tabella 6 sono riportati i benefici per la salute umana di alcuni prodotti della lavorazione degli scarti del pesce.

2.3.1.1 Collagene

La produzione di collagene e gelatina dagli scarti della filiera ittica rappresenta un'importante opportunità per la valorizzazione dei sottoprodotti della pesca, contribuendo a una gestione più sostenibile delle risorse marine. Gli scarti della lavorazione del pesce, come pelle, squame, ossa e pinne, sono ricchi di collagene, la principale proteina strutturale nei tessuti connettivi extracellulari dei pesci, rappresentando tra il 15% e il 30% del totale delle proteine del pesce. È costituito da catene polipeptidiche formate da triplette ripetute di glicina e altri due amminoacidi, prevalentemente prolina e 4-idrossiprolina. L'utilizzo del collagene ottenuto dagli scarti della pelle di pesce sta crescendo, grazie ai suoi vantaggi distintivi, tra cui un basso peso molecolare, un'ottima biocompatibilità, una minima antigenicità, un'elevata sicurezza biologica e un costo contenuto [101]. Le caratteristiche del collagene derivante dalla pelle di pesce ha dimostrato proprietà eccezionali per la rigenerazione della cartilagine e dei tessuti. Il collagene viene estratto attraverso processi di idrolisi che rompono le strutture proteiche. Questo può essere fatto mediante l'uso di acidi (idrolisi acida), alcali (idrolisi alcalina) o enzimi (idrolisi enzimatica). L'idrolisi enzimatica è spesso preferita perché produce collagene di alta qualità con proprietà funzionali superiori. Esso viene poi purificato per rimuovere eventuali

contaminanti. Questo processo può includere filtrazione, centrifugazione e dialisi. Infine viene essiccato per ottenere un prodotto finale in polvere, che può essere utilizzato direttamente o ulteriormente trasformato in gelatina. La gelatina è utilizzata come addensante, stabilizzante e agente gelificante in vari prodotti alimentari, come dolci, dessert, gelati e yogurt. Sia il collagene che la gelatina trovano applicazioni nell'industria cosmetica e farmaceutica per la produzione di capsule, rivestimenti di pillole, cosmetici anti-invecchiamento e prodotti per la cura della pelle. Inoltre il collagene è impiegato nella medicina rigenerativa, nella produzione di scaffold per la riparazione dei tessuti e nelle protesi biocompatibili.

2.3.1.2 Carotenoidi

I carotenoidi sono pigmenti naturali con proprietà antiossidanti, ampiamente utilizzati nell'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica. Gli scarti del pesce, come la pelle, le teste e le viscere, sono ricchi di carotenoidi. Ad esempio, la pelle del salmone e le teste di gamberi contengono astaxantina, un potente carotenoide antiossidante. La produzione di carotenoidi dagli scarti del pesce può avvenire tramite vari metodi di estrazione, tra cui: estrazione con CO₂ supercritica, estrazione enzimatica o estrazione con solventi, tra i quali etanolo, metanolo ed n-esano.

I carotenoidi estratti dagli scarti del pesce hanno diverse applicazioni; sono impiegati nell'industria alimentare come coloranti naturali e antiossidanti. L'industria farmaceutica li impiega come integratori grazie alle loro proprietà antinfiammatorie. Inoltre, i carotenoidi sono impiegati nell'industria cosmetica grazie alle loro proprietà anti-età e protettive contro i raggi UV [102].

2.3.1.3 Vitamine e minerali

Gli scarti della filiera ittica rappresentano una fonte preziosa e spesso sottovalutata di vitamine e minerali essenziali. Questi componenti possono essere estratti e utilizzati in diverse applicazioni industriali, contribuendo non solo alla riduzione degli sprechi ma anche all'incremento del valore dei prodotti ittici. Gli scarti del pesce, come pelle, fegato e viscere, sono ricchi di diverse vitamine, come A, D, vitamine del gruppo B, E e minerali come calcio e fosforo, ma anche iodio, magnesio, selenio, zinco e ferro. I principali processi impiegati per l'estrazione di tali prodotti sono idrolisi enzimatica, processi termici, ultrasuoni ed estrazione con solventi.

2.3.1.4 Peptidi bioattivi

Gli scarti della filiera ittica rappresentano una fonte preziosa di peptidi bioattivi, i quali possiedono una vasta gamma di proprietà benefiche per la salute umana. Questi peptidi sono piccoli frammenti proteici che si ottengono attraverso processi di idrolisi proteica, composti da 2-20 amminoacidi, ottenuti mediante idrolisi di sottoprodotti del pesce, come pelle, muscoli di merluzzo, visceri e sangue. Possono svolgere diverse funzioni biologiche, sono largamente impiegati nell'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica.

2.3.1.5 Proteine

Le proteine di pesce sono una fonte eccellente di amminoacidi essenziali ben bilanciati, tra cui lisina, valina e fenilalanina. I sottoprodotti del pesce, come ossa e muscoli, contengono notevoli quantità di proteine facilmente digeribili e altamente bioattive. Queste proteine presentano interessanti proprietà, come attività gelificante, capacità di emulsione, assorbimento di olio, capacità schiumogena e ritenzione idrica,

rendendole estremamente preziose per molteplici applicazioni nell'industria alimentare. I sottoprodotti della filiera ittica, come pelle, ossa e teste, sono particolarmente ricchi di proteine. Queste proteine possono essere estratte tramite vari metodi, tra cui l'idrolisi enzimatica, che sfrutta enzimi specifici per rompere le proteine in peptidi e amminoacidi più piccoli. Una volta estratte, le proteine possono essere ulteriormente purificate e concentrate mediante ultrafiltrazione e liofilizzazione, garantendo una maggiore stabilità e attività biologica. Sono anche largamente impiegate nell'industria nutraceutica e cosmetica, grazie alle loro proprietà nutritive e bioattive, come la modulazione del sistema immunitario e le attività antiossidanti [103].

2.3.1.6 Taurina

La taurina è un amminoacido non essenziale presente in molte specie marine. È particolarmente concentrata nei tessuti di pesci come il tonno, il merluzzo e i crostacei. L'estrazione della taurina dai sottoprodotti del pesce avviene generalmente attraverso un processo di idrolisi acida o enzimatica. In questo processo, i sottoprodotti come teste, ossa, pelle e viscere vengono trattati con acidi o enzimi specifici che degradano le proteine e rilasciano la taurina. Successivamente, la taurina viene purificata utilizzando tecniche come la filtrazione e la cristallizzazione per ottenere un prodotto finale ad alta purezza. La taurina è utilizzata come integratore alimentare per migliorare la salute cardiovascolare, supportare la funzione muscolare e migliorare le prestazioni atletiche.

2.3.2 Prodotti della valorizzazione del pesce non destinati al consumo umano

A causa delle restrizioni sanitarie, spesso gli scarti della filiera ittica non sono utilizzabili per la produzione di composti nutraceutici o adatti al consumo umano. Tale condizione è comune anche alle popolazioni acquatiche inavvertitamente pescate che non riscontrano interesse sul mercato alimentare, e che pertanto vengono scartate. Nonostante ciò, il pesce di basso valore, gli scarti della lavorazione del pesce e i pesci catturati accidentalmente rappresentano una risorsa significativa per la produzione di nuovi prodotti industriali. Gli scarti della lavorazione del pesce possono essere trasformati attraverso tecnologie innovative in prodotti a valore aggiunto come enzimi, collagene e biopolimeri, contribuendo a ridurre l'impatto ambientale e a creare nuove opportunità economiche.

Gli enzimi di origine ittica si distinguono da quelli terrestri grazie all'adattamento dei pesci a ambienti differenti (salinità elevata, pressione idrostatica, temperature estreme e scarsità di nutrienti). Ad esempio, gli enzimi dei pesci antartici, adattati al freddo, richiedono energie di attivazione relativamente basse, mostrando così una termosensibilità e una specificità del substrato particolari.

Le proteasi rappresentano circa il 50% del mercato degli enzimi industriali. Il processo di estrazione delle proteasi dai visceri dei pesci include varie fasi: frantumazione, omogeneizzazione, centrifugazione, separazione per precipitazione e surnatante, saturazione, dissoluzione e dialisi. Gli enzimi derivati da pesci e molluschi trovano impiego in numerosi ambiti, come la produzione di prodotti farmaceutici e

cosmeceutici, il recupero di sottoprodotti e la ricerca di base (come nei biosensori e nella clonazione genica) [104].

Un'ulteriore proposta di rilevante interesse è la produzione di biopolimeri a partire dagli scarti di pesce. Le squame di pesce, la chitina, il chitosano, il collagene, la gelatina e le proteine miofibrillari sono materiali preziosi per la produzione di biopolimeri. I film e i rivestimenti commestibili di gelatina possono essere utilizzati per il bioimballaggio di pesce e carne grazie alle loro proprietà sensoriali, biodegradabilità, opacità, luminosità, resistenza meccanica e protezione contro acqua, gas e microrganismi. A livello industriale, il collagene è utilizzato per creare involucri commestibili nelle industrie della carne, come salsicce e salami.

Le proteine miofibrillari possono essere avvolte, rivestite o spruzzate sugli alimenti per il bioimballaggio. I film proteici miofibrillari sono efficienti nel difendere contro la luce UV e possono essere utilizzati per l'incapsulamento di nutraceutici come vitamine, probiotici, peptidi bioattivi e antiossidanti [105].

Il chitosano è un candidato eccellente per le applicazioni di imballaggio alimentare. Le miscele di polimeri di chitosano, come i film di chitosano/carbossimetilcellulosa, offrono elevate prestazioni meccaniche, bassa solubilità in acqua e permeabilità al vapore acqueo. Questi biopolimeri rappresentano un'alternativa ecologica e funzionale alle plastiche sintetiche, contribuendo così alla riduzione dell'impatto ambientale [106].

Un metodo di valorizzazione semplice e molto utilizzato è la produzione di farina di pesce da pesci catturati accidentalmente, pesci di basso valore e scarti. Essa trova largo impiego nell'acquacoltura.

Infine, i rifiuti di pesce possono essere trasformati in fertilizzanti organici, migliorando la fertilità del suolo e riducendo la necessità di fertilizzanti chimici.

2.3.3 Produzione di farina e olio di pesce

Parte del pescato mondiale non viene utilizzato direttamente per il consumo umano ma viene trasformato in farina e olio di pesce. La farina di pesce, ottenuta dalla macinazione ed essiccazione del pesce o delle sue parti, è ricca di proteine, mentre l'olio di pesce viene estratto dal pesce cotto. Questi prodotti derivano principalmente da piccoli pesci pelagici [85].

Nel corso del tempo, le buone pratiche di gestione e i certificati di sostenibilità hanno ridotto le catture non sostenibili per la produzione di farina di pesce. Tuttavia, la quantità utilizzata ha subito variazioni, raggiungendo un picco nel 1994 e poi scendendo prima di risalire nel 2018. Questo aumento della domanda è stato guidato principalmente dall'acquacoltura in rapida crescita e da altri settori come l'allevamento di suini e pollame e le industrie farmaceutiche e alimentari per animali domestici (Figura 14). La Marine Ingredients Organization (IFFO) stima che la maggior parte della farina di pesce venga utilizzata nell'acquacoltura, con una percentuale minore destinata ad altri usi come l'alimentazione animale. Questo aumento della domanda ha portato a un aumento dei prezzi e alla ricerca di fonti alternative [107].

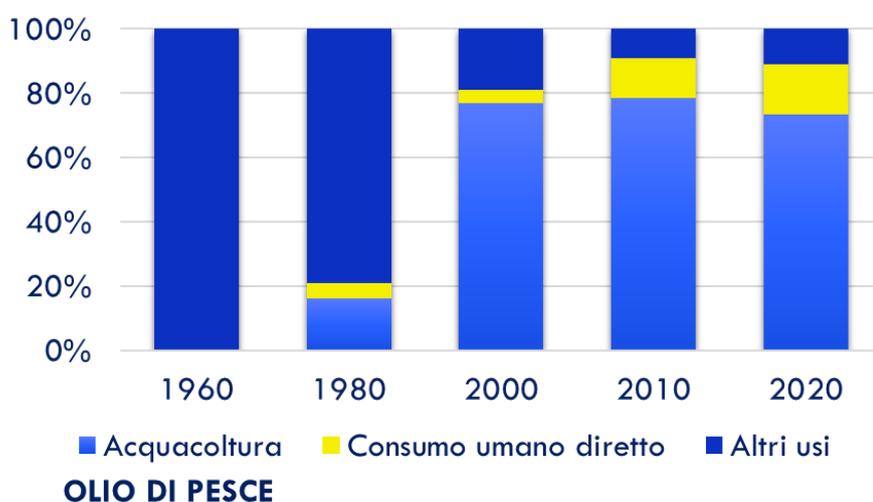
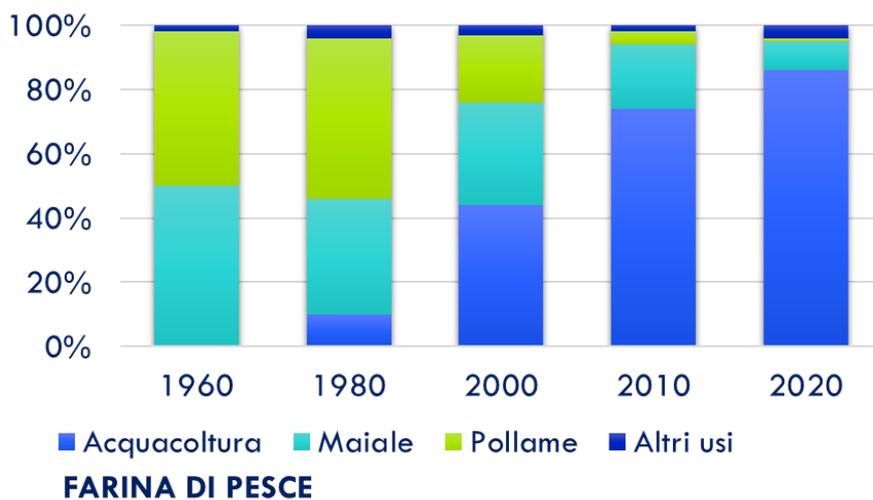


Figura 14 Utilizzo di farina e olio di pesce [84]

Sebbene la maggior parte del pesce utilizzato provenga da risorse ben gestite, ci sono preoccupazioni per la sostenibilità in alcune aree dove il pesce destinato al consumo umano viene dirottato verso la produzione di farina di pesce per l'esportazione, causando problemi di sicurezza alimentare e sostenibilità.

La produzione di farina e olio di pesce da sottoprodotti della pesca e dell'acquacoltura sta diventando più comune, contribuendo alla riduzione degli sprechi (Figura 15). Tuttavia, sono necessari ulteriori

sforzi per garantire una gestione sostenibile delle risorse ittiche e ridurre gli sprechi di cibo acquatico a livello globale.

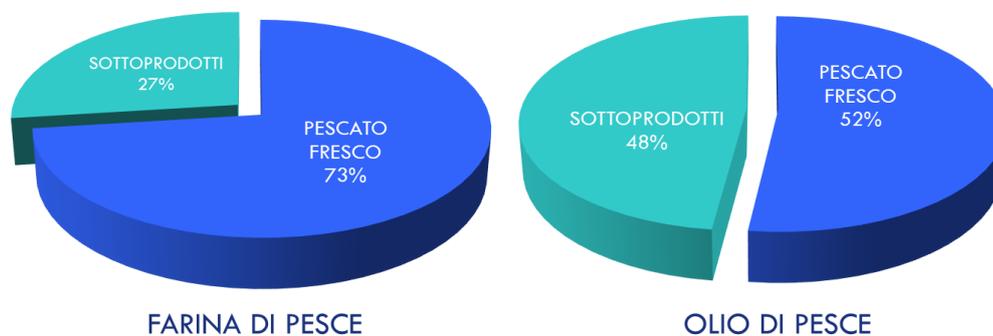


Figura 15 Materia prima utilizzata per la riduzione in farina di pesce e olio di pesce, 2020 [107]

2.4 Acidi grassi Omega-3

Un acido grasso è una molecola che presenta un gruppo carbossilico e una lunga catena alifatica, con la possibilità di essere sia saturo che insaturo. Questi composti sono ampiamente studiati nei campi della chimica e della biochimica. Gli acidi grassi naturali possono avere un numero variabile di atomi di carbonio, tipicamente compreso tra 4 e 28. In natura, gli acidi grassi sono spesso trovati sotto forma di esteri, come trigliceridi, fosfolipidi ed esteri del colesterolo, anziché nella loro forma libera [108].

Gli Omega-3 sono una classe di acidi grassi polinsaturi (PUFA) che si distinguono per la loro struttura chimica. Come tutti gli acidi grassi, gli Omega-3 sono costituiti da lunghe catene di atomi di carbonio con un gruppo carbossilico all'estremità e un gruppo metilico all'altra. La caratteristica distintiva degli Omega-3 è la presenza di un doppio legame carbonio-carbonio situato a tre atomi di carbonio dall'estremità metilica

della catena. Tra gli Omega-3 più importanti troviamo l'acido alfa-linolenico (ALA), l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA). L'ALA è considerato un Omega-3 a catena corta, mentre EPA e DHA sono Omega-3 a catena lunga a causa del loro maggiore numero di atomi di carbonio.

Gli Omega-3 sono considerati essenziali perché il corpo umano non può sintetizzarli da solo e devono quindi essere ottenuti dalla dieta [109]. Sebbene l'ALA possa essere convertito in EPA e poi in DHA nel corpo, questa conversione è limitata e il consumo diretto di EPA e DHA attraverso alimenti o integratori alimentari è il modo più pratico per aumentare i livelli di questi nutrienti. L'ALA è presente in oli vegetali come semi di lino, soia e canola, mentre EPA e DHA si trovano principalmente nel pesce e negli oli di pesce. È importante includere fonti di Omega-3 nella dieta per beneficiare delle loro proprietà benefiche per la salute, tra cui il supporto alla funzione cerebrale, la salute del cuore e l'infiammazione ridotta [110]. È importante che l'estrazione degli acidi grassi Omega-3 avvenga da un prodotto fresco, in quanto il deterioramento del pesce può condurre all'ossidazione degli acidi grassi liberi e portare alla produzione di perossidi, aldeidi e chetoni [80].

2.4.1 Produzione e consumo di Omega-3

Il consumo di Omega-3 varia considerevolmente da regione a regione, con i paesi nordici che tradizionalmente hanno un'alta assunzione di pesce e quindi di Omega-3, mentre altre regioni del mondo potrebbero avere una dieta meno ricca di questi acidi grassi. Il mercato globale degli

Omega-3 dell'olio di pesce è in costante crescita. Nel 2022, ha raggiunto un valore di 1,1 miliardi di dollari, con previsioni di raggiungere 1,8 miliardi di dollari entro il 2032, con un tasso di crescita annuo del 5,1% nel periodo dal 2023 al 2032 [111].

Questo mercato si occupa dell'approvvigionamento, della fornitura e della distribuzione di oli di pesce utilizzati in una vasta gamma di prodotti, come integratori alimentari, alimenti per animali e prodotti farmaceutici. Gli Omega-3 dell'olio di pesce vengono estratti da vari tipi di pesce, tra cui acciughe, merluzzi, aringhe e sgombri, e sono utilizzati per i loro benefici per la salute [112].

Tuttavia, il mercato deve affrontare diverse sfide, tra cui normative rigorose che possono aumentare i costi di produzione e ostacolare l'innovazione. Inoltre, le restrizioni commerciali internazionali possono limitare la crescita complessiva del mercato.

Nonostante le sfide, ci sono opportunità significative per la crescita del mercato, come la diversificazione dei prodotti attraverso formulazioni innovative e la ricerca e lo sviluppo di prodotti specializzati che soddisfano esigenze sanitarie specifiche. Queste iniziative possono portare a una maggiore fiducia dei consumatori e a una maggiore efficacia percepita dei prodotti, contribuendo a espandere il mercato degli Omega-3 dell'olio di pesce e a soddisfare le esigenze in evoluzione dei consumatori.

Gli indiscussi benefici apportati dall'assunzione di Omega-3 ha fatto sì che si evolvesse il settore produttivo di integratori basati su questo prodotto.

L'estrazione convenzionale di Omega-3 viene effettuata mediante la riduzione umida, che coinvolge tre fasi principali: cottura ad alte temperature (85-95°C), pressatura e centrifugazione [82]. Questo metodo permette di ottenere quantità significative di olio di pesce grezzo, ma è necessario sottoporre l'olio grezzo a ulteriori processi di raffinazione per renderlo adatto al consumo alimentare. Altri approcci, come la reazione enzimatica con proteasi, o l'estrazione con fluido supercritico sono stati esaminati per ottenere olio grezzo dai sottoprodotti ittici [113].

Estrarre olio dagli scarti del pesce, e non solo da pescato fresco, risulta essere una rivoluzione nel settore, in quanto ciò permetterebbe di ridurre la pesca finalizzata alla produzione di integratori e, allo stesso tempo, diminuire la produzione di scarti da smaltire, per esempio, in discarica. Infatti, più del 60% del pesce fresco destinato al consumo alimentare è da eliminare, perché non commestibile, ciò comporta che enormi quantità di rifiuti necessitino di nuova destinazione. Attualmente buona parte di questi scarti, come la testa, la pelle, le lische e la coda vengono prevalentemente gettati in mare, e ciò comporta una perdita, nell'ottica della blue economy, di un'importante risorsa per l'estrazione di Omega-3 [114].

2.4.2 Benefici apportati dal consumo di Omega-3

Gli acidi grassi sono fondamentali per la nutrizione, poiché forniscono energia agli esseri viventi e costituiscono componenti strutturali delle cellule. Studi condotti in diverse nazioni hanno evidenziato i molteplici benefici degli acidi grassi Omega-3 per la salute, tra cui proprietà

antinfiammatorie, antitrombotiche, antiaritmiche, e capacità di ridurre i livelli di lipidi nel sangue e di vasodilatazione. Queste ricerche hanno contribuito a riconoscere l'importanza degli Omega-3 nel promuovere la salute cardiovascolare e il benessere generale [112].

Le raccomandazioni dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) hanno sottolineato l'importanza cruciale degli acidi grassi Omega-3 e Omega-6 nella dieta umana. Essi sono essenziali per la formazione delle membrane cellulari e servono da precursori per gli eicosanoidi, come l'acido arachidonico, che sono composti biologicamente attivi coinvolti in molteplici processi fisiologici [115].

Secondo le linee guida della FAO, è fondamentale mantenere un bilancio adeguato tra gli acidi grassi Omega-6 e Omega-3 nella dieta, preferibilmente con un rapporto di 5:1 o 10:1. In caso di squilibrio, si consiglia di aumentare il consumo di alimenti ricchi di Omega-3, come verdure a foglia verde, legumi, pesce e frutti di mare. Seguendo tali indicazioni e garantendo un'assunzione equilibrata di Omega-3 e Omega-6, è possibile favorire la salute e il benessere complessivo [116].

Consumare regolarmente pesce due volte a settimana dovrebbe fornire l'appropriato apporto di acidi grassi polinsaturi a catena lunga Omega-3, ma qualora questo non fosse possibile è fortemente consigliata l'assunzione di integratori a base di olio di pesce per l'equivalente di 2 g più volte a settimana [114], la dose giornaliera di acidi eicosapentaenoico (EPA) e docosaesaenoico (DHA) consigliata dall'European Food Safety Authority è di 250 mg [117]. Gli Omega-3 sono acidi grassi polinsaturi essenziali per la salute umana, con una vasta gamma di benefici per il corpo e la mente. Questi acidi grassi sono

suddivisi in tre principali tipi: acido alfa-linolenico (ALA), acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA). Mentre l'ALA può essere trovato in alimenti vegetali come semi di lino e semi di chia, EPA e DHA sono più abbondanti nei pesci grassi e nelle alghe marine. Gli oli possono avere diverse composizioni in base al tipo di pesce da cui provengono, tuttavia la maggior parte viene considerata una generosa fonte alimentare di Omega-3, aEPA e DHA. Gli acidi grassi Omega -3, chiamati anche acidi grassi n-3 o acidi grassi ω -3, sono un gruppo eterogeneo di acidi grassi con un doppio legame tra il terzo e il quarto atomo di carbonio dalla fine del metile (dall'atomo di carbonio ω -1). Si possono distinguere acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA), i primi possiedono un doppio legame della catena di carbonio, mentre i secondi ne possiedono più di uno. Gli acidi grassi possono essere suddivisi sulla base della lunghezza della catena di carbonio in: acidi grassi a catena corta (SCFA o VFA), a catena media (MCFA), a catena lunga (LCFA) o a catena molto lunga (VLCFA).

Tra i benefici più importanti ricondotti all'uso di olio di pesce è indubbiamente da citare il benessere cardiovascolare: diversi studi in letteratura riportano che l'assunzione di Omega-3 favorisce notevolmente la riduzione di ictus, infarto miocardico e altre patologie legate al cuore. I due acidi sopracitati favoriscono il benessere dell'individuo principalmente attraverso l'arricchimento di fosfolipidi; questi favoriscono la riduzione della pressione sanguigna e delle aritmie e il miglioramento delle funzioni arteriose. Si ritiene che una carenza di Omega-3 nella dieta possa causare fino a 96.000 morti all'anno [80]. Questi acidi grassi possono migliorare la salute del cuore riducendo i livelli di trigliceridi nel sangue, riducendo l'infiammazione sistemica nel corpo. Inoltre, l'assunzione di Omega-3 è associata a una maggiore

sensibilità all'insulina e alla riduzione del rischio di sviluppare il diabete di tipo 2 [118], [119].

Gli Omega-3, in particolare il DHA, sono essenziali per lo sviluppo e il mantenimento della salute del cervello e della funzione cognitiva. Il DHA è un componente chiave delle membrane cellulari del cervello e svolge un ruolo critico nella trasmissione dei segnali neuronali. Il consumo di Omega-3 può migliorare la memoria, la concentrazione e ridurre il rischio di declino cognitivo legato all'invecchiamento [120].

Il consumo di Omega-3 è stato associato a una riduzione del rischio di depressione, ansia e altri disturbi dell'umore. Questi acidi grassi possono influenzare la produzione di neurotrasmettitori nel cervello, come la serotonina, che sono coinvolti nella regolazione dell'umore e delle emozioni. Integrare gli Omega-3 nella dieta può aiutare a migliorare l'umore e la stabilità emotiva [121].

L'integrazione della propria dieta con Omega-3 comporta, dunque, svariati vantaggi per la salute, tra questi è possibile citare anche il miglioramento di disturbi infiammatori come asma, eczema, psoriasi e morbo di Crohn; non solo, gli acidi eicosapentaenoico e docosaesaenoico svolgono importanti funzioni durante gli ultimi mesi di gravidanza, soprattutto per quanto riguarda lo sviluppo dei tessuti cerebrali del nascituro [122].

2.4.3 Estrazione convenzionale dell'olio di pesce per la produzione di Omega-3

L'estrazione di olio di pesce viene effettuata impiegando principalmente due tecniche, la pressatura idraulica e l'estrazione a caldo. La pressatura idraulica è un metodo che sfrutta la forza meccanica per comprimere la materia prima, separando l'olio dagli altri componenti solidi. I pesci interi o i residui della lavorazione del pesce (come teste, viscere e lische) vengono raccolti e macinati per aumentare la superficie di contatto, inoltre vengono riscaldati per rendere l'olio più fluido e facilitare la sua estrazione. Successivamente essi vengono inseriti in una pressa idraulica che applica una forza elevata, comprimendo il materiale e separando l'olio dai solidi. L'olio estratto viene raccolto e filtrato per rimuovere eventuali impurità e residui solidi. Tale processo è relativamente semplice e non richiede attrezzature molto sofisticate. Tuttavia, questo metodo non è particolarmente adatto in quanto la qualità dell'olio è inferiore rispetto ad altri metodi di estrazione, poiché la pressatura può non rimuovere completamente tutte le impurità. L'estrazione può essere meno efficiente rispetto ad altri metodi, con una resa di olio inferiore. Un ulteriore metodo estrattivo è l'estrazione a caldo; similmente alla pressatura, la materia prima viene collezionata e macinata, successivamente viene riscaldata a temperature elevate in modo tale che il calore faccia separare l'olio dai tessuti del pesce. Una volta separato, l'olio viene raccolto mediante decantazione e filtrato per rimuovere eventuali impurità. Questo metodo è più efficiente rispetto alla pressatura idraulica, con rese di olio maggiori e tempi di estrazione ridotti. Tuttavia, le alte temperature possono compromettere la qualità dell'olio in quanto vanno a degradare i composti sensibili al calore

infiandone le qualità nutrizionali. Inoltre, il processo è ritenuto energivoro proprio a causa dell'impiego di alte temperature operative.

Per garantire un prodotto finale pronto al consumo, al termine della fase di filtrazione, si susseguono ulteriori processi comuni a tutti i metodi estrattivi che prevedono l'estrazione molecolare degli acidi grassi Omega-3 (EPA e DHA) mediante l'evaporazione selettiva dei componenti e la stabilizzazione dell'olio, per prevenirne l'ossidazione e la degradazione del prodotto. Il confezionamento è principalmente effettuato sotto forma di capsule, bottiglie o altri formati idonei al consumo umano.

Entrambi i metodi hanno storicamente giocato un ruolo cruciale nell'estrazione di oli dai pesci, ma presentano limitazioni significative in termini di qualità del prodotto e impatto ambientale. Per migliorare la qualità e l'efficienza della produzione di Omega-3, sono stati sviluppati metodi più avanzati come l'estrazione con fluidi supercritici, l'estrazione assistita da microonde, l'estrazione enzimatica o l'estrazione a freddo tramite l'impiego di solventi. Questi metodi moderni offrono vantaggi significativi, come una maggiore resa di olio, una qualità superiore del prodotto finale e un minore impatto ambientale [123].

2.4.4 Alternative Green per l'estrazione di olio di pesce

I limiti dei processi convenzionali hanno spinto la ricerca a promuovere alternative più sostenibili per l'estrazione dell'olio di pesce. Metodi nuovi come l'estrazione con fluidi supercritici, l'estrazione enzimatica, l'estrazione assistita da microonde e l'estrazione assistita da ultrasuoni

sono stati proposti come alternative green e più rispettose dell'ambiente.

2.4.4.1 Estrazione con fluidi supercritici

L'estrazione con fluidi supercritici, principalmente utilizzando CO₂, è una tecnica avanzata utilizzata per ottenere prodotti ad alto valore aggiunto dai tessuti animali e vegetali, inclusi pesci e loro sottoprodotti. I principali vantaggi associati a questa tecnologia risiedono nella rapidità di estrazione e separazione, nell'impiego di basse temperature e nell'assenza di solventi tossici e dannosi. L'impiego di CO₂ in tale processo è favorito dalla sua disponibilità a basso costo e dalla sua intrinseca sicurezza (non infiammabile, non tossico). Tuttavia, la bassa polarità della CO₂ può limitare l'estrazione di composti polari, rendendo necessario il pretrattamento della biomassa del pesce per ridurre l'umidità al di sotto del 20% [113].

2.4.4.2 Estrazione assistita da microonde

L'estrazione assistita da microonde utilizza le microonde per riscaldare i solventi in contatto con la matrice solida, permettendo l'estrazione dei componenti dalla soluzione del campione. Il riscaldamento selettivo delle microonde, che disperde molto poco calore nell'ambiente circostante, colpisce principalmente solventi e materiali polari. Quando applicato a campioni di biomassa, riduce l'umidità, generando una pressione significativa che rompe le membrane cellulari, rilasciando i materiali contenuti nelle cellule. Questo metodo compete con quelli tradizionali grazie a tassi di estrazione più elevati e temperature basse. Tuttavia, il calore generato durante il processo può ossidare gli acidi grassi presenti nel campione, pertanto, nonostante sia un metodo promettente, esso è ancora in fase di sviluppo [124].

2.4.4.3 Estrazione Assistita da Ultrasuoni

L'impiego di ultrasuoni come metodo estrattivo si basa sulla cavitazione acustica e l'impatto meccanico. La cavitazione acustica rompe la parete cellulare, facilitando la penetrazione del solvente nel materiale e consentendo il rilascio dei prodotti cellulari. L'impatto meccanico degli ultrasuoni aumenta la superficie di contatto tra il solvente e i composti estraibili. Questo metodo richiede meno tempo di estrazione e un consumo ridotto di solventi, e può essere eseguito a basse temperature, riducendo così i danni termici e minimizzando la perdita di sostanze bioattive [125].

2.4.4.4 Idrolisi Enzimatica

L'idrolisi enzimatica è considerata un metodo promettente per l'estrazione sostenibile, sebbene presenti alcune questioni da discutere. Gli enzimi e il pesce impiegati devono essere di alta qualità e, nel caso di enzimi di origine microbica, non devono essere patogeni. Prima dell'estrazione, è necessario disattivare gli enzimi esogeni riscaldando il campione a circa 80-90 °C e regolando il pH. Il rendimento del recupero dell'olio dipende da vari fattori, tra cui il tipo di proteasi utilizzata, la sua attività, concentrazione, pH, temperatura e dimensione delle particelle. Il vantaggio ottenuto rispetto all'estrazione termica risiede in un'efficienza di estrazione maggiore [126].

2.5 Nuovo approccio per l'estrazione dell'olio di pesce

Le acciughe sono tra i pesci più pescati al mondo, una realtà che porta benefici economici significativi ma pone anche gravi preoccupazioni per la sostenibilità delle loro popolazioni. Esse sono una fonte primaria di acidi grassi Omega-3 e rappresentano una parte importante della dieta umana e del mangime per pesci d'acquacoltura. Nel processo convenzionale di estrazione di olio di pesce per la produzione di Omega-3 dalle acciughe, esse vengono inizialmente cotte e pressate direttamente a bordo della nave da pesca. La miscela risultante di acqua e olio viene successivamente trasportata a impianti industriali per ulteriori lavorazioni. Durante queste lavorazioni, la miscela subisce una serie di processi per eliminare l'acqua. Infine, l'olio viene raffinato e stoccato per essere adatto al consumo umano.

La pesca intensiva delle acciughe ha sollevato questioni riguardanti l'impatto ecologico e la sostenibilità a lungo termine di questa pratica. La domanda elevata e continua per l'industria alimentare e per la produzione di mangimi per pesci ha portato a un aumento significativo della pressione sulle popolazioni di acciughe. Questo può portare a un declino delle popolazioni, compromettendo la loro capacità di riprodursi e sostenere i livelli di pesca attuali, ed inoltre causare un'alterazione dell'intero ecosistema, mettendo a rischio la biodiversità [127]. Ad esempio, la sovrapesca in Perù ha portato il governo a sospendere una delle due stagioni di pesca annuali nel 2014 e a implementare quote di pesca nel 2017 per proteggere le popolazioni di acciughe, nonostante il Perù sia uno dei maggiori produttori mondiali di acciughe, utilizzate principalmente per la produzione di farina di pesce [128]. Anche nel

Mediterraneo le popolazioni di acciughe sono sottoposte a pressioni significative. Le misure di conservazione e le regolamentazioni variano tra i diversi paesi del bacino, complicando la gestione sostenibile delle risorse.

In questo contesto, la necessità di trovare nuove matrici per la produzione di acidi grassi Omega-3 diventa evidente. Ciriminna et al. [114] hanno proposto un nuovo metodo di estrazione di olio di pesce dagli scarti di acciughe, che non impiega calore bensì un solvente di origine green, il d-Limonene.

La procedura proposta da Ciriminna et al. è di seguito riportata (Figura 16).

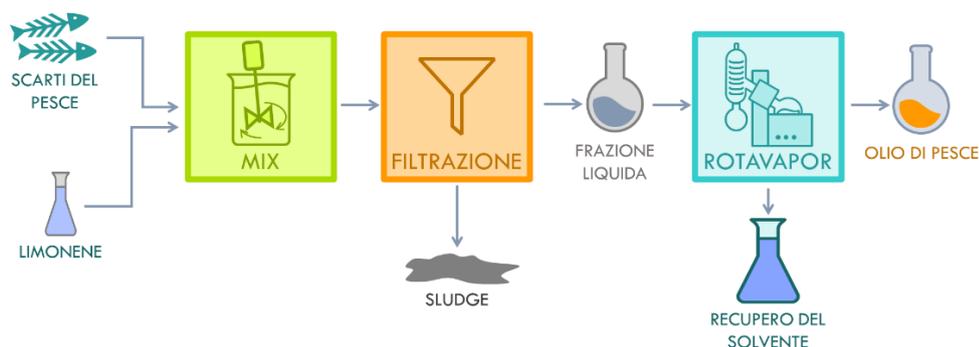


Figura 16 Rappresentazione schematica del processo di estrazione dell'olio di pesce

Gli scarti delle acciughe vengono lavati e asciugati per rimuovere i residui, quindi uniti a una prima aliquota di d-Limonene e conservati per 24 ore in congelatore. Successivamente, viene aggiunta un'ulteriore aliquota di d-Limonene e il composto viene frullato, ottenendo una purea semisolido grigia. Questa purea viene agitata meccanicamente in un becher dotato di agitatore magnetico, a 700 rpm per 24 ore, con un'ultima aliquota di d-Limonene, per un rapporto totale tra scarti di acciughe e d-Limonene pari a 1:2. Al termine di questa fase, il surnatante

viene separato dal residuo solido e filtrato. La fase liquida che ne deriva viene trasferita al pallone di un evaporatore rotante dotato di una pompa a vuoto, dove il solvente viene rimosso sottovuoto (40 mbar) a una temperatura di 90°C. Il d-Limonene puro viene recuperato tramite evaporazione sottovuoto ed è pronto per essere riutilizzato in successive estrazioni. Dopo il processo di evaporazione, si ottengono circa 3,0 g di olio di pesce, di colore arancione [95], [114].

La fase semisolido, un composto grigiastro formato da residui di pesce e ancora ricco di d-Limonene, rappresenta uno scarto del processo, il quale necessita ulteriore valorizzazione.

2.6 Scarti del pesce come fertilizzanti

L'utilizzo dei rifiuti organici come ammendanti dei terreni è una pratica antica che, tuttavia, sta guadagnando sempre più attenzione. Essi, infatti hanno il grande vantaggio di poter essere lavorati e impiegati localmente, riducendo i costi di produzione e trasporto, in confronto agli equivalenti chimici.

I fertilizzanti chimici, solitamente venduti sotto forma di miscele in polvere contenenti nitrati, fosfati e sali di potassio, sono utilizzati globalmente per massimizzare i raccolti agricoli. Tuttavia, l'uso di questi fertilizzanti comporta una serie di problemi ambientali e sanitari. Tra questi vi sono l'accumulo di acidi inorganici e inquinanti organici nel suolo e nelle falde acquifere e la diminuzione del contenuto di carbonio organico nei terreni agricoli. Oltre ai problemi ambientali e sanitari, i fertilizzanti chimici presentano costi elevati e in continuo aumento, rendendoli insostenibili dal punto di vista economico per molti agricoltori. Di conseguenza, c'è una crescente richiesta di alternative che

siano altamente efficaci ed economicamente vantaggiose. Unendo questo sviluppo a una maggiore partecipazione delle organizzazioni di agricoltori e a miglioramenti nelle politiche agricole, la disponibilità di fertilizzanti organici efficaci potrebbe incentivare gli agricoltori a passare dalle pratiche di fertilizzazione chimica a quelle organiche. Tuttavia, un ostacolo significativo all'adozione di fertilizzanti organici è la loro bassa efficacia, poiché i loro effetti sui raccolti sono spesso lenti e variabili. Per affrontare queste problematiche, la ricerca si sta concentrando sullo sviluppo di fertilizzanti di natura organica con prestazioni elevate, offrendo così un'alternativa più sostenibile ai fertilizzanti chimici.

Questi scarti possono essere trasformati in compost o altri ammendanti o altri fertilizzanti organici che migliorano la struttura del suolo, aumentando la capacità di ritenzione idrica e la porosità, che favoriscono la crescita delle radici, inoltre a seconda della composizione essa può rappresentare una riserva di nutrienti per le piante.

Un ulteriore vantaggio dell'impiego di scarti organici risiede nel ridotto volume di rifiuti da smaltire in altri modi, in pieno accordo con i concetti cardine dell'economia circolare. Tuttavia, a seconda della loro natura essi hanno una composizione molto variabile, che influenza il contenuto di nutrienti disponibili; inoltre, la presenza di contaminanti può comprometterne l'impiego in agricoltura; pertanto, il prodotto finale deve essere verificato con particolare cura.

L'impiego degli scarti della filiera ittica come fertilizzanti rappresenta una pratica sostenibile e innovativa per valorizzare materiali che altrimenti verrebbero considerati rifiuti. Questa pratica non solo riduce

i costi di smaltimento per le aziende di trasformazione del pesce, ma offre anche un'alternativa ecologica ai fertilizzanti chimici tradizionali.

Uno dei metodi più comuni per trasformare gli scarti della filiera ittica in fertilizzanti, come già detto, è il compostaggio, un processo di decomposizione biologica aerobica, cioè che richiede ossigeno, in cui la materia organica viene trasformata in un prodotto stabile e simile all'humus. Durante il compostaggio, i microrganismi, come attinomiceti, batteri e funghi, decompongono i materiali organici, come scarti di cucina, foglie, e rifiuti verdi, producendo calore, anidride carbonica, e acqua come sottoprodotti. Un fattore cruciale di questo processo è il rapporto carbonio/azoto (C/N) esso si riferisce alla quantità di carbonio rispetto all'azoto presente nei materiali da compostare. Un rapporto C/N adeguato è essenziale per mantenere l'attività microbica e garantire una decomposizione efficiente. Nel processo di compostaggio il rapporto ideale è circa 25-30:1 [129]. Questo rapporto fornisce un equilibrio che favorisce la crescita dei microrganismi senza causare eccessive perdite di azoto sotto forma di ammoniaca. L'aggiunta di rifiuti del pesce (naturalmente ricchi di azoto) a substrati particolarmente carboniosi, può portare alla produzione di compost di alta qualità, raggiungendo un adeguato rapporto C/N. Inoltre, gli scarti di pesce sono particolarmente adatti per il compostaggio anche grazie al loro elevato contenuto di fosforo, calcio ed altri nutrienti, elementi essenziali per la crescita delle piante. In tal caso è però necessario effettuare frequenti operazioni di rivoltamento nei sistemi a cumuli periodicamente rivoltati, ovvero effettuare una miscelazione ottimale e adeguata nei sistemi a cumuli statici aerati.

La farina di pesce, ottenuta dalla lavorazione degli scarti di pesce, è un'altra forma di fertilizzante organico. Questo prodotto è

particolarmente ricco di azoto e può essere utilizzato direttamente nei terreni agricoli o come componente di miscele di compost, ove non utilizzabile per l'alimentazione umana o animale. Essa contiene circa il 10% di minerali, particolarmente ricchi di calcio e fosforo [130].

Un'ulteriore alternativa per l'impiego di scarti, rifiuti e sottoprodotti della filiera ittica come fertilizzanti organici è il loro uso come substrato in digestione anaerobica. Tale opzione permette di produrre biometano, combustibile di origine naturale, e successivamente impiegare il digestato come ammendante dei terreni, il quale conserva parte delle caratteristiche che danno valore agli scarti del pesce.

La composizione del pesce in termini di macronutrienti varia a seconda della specie, e della parte del pesce. Tuttavia, in generale, i pesci sono una fonte eccellente di proteine di alta qualità e una quantità variabile di minerali.

Le ossa di pesce sono principalmente ricche di minerali come calcio e fosforo, nonché di proteine del collagene. Il tessuto osseo è composto principalmente da una matrice extracellulare organica ricoperta di idrossiapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}_2$) [99]. Quando l'apporto dietetico di calcio e fosforo non è sufficiente, questi minerali possono essere trasferiti dalle ossa ai tessuti molli. Circa il 10-15% della biomassa totale del pesce è costituita da ossa della testa e delle vertebre.

Le lisce di pesce rappresentano una parte significativa dei residui dell'industria della filettatura, e un migliore utilizzo di questa materia prima è di grande interesse scientifico. I minerali ossei e le proteine della matrice ossea hanno un rilevante interesse nel settore agricolo.

Il pesce è una fonte ricca di proteine complete, che contengono tutti gli amminoacidi essenziali necessari per il corpo umano. Le proteine rappresentano circa il 15-25% del peso del pesce, a seconda della specie. Le proteine del pesce sono facilmente digeribili e bio-disponibili. Inoltre, gli scarti del pesce sono ricchi di macronutrienti richiesti dalle piante, in Tabella 7 sono riportati valori di macronutrienti contenuti negli scarti di alcune specie di pesce.

Tabella 7 Composizione dei macronutrienti di vari rifiuti ittici [104]

Scarti di pesce	Azoto [% _{TS}]	Fosforo [g/kg _{TS}]	Potassio [g/kg _{TS}]	Calcio [g/kg _{TS}]	Magnesio [g/kg _{TS}]
Lische di merluzzo	6,21	123	0,006	206	3,3
Lische di salmone	4,92	85	0,009	142	2,3
Ossa di trota	5,31	92	0,008	155	2,5
Lische essiccate	5,04	120	1,7	300	3,8
Ossa di tonno	5,01	11,03	-	153,93	-

Radziemska et al. [131] hanno studiato l'effetto di compost prodotto da rifiuti del pesce e corteccia di pino sulla resa e la composizione macro e microelementare della lattuga (*Lactuca sativa* L.). Sono stati inoltre effettuati test di fitotossicità sulla senape bianca (*Sinapis alba* L.) dai quali si è evidenziato che tale compost era maturo, stabile e non fitotossico. Inoltre, l'uso del compost ha causato un aumento significativo della resa di materia fresca e secca delle foglie di lattuga. Il

contenuto di nutrienti come azoto, fosforo, potassio, sodio, calcio e magnesio nelle foglie della lattuga è aumentato. Pertanto, il compost derivato dai rifiuti di pesce si è dimostrato un fertilizzante efficace e sostenibile, capace di aumentare i contenuti di macro e microelementi essenziali nelle piante, rendendolo una valida alternativa ai fertilizzanti chimici tradizionali.

Un'ulteriore ricerca ha valutato l'efficacia del compost derivato da scarti di pesce e alghe marine come fertilizzante per i pomodori coltivati in serra e successivamente esaminato l'effetto fertilizzante residuo del compost su una coltura di lattuga coltivata subito dopo la raccolta dei pomodori, senza ulteriori aggiunte di fertilizzante. I risultati hanno evidenziato una resa dei pomodori maggiore, con piante e frutti più grandi (diametro e peso) rispetto ad altri concimi e al controllo. Inoltre, l'effetto fertilizzante residuo ha migliorato anche le rese nel test della lattuga [132].

In generale, il compost prodotto da scarti del pesce e materiale ad alto contenuto di carbonio (segatura, trucioli di legno, corteccia, ecc.) ha riscosso molto successo grazie ai promettenti risultati ottenuti [129].

Una promettente ricerca sulla valorizzazione delle acciughe ha impiegato il residuo solido ottenuto dall'estrazione di olio di pesce come fertilizzante organico per la cipolla rossa di Tropea (*Allium cepa*) [133]. Il compost, denominato AnchoisFert, è stato confrontato con fertilizzanti chimici (NPK) e organici (letame di cavallo) comunemente utilizzati. Il terreno trattato con AnchoisFert ha mostrato il più alto contenuto di fenoli totali, carbonio (3,59%), azoto (0,26%) e un contenuto di sostanza organica del 6,19%. Inoltre, è stato evidenziato un miglioramento dell'attività microbica totale. Le piante fertilizzate con

AnchoisFert hanno mostrato un aumento significativo del peso dei bulbi (65%) e del diametro (133%) rispetto ai fertilizzanti chimici e organici tradizionali. L'interessante novità di questo studio risiede nel fatto che gli scarti non sono stati impiegati tal quali, bensì provengono da un processo di bioraffinazione per l'estrazione di olio di pesce. Questa scoperta non solo completa il ciclo dei materiali per la pesca delle acciughe, ma migliora notevolmente la sostenibilità sia della pesca delle acciughe che dell'agricoltura.

Anche il digestato proveniente da co-digestione anaerobica di rifiuti della filiera ittica ha mostrato elevato interesse in campo scientifico. Studi recenti hanno esplorato la co-digestione con vari materiali, come letame di mucca e bovino, residui di fragole, polpa di sisal, bambù e rifiuti mercatali [134]. Ad esempio, la co-digestione di rifiuti della filiera ittica con scarti di fragole ha prodotto un digestato ricco di nutrienti [135]. Questi studi e innovazioni mostrano come la digestione anaerobica possa essere una soluzione efficace per trasformare i rifiuti di pesce in risorse utili per l'agricoltura sostenibile e contribuire alla piena circolarità delle filiere.

2.7 Valorizzazione degli scarti di tonno: potenzialità e sostenibilità nella filiera ittica

La valorizzazione degli scarti del pesce è strettamente correlata alle filiere che lo trattano. Sebbene numerosi studi si concentrino sulla lavorazione dei rifiuti di pesci di piccola taglia, è allo stesso modo interessante valutare processi di bioraffinazione applicabili a pesci di taglia maggiore, che sono spesso di grande interesse commerciale. Il presente lavoro di tesi si è concentrato sulla valorizzazione degli scarti della filiera di lavorazione del tonno.

Il tonno è un pesce pelagico appartenente alla famiglia degli Scombridae, molto apprezzato per la sua carne ricca di proteine e acidi grassi Omega-3. Con oltre 48 specie, i tonni popolano gli oceani Atlantico, Indiano, Pacifico e il Mar Mediterraneo. Le specie più comunemente consumate includono il tonno pinna gialla (*Thunnus albacares*), il tonno rosso (*Thunnus thynnus*), e il tonno obeso (*Thunnus obesus*).

Secondo la FAO [82], la produzione globale di tonno è aumentata significativamente negli ultimi decenni, con una stima di oltre 7 milioni di tonnellate all'anno. I maggiori esportatori di tonno includono paesi come la Spagna, il Giappone e gli Stati Uniti, mentre i principali importatori sono gli Stati Uniti, l'Unione Europea e il Giappone. Nel 2018 sono state catturate circa 5,2 milioni di tonnellate di tonno e almeno tre quarti di tutto il tonno sbarcato è stato inscatolato. La Thailandia è il paese leader nella lavorazione del tonno, mentre i maggiori consumatori tra i paesi europei sono Spagna, Italia, Francia, Regno Unito e Portogallo [136].

Una delle principali preoccupazioni legata all'incremento del consumo di tonno è la sovrapesca, che ha portato a una diminuzione delle popolazioni di alcune specie, come il tonno rosso. A tal proposito l'ICCAT (International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas), un'organizzazione intergovernativa responsabile della conservazione delle risorse di tonno e delle specie affini nell'Oceano Atlantico e nei mari adiacenti, gestisce e regola la pesca di tonno attraverso l'implementazione di quote di pesca e altre misure di gestione per garantire la sostenibilità a lungo termine delle popolazioni di tonno [137]. Le quote di pesca vengono stabilite sulla base di valutazioni scientifiche delle popolazioni di tonno, che tengono conto della

biomassa attuale, della mortalità per pesca e delle tendenze di reclutamento delle diverse specie di tonno.

Il tonno è un alimento prezioso sia dal punto di vista nutrizionale che culturale. Tuttavia, la sua gestione sostenibile è essenziale per garantire la disponibilità di questa risorsa per le future generazioni, affrontando le problematiche di sovrapesca, cattura indesiderata e contaminazione.

Il tonno è comunemente trasformato sia come carne cruda, sia come alimento in scatola. Tuttavia, durante il processo di inscatolamento, solo circa un terzo del pesce intero viene utilizzato, generando fino al 70% di scarti solidi dal materiale ittico originale [136]. Questi comprendono muscoli (dopo la rimozione dei lombi), visceri, branchie, carne/muscoli scuri, testa, ossa e pelle.

Tradizionalmente, i sottoprodotti dell'industria del tonno, ricchi di proteine, vengono trasformati in prodotti a basso valore commerciale, come farina di pesce e fertilizzanti. Tuttavia, esistono potenziali utilizzi alternativi più promettenti per questi sottoprodotti, tra cui l'integrazione in alimenti per il consumo umano e animale.

I sottoprodotti del tonno possono essere idrolizzati per ottenere peptidi bioattivi, composti che hanno mostrato benefici per la salute, tra cui proprietà antiossidanti, antipertensive e antimicrobiche. Questi peptidi possono essere utilizzati in vari prodotti alimentari e farmaceutici, offrendo una nuova fonte di reddito per l'industria della pesca.

Un interessante studio ha valutato l'estrazione di olio di tonno mediante idrolisi enzimatica [136], utilizzando l'enzima commerciale Alcalase. Tuttavia il processo non è efficiente in termini di sostenibilità ambientale, a causa del costo energetico e ai tempi di idrolisi.

Il presente lavoro di tesi propone un'alternativa per la valorizzazione integrale degli scarti della filiera ittica del tonno, al fine di produrre olio di pesce, fertilizzanti organici e biometano.

3 DIGESTIONE ANAEROBICA

La digestione anaerobica è un processo biologico naturale che prevede la degradazione di sostanza organica in elementi più semplici da parte di alcune popolazioni di microrganismi che, in assenza di ossigeno, producono una miscela di composti, la quale prende il nome di biogas [138]. Complessi microbici altamente specializzati coinvolti nel processo biologico convertono il carbonio (C) principalmente in metano (CH_4) e anidride carbonica (CO_2) e sono legati tra loro da un rapporto di sintrofismo, il quale determina la formazione di una catena trofica [139]. La catena trofica è composta da diverse fasi, nelle quali il prodotto derivato dal metabolismo dell'una diviene substrato della sua successiva; le fasi, tuttavia, non si susseguono l'una all'altra, bensì avvengono in maniera simultanea, in quanto substrati di diversa complessità coesistono all'interno dell'ecosistema anaerobico. Le condizioni caratteristiche della digestione anaerobica fanno in modo che si abbia un'elevata specializzazione dei consorzi di microrganismi che costituiscono la popolazione microbiologica, inoltre l'attività di batteri e archaea è legata ad equilibri labili e complessi, pertanto è necessario attenzionare le svariate variabili che compongono il processo [140].

Il processo di digestione anaerobica è presente in natura, ma acquisisce interesse in ambito tecnologico grazie ai vantaggi che essa comporta nell'ottica dell'economia circolare; ingegnerizzando il processo è infatti possibile produrre biogas tramite la digestione di matrice organica; la miscela di gas ottenuta, formata da metano (50-75%), anidride carbonica (35-40%) ed altri gas in tracce, come ad esempio acido

solfidrico, ammoniacale, azoto etc., ha un elevato potere calorifero inferiore (20-30 MJ/Nm³ a seconda della composizione) [141], pertanto può essere utilizzata, dopo aver subito alcuni trattamenti di purificazione, come combustibile per sostituire quelli tradizionali di origine fossile; per tale motivo esso viene considerato una fonte rinnovabile di energia. Inoltre, l'output della digestione anaerobica, che viene definito digestato, con semplici ulteriori trattamenti, può essere utilizzato direttamente come ammendante dei terreni o compostato.

È possibile ricreare all'interno di un reattore (digestore) le condizioni affinché avvenga la degradazione anaerobica: essa comprende una serie di reazioni che avvengono sequenzialmente e simultaneamente, in funzione della complessità del substrato presente. Queste reazioni sono svolte da diversi ceppi di batteri e archaea, tra i quali si possono citare: idrolitici, fermentativi, acetogeni, metanigeni, etc. Il processo può essere schematizzato mediante le quattro fasi principali che compongono la catena trofica: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi, metanogenesi. Gli impianti di digestione anaerobica possono essere suddivisi in base a regime di temperatura, percentuale di solidi contenuti nel carico e tipologia di alimentazione (continua o discontinua). Impianti che lavorano a temperature che si aggirano tra 30 e 35 °C vengono definiti mesofili, mentre invece prendono il nome di termofili quando la temperatura operativa si mantiene tra 55-60 °C [142]; i processi possono inoltre essere suddivisi in wet (tenore di solidi nel reattore fino al 10%), semi-dry (solidi 15-20%) e dry (solidi >20% fino al 40%).

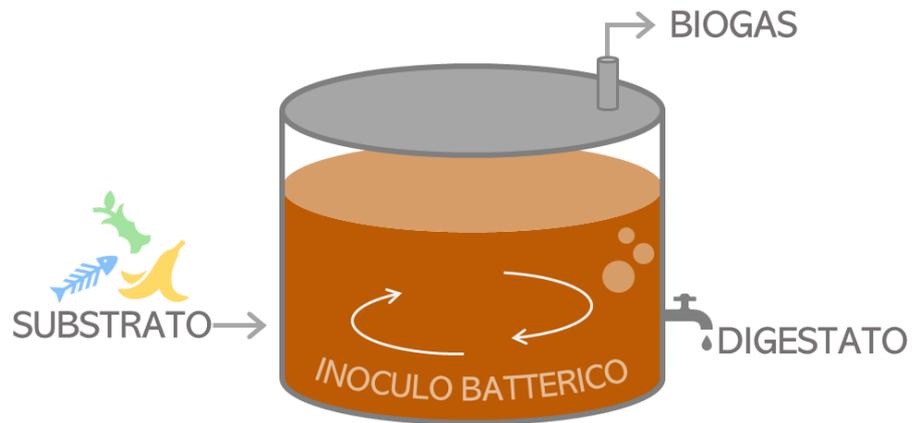


Figura 17 Flussi di input e output in un reattore di digestione anaerobica

3.1 Fasi della digestione anaerobica

Il processo di digestione anaerobica può essere suddiviso in diverse fasi, le quali sono governate da reazioni biochimiche svolte da specifiche popolazioni microbiche. In Figura 18 è riportata la schematizzazione del meccanismo sintrofico della digestione anaerobica.

Le fasi in cui può essere suddiviso il processo di digestione anaerobica sono idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi.

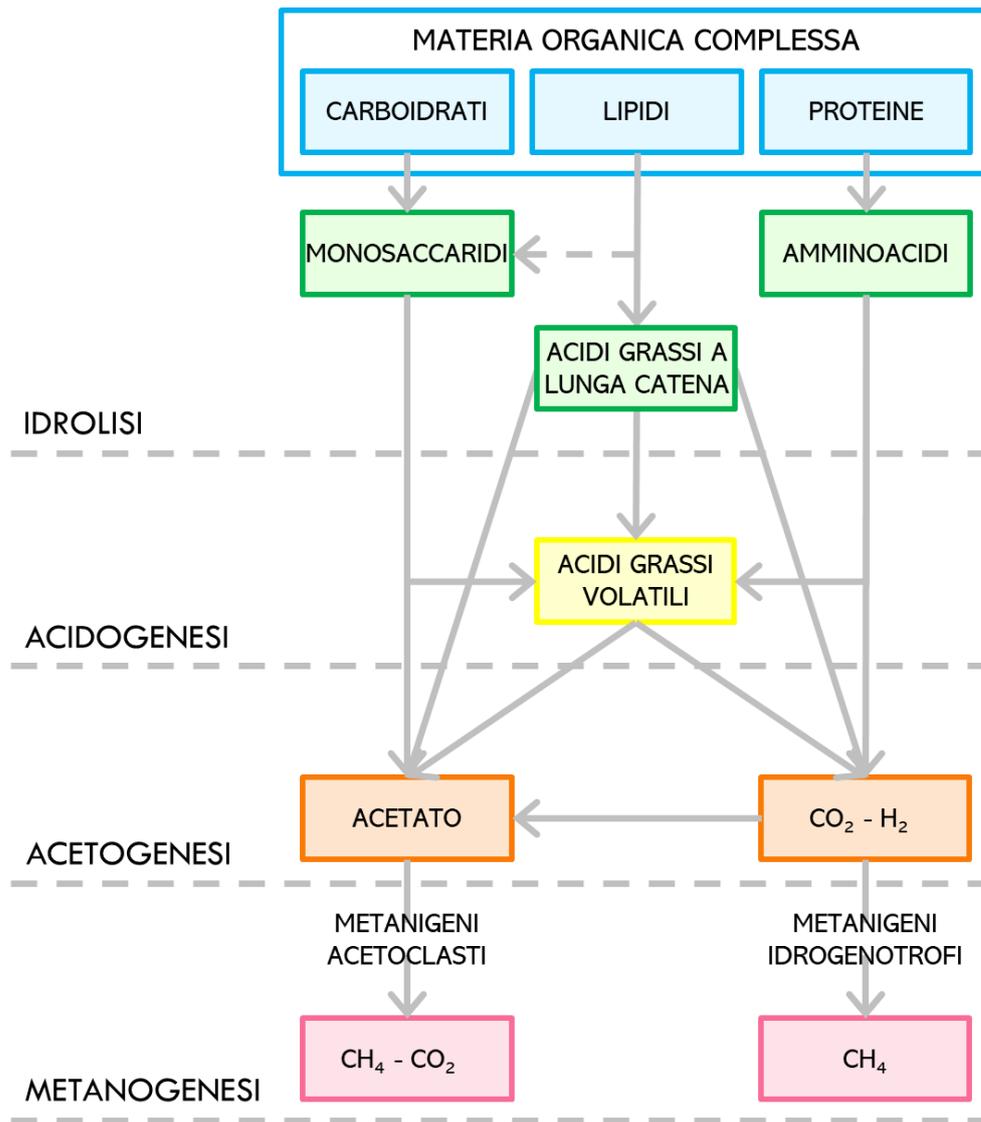


Figura 18 Rappresentazione semplificata del processo di digestione anaerobica [140]

Nella prima fase del processo di digestione anaerobica avviene la depolimerizzazione della materia organica. Durante l'idrolisi, substrati complessi insolubili come i polisaccaridi vengono trasformati in molecole più semplici da una vasta gamma di microrganismi idrolitici. Questi microrganismi secernono diversi enzimi idrolitici come cellulasi, xilanasi, amilasi, proteasi e lipasi [143]. Le reazioni di idrolisi avvengono in due fasi, guidate dagli enzimi extracellulari secreti da batteri anaerobi. Nella prima fase, i batteri idrolitici colonizzano la superficie dei solidi e

rilasciano enzimi che producono monomeri utilizzabili da altri batteri. Nella seconda fase, la superficie dei solidi viene degradata dai batteri a una profondità costante nel tempo [140]. L'idrolisi dei carboidrati richiede generalmente meno tempo di quella di lipidi e proteine, rispettivamente poche ore e pochi giorni. I carboidrati vengono scomposti in zuccheri semplici, mentre lipidi e proteine vengono scomposti rispettivamente in acidi grassi a catena lunga ed amminoacidi [139].

La biomassa lignocellulosica presenta una composizione chimica complessa, con tre principali componenti: la cellulosa (35-50%), l'emicellulosa (25-30%) e la lignina (15-30%) [144]. Quest'ultima, rispetto alle prime due, è scarsamente digerita anaerobicamente a causa della complessità della sua struttura. Tuttavia, essa è strettamente connessa a cellulosa ed emicellulosa, pertanto può spesso impedire l'accesso dei microorganismi idrolitici [145]. Questo può essere uno dei fattori che spesso rende l'idrolisi la fase limitante del processo di digestione anaerobica.

Una delle macromolecole più conosciute nell'ambito della digestione anaerobica è la cellulosa, in quanto largamente impiegata come substrato di controllo per i test di valutazione del massimo potenziale metanigeno di un substrato. L'equazione (1) mostra la reazione di idrolisi della cellulosa in favore della produzione di molecole di glucosio. Tale reazione è possibile, ad esempio, grazie all'enzima cellulasi secreto dal batterio idrolitico *Cellulomonas* [146].



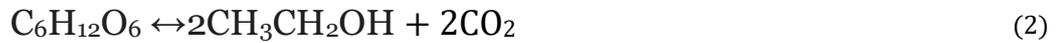
I prodotti dell'idrolisi vengono trasformati in acidi organici come acetico, propionico, butirrico e altri acidi grassi a catena corta (acidi grassi volatili) e alcoli [139] da microrganismi fermentativi come *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* [147] durante la fase di acidogenesi, che rappresenta la fase più veloce nella conversione anaerobica della materia organica complessa. Gli acidi a catena corta diverranno, in seguito, substrati per la successiva fase della catena trofica.

La concentrazione e la proporzione degli acidi grassi volatili nella fase acidogenica sono cruciali per le prestazioni complessive del processo di digestione anaerobica [148]. Se la produzione di acidi grassi volatili è eccessiva e non viene adeguatamente bilanciata, si può verificare un'acidificazione della miscela. Questo abbassamento del pH può inibire l'attività dei batteri metanigeni, che sono particolarmente sensibili alle variazioni di pH. Di conseguenza, un pH troppo basso può compromettere l'acetogenesi e la metanogenesi, riducendo l'efficacia complessiva della produzione di metano. È quindi fondamentale bilanciare attentamente le condizioni operative per garantire che la produzione di metano avvenga in modo efficiente senza inibire queste fasi cruciali del processo.

Durante la fase di acidogenesi vengono prodotti anche idrogeno, anidride carbonica e, in funzione del substrato digerito, ammoniaca [149].

Le equazioni (2), (3) e (4) rappresentano tre tipiche reazioni di acidogenesi [150]. Ad esempio, l'equazione (2) mostra la conversione del glucosio in etanolo, mentre l'equazione (3) mostra la formazione di

propionato e l'equazione (4) rappresenta la produzione di acido acetico. Questo processo porta a un abbassamento del pH del sistema, favorevole alla crescita dei batteri acidogeni e acetogeni.



Gli acidi organici prodotti durante l'acidogenesi vengono degradati durante la fase di acetogenesi da parte dei batteri acetogeni in acido acetico, idrogeno e anidride carbonica. I batteri acetogeni sono microrganismi anaerobi stretti, con un pH ottimale attorno a 6, che si trovano principalmente in habitat anossici e sono estremamente sensibili all'ossigeno [151].

I batteri acetogeni sono idrogeno-produttori obbligati e vengono inibiti dalla presenza di H_2 ; un aumento della concentrazione di idrogeno nella miscela porta all'accumulo di composti come lattato, etanolo, propionato, butirato e altri acidi volatili superiori, che non possono essere direttamente consumati dai metanigeni. I batteri acetogeni come *Syntrophomonas wolfeii* e *Syntrophobacter wolinii* degradano i composti accumulati in acetato, anidride carbonica e idrogeno. Questa transizione è cruciale per il successo della produzione di biogas, poiché crea un ambiente favorevole per i metanigeni, che consumano l'idrogeno e contribuiscono alla produzione di metano [152]. La loro attività è influenzata da quella degli archaea metanigeni che consumano idrogeno e diossido di carbonio a favore della produzione metano [31].

L'ultima fase del processo di digestione anaerobica è la metanogenesi; in essa, infatti, vengono degradati i prodotti delle fasi precedenti in CH₄ e CO₂. Il metano è un gas generato come sottoprodotto metabolico in condizioni anossiche da microrganismi noti come metanigeni, che fanno parte del regno *Archaea*.

La produzione di metano avviene principalmente in due modi: attraverso la scissione delle molecole di acido acetico, che genera anidride carbonica e metano, oppure mediante la riduzione dell'anidride carbonica con idrogeno [154]. La via metabolica più comune è la metanogenesi idrogenotrofica, dove CO₂ e H₂ vengono convertiti in metano (6). Oltre all'idrogeno, molti metanigeni possono utilizzare anche il formiato come donatore principale di elettroni.

Durante la metanogenesi idrogenotrofica, la CO₂ viene ridotta gradualmente a metano attraverso diversi stadi intermedi, grazie all'azione di specifici coenzimi come il metanofurano e la tetraidrometanopteina [155]. I batteri acetoclasti utilizzano come substrato l'acido acetico e, mediante la sua degradazione, producono metano ed anidride carbonica (6). Questi ultimi sono sensibili alla presenza di ammoniaca, la quale può inibirne la produttività



I metanigeni che consumano idrogeno crescono più rapidamente rispetto a quelli che utilizzano l'acetato come substrato. Questi ultimi sono più sensibili ai cambiamenti ambientali e preferiscono un ambiente leggermente alcalino [156].

3.2 Parametri della digestione anaerobica

La digestione anaerobica è un processo complesso che per sostenersi deve mantenere un determinato equilibrio tra le diverse popolazioni batteriche, con l'obiettivo di massimizzare la produzione di biogas e renderla stabile nel tempo. A tal fine è necessario raggiungere le condizioni di omeostasi all'interno del reattore ed attenzionare la concentrazione di metano nella miscela di biogas per assicurarsi che tutte le fasi siano bilanciate tra loro. La temperatura e le condizioni anaerobiche sono parametri attribuibili alla tipologia di impianto e devono pertanto essere demandate al corretto funzionamento del reattore.

3.2.1 Temperatura

La temperatura è un parametro fondamentale per il processo di digestione anaerobica in quanto le popolazioni batteriche sono fortemente influenzate anche da variazioni di pochi gradi centigradi; inoltre, la velocità di reazione varia insieme alla temperatura di processo [157].

I sistemi di digestione anaerobica possono essere suddivisi in tre tipici range di temperatura:

- 10 – 25°C psicrofilo;
- 32 – 42°C mesofilo;
- 48 – 55°C termofilo.

Sulla base dei diversi range di temperatura si distinguono popolazioni di microrganismi psicrofili, mesofili e termofili. La temperatura, infatti, influenza significativamente il metabolismo batterico e l'equilibrio termodinamico delle reazioni biochimiche. Drastici cambiamenti di temperatura possono compromettere irrimediabilmente le prestazioni di un reattore anaerobico e favorire lo squilibrio nella biodisponibilità dei microrganismi acidogeni e metanigeni [158]. L'ambiente psicrofilo è il meno consigliato per la digestione anaerobica in quanto è caratterizzato da reazioni biochimiche molto lente. L'ambiente mesofilo è considerato il più adeguato per i batteri metanigeni, i quali prosperano più facilmente in un ambiente attorno ai 35°C. Essi inoltre tollerano maggiormente fluttuazioni di temperatura, tuttavia superati i 45°C l'attività batterica viene totalmente compromessa [139]. Ambienti termofili favoriscono la solubilità dei composti organici e sono caratterizzati da reazioni biochimiche nelle fasi di idrolisi e acidogenesi più veloci, per tale ragione è necessario attenzionare il processo in quanto uno squilibrio tra l'attività dei batteri idrolitici e acidogeni e quella degli archaea può comportare l'acidificazione del sistema, una condizione per cui l'attività batterica è compromessa e la produzione di metano viene inibita. Inoltre, rispetto alle condizioni mesofile, le condizioni termofile sono più energivore in quanto è necessario mantenere la temperatura ad un livello più alto. Nonostante per alcuni substrati il regime termofilo comporti una produzione di metano più elevata, a causa delle complicazioni sopra elencate la maggior parte dei reattori anaerobici lavora in regime mesofilo [139].

3.2.2 pH

Il pH svolge un ruolo cruciale nella digestione anaerobica. Le reazioni biochimiche che avvengono all'interno del digestore anaerobico sono fortemente influenzate dal pH dell'ambiente. Un pH ottimale favorisce l'attività dei batteri metanigeni responsabili della produzione di metano. Tipicamente, il pH ottimale per la digestione anaerobica si mantiene tra 6,5 e 8,2, valori inferiori possono compromettere gravemente il metabolismo degli archaeobatteri, nonostante i batteri fermentativi possano operare in un range di pH più ampio (4,0 e 8,5) [159], [160].

Un pH troppo basso, cioè acido, può inibire l'attività degli archaea metanigeni e promuovere la crescita di microrganismi acidogeni, producendo acidi organici che danneggiano il processo di digestione anaerobica. D'altra parte, un pH troppo alto, cioè basico, può rallentare l'attività batterica e ridurre la produzione di metano. Pertanto, è essenziale monitorare e controllare il pH durante il funzionamento dei digestori anaerobici per garantire condizioni ottimali per la decomposizione della materia organica e la produzione di biogas. Qualora il pH raggiungesse valori critici è possibile utilizzare additivi che fungano da effetto tampone, come ad esempio $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2CO_3 , NaOH .

Il mantenimento del pH nel range sopraindicato è possibile solo se tutte le fasi del processo sono in equilibrio fra loro, un aumento della produzione di acidi organici, con contemporanea inibizione dei batteri metanigeni può comportare una riduzione drastica del pH. Per ovviare a questo inconveniente l'ambiente microbico è dotato di un sistema tampone, determinato dalla presenza di acidi deboli, acidi carbonici e ammoniaci, prodotti dai batteri stessi. Il pH in un processo di digestione

anaerobica è influenzato dalla presenza di anidride carbonica nel liquido e dalla concentrazione di ammoniaca e VFA (volatile fatty acids - acidi grassi volatili). L'equilibrio tra CO_2 e bicarbonato gioca un ruolo significativo: per pH superiori a 6,5, l'anidride carbonica forma acido carbonico che si dissocia, fornendo ioni idrogeno e bicarbonato. Il bicarbonato funge da tampone, impedendo una forte acidificazione. Inoltre, l'ammoniaca agisce come tampone, producendo ioni ammonio e rilasciando ioni idrossile a pH inferiori a 9,3 [161]. Tuttavia, quando il pH supera 8,5, prevale la forma indissociata dell'ammoniaca che è più tossica.

Le variazioni di pH si osservano quando la capacità tamponante del sistema si esaurisce. Tuttavia, nel momento in cui verifica una diminuzione critica del pH, il sistema risulta essere già compromesso; pertanto, è necessario attenzionare parametri che siano in grado di fornire informazioni sullo stato del reattore in maniera tempestiva.

3.2.3 Concentrazione di acidi grassi volatili e rapporto FOS/TAC

Durante la fase di acidogenesi vengono prodotti acidi grassi come acido acetico, butirrico, propionico e valerico, i quali saranno utilizzati come substrato dai batteri della fase successiva. Qualora questo rapporto non fosse bilanciato, potrebbe verificarsi un accumulo di tali acidi all'interno del reattore. Per tale ragione uno dei parametri fondamentali per la corretta gestione del processo di digestione anaerobica è la concentrazione di VFA nella miscela. tale parametro acquisisce ulteriore rilevanza se considerato in termini relativi, vale a dire la sua variazione nel corso del tempo all'interno del reattore. Infatti, la letteratura non è

in grado di definire un valore ottimale di VFA, in quanto esso dipende fortemente dalle caratteristiche del substrato e dall'equilibrio delle fasi all'interno del reattore. Tuttavia un aumento di tale parametro nel corso del tempo rappresenta un accumulo di acidi che non vengono adeguatamente smaltiti nelle fasi successive [162]. Esistono diversi metodi di analisi per la determinazione della concentrazione di VFA, tra cui metodi cromatografici e colorimetrici, tuttavia il metodo più diffuso è la titolazione [163].

In associazione alla concentrazione dei VFA, il rapporto FOS/TAC permette di avere informazioni tempestive sul benessere del reattore. Esso rappresenta infatti il rapporto tra gli acidi grassi presenti nel reattore (espressi in milligrammi di acido acetico su litro) e la capacità tampone della miscela (espressa in milligrammi di carbonato di calcio su litro). Valori ottimali del parametro FOS/TAC rientrano nel range 0,15 e 0,45. Valori più elevati rappresentano uno squilibrio a favore dei VFA, che può indicare la tendenza del reattore ad acidificarsi. Valori inferiori possono invece indicare una inadeguata alimentazione del reattore e un carico organico troppo basso [164].

La determinazione della concentrazione dei VFA e del parametro FOS/TAC è effettuata tramite una procedura di titolazione a diversi punti di pH su campioni di digestato precedentemente centrifugati. Il campione viene preparato centrifugando per 10 minuti a 10.000 rpm circa 35 mL in falcon da 50 ml. I materiali necessari per la procedura sono:

- pH-metro
- buretta graduata da 50 ml;
- piastra magnetica;

- becher da 50 ml;
- agitatore magnetico;
- soluzione titolante.

La procedura è di seguito riportata: 20 mL di surnatante vengono versati all'interno del becher posizionato sull'agitatore magnetico (facendo attenzione a rimuovere eventuali residui sospesi nella fase liquida), la soluzione titolante di H₂SO₄ 0,1 N viene aggiunta gradualmente mantenendo la soluzione in continua agitazione. La sonda del pHmetro è mantenuta all'interno del campione da titolare per tutta la durata della prova. Per ogni campione, viene misurato il volume di titolante necessario per raggiungere i quattro punti di pH prestabiliti: 5,0, 4,4, 4,3 e 4,0.

La concentrazione totale di VFA nel digestato è stata calcolata utilizzando una formula specifica (7) [95], che tiene conto dei volumi di titolante ai tre punti di pH (5,0, 4,3 e 4,0), della normalità della soluzione acida e del volume di liquido centrifugato. Allo stesso modo e in maniera simultanea è stato calcolato il parametro FOS/TAC, prendendo nota del volume di acido necessario per raggiungere un pH di 5,0 e 4,4 (8).

$$\text{VFA} = \left[131340 \cdot (V_{\text{pH}_{4,0}} - V_{\text{pH}_{5,0}}) \cdot \frac{N_{\text{H}_2\text{SO}_4}}{V_{\text{campione}}} \right] - \left[3,08 \cdot V_{\text{pH}_{4,3}} \cdot \frac{N_{\text{H}_2\text{SO}_4}}{V_{\text{campione}}} \cdot 1000 \right] - 10,9 \quad (7)$$

$$\frac{\text{FOS}}{\text{TAC}} = \frac{[(V_{\text{pH}_{4,4}} \cdot 1,66) - 0,15] \cdot 500}{V_{\text{pH}_{5,0}} \cdot 250} \quad (8)$$

Con:

- V_{pH_i} volume di soluzione consumato per raggiungere l'i-esimo valore di pH;
- $N_{H_2SO_4}$ normalità della soluzione (pari a 0,1);
- $V_{campione}$ volume del campione (20 ml).

Il calcolo di VFA (acidi grassi volatili) e del rapporto FOS/TAC (rapporto tra acidi organici e capacità tampone) fornisce informazioni diverse a seconda che vengano effettuati in test in batch o in semi-continuo.

Nei test in batch (Biochemical Methane Potential - BMP), i VFA e il rapporto FOS/TAC vengono calcolati generalmente alla fine del processo, e riflettono le condizioni finali del sistema. Un basso rapporto FOS/TAC suggerisce che il sistema ha mantenuto una buona capacità tampone, mentre un rapporto alto potrebbe indicare un rischio di acidificazione e un'insufficiente degradazione del substrato organico, a maggior ragione se affiancato ad un elevato valore di VFA. Questi ultimi permettono di capire fino a che punto la materia organica è stata degradata e in che misura l'ambiente all'interno del bioreattore è stato acidificato. Il livello di VFA può indicare la stabilità del processo e la capacità del sistema di completare la digestione senza inibizione della metanogenesi. Questi parametri hanno maggiore valore in termini relativi, valutando le differenze tra i reattori dello stesso esperimento.

In un processo semi-continuo, i VFA sono monitorati per valutare l'accumulo di acidi grassi volatili in tempo reale o a intervalli regolari. Questo fornisce informazioni continue sulla dinamica della degradazione della materia organica e sulla risposta del sistema a variazioni del carico organico o a condizioni operative. È possibile

individuare problemi come l'inibizione della metanogenesi o l'instabilità del processo in fase precoce, permettendo interventi correttivi immediati. Anche il rapporto FOS/TAC viene calcolato periodicamente per monitorare l'equilibrio tra acidi organici e capacità tampone nel tempo. Questo parametro è cruciale per mantenere la stabilità operativa del bioreattore, fornendo un'indicazione continua dell'efficacia della fermentazione e della possibilità di acidificazione. Un monitoraggio regolare del FOS/TAC permette di ottimizzare il processo in semi-continuo, adattando il carico organico per evitare squilibri.

Nei test in batch, le informazioni su VFA e FOS/TAC indicano la stabilità del sistema alla fine del processo, mentre nei test semicontinui forniscono una visione dinamica e continua, permettendo di rilevare problemi e risolverli in tempo reale.

3.2.4 Rapporto C/N

I macronutrienti svolgono un ruolo fondamentale nel fornire gli elementi necessari per la crescita e l'attività dei microrganismi coinvolti nel processo di digestione anaerobica. I principali macronutrienti coinvolti sono il carbonio (C), l'azoto (N) e il fosforo (P) e lo zolfo (S).

Il rapporto tra carbonio e azoto (rapporto C/N) è particolarmente significativo nella digestione anaerobica, poiché influenza direttamente l'efficienza del processo e la composizione del biogas prodotto. Un rapporto C/N ottimale favorisce la crescita dei microrganismi e la decomposizione efficace dei substrati organici, mentre rapporti sbilanciati possono portare a una minore efficienza del processo e a problemi come l'accumulo di ammoniaca e la formazione di gas tossici

come l'acido solfidrico [165]. In generale, un rapporto C/N compreso tra 20:1 e 30:1 è considerato ottimale per la digestione anaerobica. Questo rapporto fornisce una quantità sufficiente di carbonio per supportare la crescita dei microrganismi, insieme a una quantità adeguata di azoto per la sintesi delle proteine e l'attività enzimatica.

Nonostante l'azoto sia essenziale per la crescita batterica, in quanto esso è coinvolto nella sintesi delle proteine e degli enzimi, e compone più di un decimo della massa cellulare, un'elevata concentrazione di azoto nei substrati può influenzare negativamente il processo di digestione anaerobica [166]. La degradazione anaerobica di materia azotata può comportare la produzione di ioni ammonio (NH_4^+) e ammoniaca (NH_3). Il bilancio tra i due prodotti della degradazione dell'azoto è strettamente legato alle condizioni di pH. In condizioni ideali e pH neutro, vengono prodotti maggiormente ioni ammonio rispetto ad ammoniaca, tuttavia, quando il pH tende a condizioni alcaline, questo equilibrio si sposta su una maggiore produzione di NH_3 .

L'azoto ammoniacale, misurato come TAN (Total Ammonia Nitrogen - Azoto ammoniacale totale) e FAN (Free Ammonia Nitrogen - Azoto ammoniacale libero), rappresenta il prodotto finale della digestione anaerobica di proteine, urea e acidi nucleici. In concentrazioni ridotte esso è molto importante per la crescita batterica, infatti fornisce capacità tampone al processo. Concentrazioni di TAN sotto i 200 mg/L sono generalmente considerate favorevoli e non inibitori per il processo di digestione anaerobica. Tuttavia, la FAN è la forma direttamente tossica e può inibire l'attività microbica, causando la riduzione del tasso di produzione di metano, l'aumento dei prodotti intermedi (come gli acidi grassi volatili) ed in casi estremi può portare alla totale inibizione dell'attività dei batteri metanigeni [167]. Gli effetti inibitori sono

percepibili anche a concentrazioni relativamente basse di 150 mg/L di FAN. La capacità di acclimatazione dei microrganismi può mitigare gli effetti negativi, ma è fondamentale monitorare e controllare i livelli di FAN per garantire una digestione efficiente [33].

Tuttavia, alti livelli di TAN possono comportare l'inibizione del reattore se non gestiti adeguatamente. In assenza di acclimatazione, concentrazioni di TAN superiori a 1700–1800 mg/L sono generalmente inibitorie e possono causare malfunzionamenti del reattore. Con inoculi adattati, le concentrazioni di TAN possono essere tollerate fino a 5000 mg/L senza gravi problemi [168].

Al contrario, una bassa concentrazione di azoto ammoniacale (500 mg/L) può portare a una bassa resa di metano, perdita di biomassa e perdita dell'attività metanogenica acetoclastica [169].

Una strategia spesso vincente per utilizzare substrati con un elevato contenuto di azoto è la co-digestione anaerobica. L'impiego di substrati fortemente carboniosi, assieme a substrati altamente proteici permette di bilanciare il rapporto C/N e sfavorire l'inibizione [170].

Oltre ai macronutrienti, che sono necessari in dosi elevate (anche se sempre bilanciate), sono necessari al metabolismo microbico anche dei micronutrienti (specialmente metalli come Fe, Co, Se, Ni, Zn), i quali prendono parte a numerose reazioni enzimatiche coinvolte nel processo di digestione anaerobica. Come per i macronutrienti, anche i micro, se presenti in quantità eccessive, sono considerati composti inibenti della digestione anaerobica [171].

3.2.5 Carico organico

Il carico organico (OLR - Organic Loading Rate) è un parametro cruciale nei processi di digestione anaerobica. Rappresenta la quantità di materia organica introdotta nell'impianto di digestione anaerobica per unità di volume e per unità di tempo. Questo parametro è espresso generalmente in termini di kg di solidi volatili per metro cubo al giorno ($\text{kg}_{\text{VS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$). Un OLR adeguatamente bilanciato assicura che i microrganismi coinvolti nella digestione abbiano sufficiente substrato per la produzione di biogas senza essere sovraccaricati. Un carico organico troppo elevato può portare a un sovraccarico del sistema, causando instabilità operativa, accumulo di VFA e abbassamento del pH, che possono inibire l'attività microbica e ridurre la produzione di biogas. Al contrario, un OLR troppo basso può comportare un utilizzo inefficiente del volume del reattore. Monitorare costantemente le condizioni nel reattore (come pH e VFA) permette di intervenire tempestivamente; se si osservano segni di sovraccarico, come un aumento dei VFA o una diminuzione del pH, potrebbe essere necessario ridurre l'OLR. L'utilizzo di una miscela di substrati può aiutare a mantenere un carico organico equilibrato. La co-digestione di diversi tipi di rifiuti organici può migliorare la stabilità del processo e la produzione di biogas.

3.2.6 Tempo di Residenza Idraulico

Il tempo di residenza idraulico (HRT - Hydraulic Retention Time) rappresenta il tempo medio che il substrato trascorre all'interno del reattore anaerobico. L'HRT è un indicatore cruciale per la progettazione

e la gestione degli impianti di digestione anaerobica, influenzando direttamente l'efficienza del processo e la stabilità del sistema. Esso è definito come il rapporto tra il volume del reattore e la portata volumetrica del substrato in ingresso ed è espresso fundamentalmente in giorni (d).

Un HRT adeguato garantisce che il substrato abbia abbastanza tempo per essere completamente degradato dai microrganismi anaerobici, massimizzando la produzione di biogas. HRT troppo brevi possono portare a una riduzione dell'efficienza di degradazione del substrato, con conseguente accumulo di VFA e altri intermedi di fermentazione che possono destabilizzare il processo e ridurre la resa di biogas, mentre tempi troppo lunghi possono non essere economicamente vantaggiosi.

La composizione del substrato influisce sull'HRT ottimale. Substrati con alta concentrazione di materia organica facilmente degradabile possono richiedere un HRT più breve, mentre substrati complessi e meno degradabili possono richiedere un HRT più lungo.

I diversi regimi di temperatura hanno HRT tipici differenti; infatti ai regimi termofilo (48 - 55°C), mesofilo (32 - 42 °C) e psicrofilo (10 - 25 °C) sono associati rispettivamente tempi di residenza tipici di 14 - 16 giorni, 14 - 30 giorni e oltre 30 giorni. A temperature più elevate i microrganismi operano in modo più efficiente, potenzialmente riducendo l'HRT necessario.

La scelta di un HRT adeguato influenza le caratteristiche del digestato finale; esso, infatti, risulterà ben stabilizzato e con meno sostanze organiche non degradate, più sicuro per l'uso come fertilizzante.

3.2.7 Composti inibenti

La presenza di sostanze inibenti nel substrato può avere un impatto negativo sulla crescita e sull'attività dei microrganismi coinvolti nel processo di digestione, compromettendo le loro funzioni metaboliche e causando una riduzione della produzione di biogas. Tale fenomeno può essere causato da diversi composti inibenti, che possono derivare da una varietà di fonti, tra cui residui industriali, agenti chimici tossici e scarti contaminati [172].

Come riportato precedentemente, una causa di inibizione batterica è indubbiamente un'elevata concentrazione di ammoniaca nella miscela del reattore. Essa proviene principalmente dalla degradazione delle proteine e dei composti azotati e lo squilibrio sopraggiunge principalmente quando il rapporto C/N del substrato non è adeguatamente bilanciato. Come l'ammonio, anche lo zolfo in concentrazioni elevate può essere tossico per i microorganismi; esso può reagire con i metalli pesanti, formando composti insolubili e riducendo la disponibilità di nutrienti essenziali. Il range consigliato di zolfo va da 1 a 25 mg/L [173].

La presenza di metalli pesanti (Cd, Pb, Hg, Zn, Cu, Ni, Cr, ecc.) può inibire le reazioni biochimiche necessarie al processo di digestione; essi, infatti, possono legarsi ai siti attivi degli enzimi microbici. Questo fenomeno è principalmente causato dal fatto che tali metalli non sono biodegradabili, pertanto se presenti nel substrato (rifiuti industriali, fanghi di depurazione, ecc.) possono accumularsi all'interno del reattore.

Una problematica legata alla salute dei mari è la presenza di mercurio nei pesci di grande taglia. Esso può accumularsi nei tessuti dei pesci, in particolare quelli di grandi dimensioni come il tonno. Una volta ingerito, il mercurio diventa metilmercurio, una forma organica altamente tossica e bioaccumulabile.

La presenza di mercurio nei pesci è principalmente dovuta alla contaminazione ambientale delle acque, che avviene attraverso diverse fonti, come emissioni industriali, combustione di carbone e scarichi agricoli. Man mano che i piccoli pesci e altre forme di vita acquatica contaminata dal mercurio vengono consumati da predatori più grandi, il mercurio si concentra a ogni livello della catena alimentare. Questo fenomeno, noto come biomagnificazione, porta a concentrazioni di mercurio significativamente più alte nei pesci predatori di grandi dimensioni come il tonno e il pesce spada [174]. Come altri metalli, esso può causare inibizione enzimatica, causando l'inattivazione degli enzimi necessari per la scomposizione della materia organica e la produzione di metano. Ma esso è anche altamente tossico per i microrganismi anaerobici, inclusi quelli metanigeni. Anche a basse concentrazioni, il mercurio può ridurre la popolazione di questi microrganismi, diminuendo l'efficienza della produzione di biogas. Gli archaea metanigeni sono particolarmente sensibili al mercurio, e la loro inibizione può portare a una significativa riduzione della produzione di metano. Tuttavia, secondo Hamelin et al. [175] i batteri metanigeni, riduttori di ferro e batteri solfato-riduttori svolgono ruoli chiave nella metilazione del mercurio; anioni inorganici come S_2^- e PO_4^{3-} possono reagire con Hg^{2+} , riducendo la biodisponibilità e la metilazione.

Tra le sostanze inibenti rientrano diversi composti organici come ad esempio alcoli, alcani, chetoni, fenoli etc. [33], alcuni dei quali (come

alcoli e terpeni) sono naturalmente contenuti in substrati impiegati per la digestione anaerobica ed essi possono ridurre la produzione di biogas [176], [177]; Il loro effetto inibente può essere causato dalle loro proprietà antibatteriche ma anche dalla capacità di alterare le membrane cellulari [178]; tale fenomeno viene approfondito nel paragrafo 1.4.2. La capacità inibente di ogni sostanza dipende fortemente dalla sua concentrazione e dalle sue caratteristiche.

I residui di farmaci nei rifiuti domestici, zootecnici ed industriali possono inibire la crescita batterica a causa del loro potere antibiotico, anche a bassissime concentrazioni.

La presenza di sostanze inibenti può compromettere significativamente l'efficacia della digestione anaerobica. Per garantire un funzionamento stabile e ottimale del processo, è essenziale monitorare e controllare i livelli di queste sostanze nel substrato. Esistono diverse tecniche per mitigare gli effetti inibenti di tali sostanze. Per esempio, alcuni pretrattamenti, la co-digestione con substrati e l'ottimizzazione delle condizioni operative possono influire positivamente sul processo. Anche l'aggiunta di materiali adsorbenti, come carbone attivo o biochar, permettono di immobilizzare sostanze come metalli pesanti o composti inibenti [179].

3.2.8 Crescita microbica

La complessità dei diversi substrati e delle reazioni biochimiche rendono un processo complesso la massimizzazione della produzione di metano tramite digestione anaerobica [180]. I modelli matematici delle cinetiche di reazione sono strumenti preziosi per lo studio dei sistemi di

digestione anaerobica. La cinetica dei processi microbiologici viene caratterizzata da due parametri principali: la velocità di crescita della biomassa al netto del decadimento endogeno e la velocità di utilizzo del substrato.

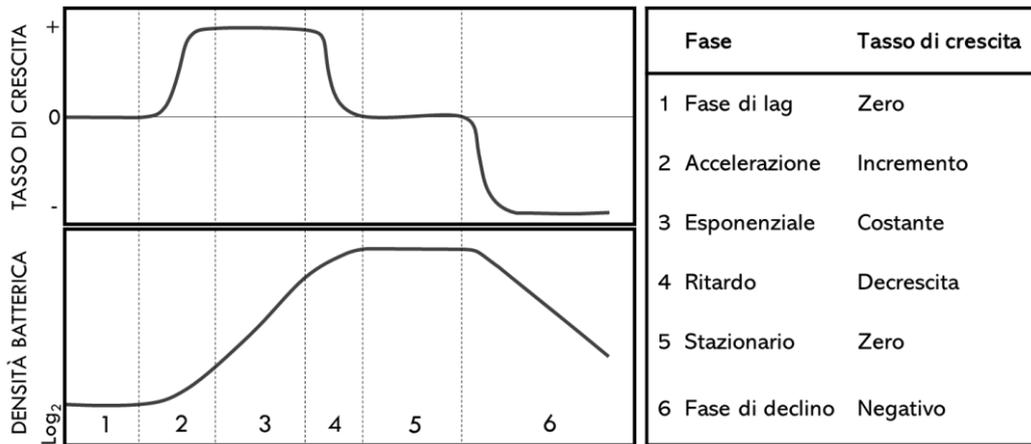


Figura 19 Fasi di crescita e densità batterica [181]

La crescita batterica può essere suddivisa in cinque fasi (Figura 19); durante la fase di latenza i batteri si acclimatano all'ambiente, tuttavia non si registra un aumento del tasso di crescita; una volta acclimatati si verifica un aumento del tasso di crescita con conseguente incremento della densità batterica. Successivamente il tasso di crescita si stabilizza e la popolazione batterica continua ad aumentare (fase esponenziale), fin quando non sopraggiunge una decelerazione della crescita batterica ed infine la fase di declino, in cui il tasso di mortalità delle vecchie cellule è superiore al tasso di crescita delle nuove cellule [181]. L'equilibrio delle cellule batteriche può essere descritto dall'equazione 9 [182].

$$\frac{dX}{dt} = DX_0 - DX + \mu X + k_d X \quad (9)$$

Con:

- X concentrazione cellulare [g/L];
- D tasso di diluizione [1/h];
- μ tasso di crescita specifico [1/h];
- k_d tasso di mortalità [1/h].

Il tasso di crescita specifico μ è funzione di diversi fattori come disponibilità dei nutrienti, condizioni ambientali, fattori inibenti, pH e temperatura.

L'equazione di Monod (10) evidenzia la relazione non lineare tra tasso di crescita specifico e concentrazione limitata del substrato, ed è fondamento di molte equazioni cinetiche correlate alla crescita microbica. Secondo tale equazione il tasso di crescita specifico è inversamente proporzionale alla concentrazione del substrato; cioè, il tasso di crescita specifico aumenta rapidamente a basse concentrazioni di substrato e lentamente a concentrazioni elevate di substrato.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (10)$$

Con:

- μ tasso di crescita specifico [1/h];
- μ_{max} tasso di crescita specifico massimo [1/h];
- S concentrazione del substrato [g/L];
- K_s costante di Monod, rappresenta la concentrazione del substrato al 50% del tasso di crescita specifico massimo ($\mu_{max} / 2$).

Il modello di Monod è considerato affidabile per substrati molto semplici e colture omogenee [183], tuttavia non è in grado di valutare eventuali fattori che influenzano il tasso di crescita. Per tale ragione diversi autori hanno rielaborato l'equazione di Monod, aggiungendo coefficienti correttivi per tener conto di svariati fattori che possono influenzare la digestione anaerobica [182].

3.3 Test di biometanazione (BMP)

Il test del potenziale metanigeno (Biochemical Methane Potential -BMP) è uno degli esperimenti fondamentali nello studio dei substrati per la digestione anaerobica. Esso rappresenta l'indicatore di degradabilità anaerobica di più immediata e diretta correlazione con la quantità di energia ricavabile per via anaerobica da una sostanza organica in termini di biometano.

I test BMP possono essere utilizzati per progettare e collaudare impianti e loro componenti, fornendo ai progettisti un metodo di riferimento per il dimensionamento degli impianti ed una stima della produzione attesa di metano; gestire impianti di digestione anaerobica, fornendo informazioni riguardo l'efficienza di degradazione di un determinato substrato o l'efficacia di determinanti pretrattamenti; fornire informazioni preliminari riguardo l'energia estraibile da substrati dalle caratteristiche non ancora note.

La normativa italiana UNI/11703:2018 [184] definisce un metodo di laboratorio in modalità batch per la valutazione quantitativa e specifica della massima produzione di biogas ottenibile dalla biodegradazione di materia organica. Il metodo si riferisce a prove condotte in ambiente mesofilo (compreso tra 35 e 42 °C), con tenore di solidi totali inferiore a

50 kg/m³ (ad umido). Tale normativa è in accordo da quanto riportato da Holliger et al. [185], i quali hanno sviluppato una metodologia standard per i test BMP, riportando una serie di raccomandazioni per garantire risultati validi e riproducibili. Queste raccomandazioni riguardano l'inoculo, il substrato, la configurazione del test, l'analisi e il reporting dei dati. Alcuni punti chiave includono l'origine e la qualità dell'inoculo, la rappresentatività dei campioni di substrato, e le condizioni di misurazione del biogas.

3.3.1 Gestione dell'inoculo e del substrato

La qualità e la gestione dell'inoculo sono di fondamentale importanza poiché esso fornisce la comunità microbica necessaria per degradare il substrato. Pertanto, è necessario che esso provenga da un reattore anaerobico mesofilo ben funzionante, alimentato con substrati complessi. È consigliabile preparare l'inoculo entro 24 ore dal campionamento, altrimenti deve essere conservato a 4°C in condizioni anaerobiche. L'inoculo impiegato per gli esperimenti di digestione anaerobica effettuati nella presente tesi proviene dal reattore mesofilo di Fattorie della Piana [186]. Dopo ogni prelievo esso è stato setacciato per rimuovere eventuali residui solidi di substrato e caratterizzato in termini di pH, TS (total solids – solidi totali) e VS (volatile solids – solidi volatili).

La rappresentatività del campione di substrato è fondamentale per ottenere dei risultati affidabili; pertanto, particolare cura deve essere prestata alla modalità e ai criteri di prelievo del campione ed alla sua gestione. Il campione deve essere sottoposto alla prova il più

rapidamente possibile, conservato a 4°C per un massimo di 48 ore o congelato a -20°C, qualora fosse necessario conservarlo per più tempo. Il campione deve essere caratterizzato in termini di TS e VS, inoltre possono fornire ulteriori informazioni sulle caratteristiche del substrato i valori di pH, VFA (volatile fatty acids – acidi grassi volatili), COD, alcalinità e TKN.

3.3.2 Soliti totali e solidi volatili

I solidi totali rappresentano la parte secca del campione, ossia il residuo ottenuto dopo l'evaporazione dell'acqua da ciascun campione. Per determinarli, si procede alla misurazione in triplicato, iniziando con la taratura delle capsule in alluminio, ciascuna identificata da un numero univoco per facilitarne il riconoscimento. Successivamente, viene aggiunta nelle capsule una quantità rappresentativa del campione da analizzare. Le capsule vengono poi collocate in una stufa tecnica a una temperatura di circa 70 °C fino a raggiungere la stabilità del peso, la scelta di tale temperatura viene effettuata per scongiurare la perdita di sostanza volatile, la quale potrebbe avvenire a temperature più elevate, e quindi successivamente sottostimare la sostanza volatile contenuta nel campione. il calcolo della percentuale di TS è stato effettuato secondo la formula 11.

I campioni essiccati vengono successivamente prelevati e posti in crogioli ceramici numerati e tarati per eseguire la misurazione in triplicato dei solidi volatili. Questi ultimi rappresentano la frazione volatile dei solidi totali che viene incenerita a 550 °C in un forno a muffola per almeno 2 ore. Dopo il raffreddamento del forno, le capsule vengono

immediatamente pesate per evitare alterazioni dovute alle condizioni ambientali del laboratorio, considerata la natura igroscopica dei residui. Il valore dei solidi volatili (VS) è ottenuto per differenza di peso (formula 12), poiché le ceneri residue, visibili nei crogioli, sono costituite da solidi inorganici non volatili (residuo fisso), principalmente minerali come i carbonati. Il peso delle ceneri è misurato con una bilancia analitica elettronica ad alta precisione, con una sensibilità di 0,0001 g.

$$TS [\%] = \frac{P_{lordo,70^{\circ}C} - T}{P_{netto,in}} \quad (11)$$

$$VS [\%_{TS}] = \frac{P_{netto,70^{\circ}C} - P_{lordo,550^{\circ}C} - T}{P_{netto,70^{\circ}C}} \quad (12)$$

Con:

- $P_{netto,in}$: peso netto del campione tal quale;
- $P_{lordo,70^{\circ}C}$: peso lordo del campione post passaggio in stufa a 70°C per tre giorni;
- $P_{netto,70^{\circ}C}$: peso netto del campione post passaggio in stufa a 70°C per tre giorni;
- $P_{lordo,550^{\circ}C}$: peso lordo del campione post passaggio in muffola a 550°C per 2 ore;
- T: tara.

I risultati vengono infine presentati come valore medio e deviazione standard calcolati sulla base del triplicato di ogni campione.

3.3.3 Modalità di allestimento e conduzione della prova

I test BMP prevedono l'impiego di reattori batch all'interno dei quali substrato, inoculo e soluzioni nutrienti vengono messi a contatto fra loro. I reattori sono poi sottoposti a condizioni di agitazione e temperatura controllate. Il reattore deve essere costituito da un materiale non permeabile al gas (vetro), con chiusura a tenuta, dotato di un sistema perforabile per permettere la captazione di biogas per tutta la durata della prova.

I reattori utilizzati per i test BMP devono essere dimensionati in modo adeguato a garantire l'omogeneità del substrato, il volume previsto di gas prodotto e la sensibilità della tecnica di misurazione del gas. È consigliato un volume di lavoro compreso tra 400 mL e 500 mL per aumentare la riproducibilità, utilizzando quindi recipienti con un volume totale di circa 1 L. È importante che i recipienti siano chiusi con setti in gomma butilica a tenuta di gas, sufficientemente spessi da poter essere forati più volte con un ago. Ogni esperimento deve essere progettato in triplicato, affiancando ai reattori con substrato da testare dei reattori di controllo e dei reattori in bianco (questi ultimi almeno in duplicato).

I reattori in bianco non contengono alcun substrato e sono necessari per misurare la produzione di metano endogena (attribuibile al solo inoculo), questa produzione verrà successivamente sottratta al volume di metano misurato nei reattori contenenti il substrato da testare.

I reattori di controllo sono necessari per la validazione dei risultati dei test BMP. Questi controlli permettono di confermare l'attività dell'inoculo utilizzando un substrato standard e di confrontarla con il

suo valore noto. Inoltre, i controlli positivi consentono di validare la procedura di misurazione del gas. Un substrato standard largamente impiegato come controllo nei test BMP è la cellulosa microcristallina (CAS 9004-34-6). Essa, infatti, possiede una composizione ben definita, essendo composta esclusivamente da glucosio come monomero, il che agevola il calcolo del massimo potenziale metanigeno teorico. Inoltre, le sue proprietà polimeriche coinvolgono tutte le fasi cruciali della degradazione anaerobica, inclusa l'idrolisi. È inoltre gestibile, conservabile, relativamente economica e facilmente reperibile come prodotto di alta qualità e purezza.

La preparazione dei reattori di prova deve essere effettuata definendo i volumi di substrato, inoculo, acqua di diluizione e soluzioni madre.

Le quantità di inoculo e substrato devono essere scelte in modo tale che la produzione finale di metano sia misurabile con un'adeguata precisione per il sistema di misura impiegato e nettamente distinguibile dalla produzione del reattore bianco. Inoltre, è importante limitare il rischio di inibizione del processo degradativo per accumulo di acidi grassi volatili, causato da bassi valori del rapporto inoculo/substrato. Alla luce di queste considerazioni viene considerato ottimale un valore di $3 \text{ g}_{\text{VInoculo}}/\text{g}_{\text{VSubstrato}}$; una volta stabilito il volume di inoculo da impiegare, viene calcolata la quantità di substrato da inserire nel reattore in modo da mantenere tale rapporto. L'acqua di diluizione può essere aggiunta per garantire le condizioni di umidità all'interno del reattore. Sono considerati adeguati valori compresi tra 20 e 50 $\text{g}_{\text{TS}}/\text{L}$.

3.3.4 Soluzioni nutrienti

All'interno del reattore in cui si effettua il test BMP, devono essere presenti gli elementi necessari al fabbisogno batterico, nelle concentrazioni minime riportate in Tabella 8.

Tabella 8 Concentrazioni minime per il metabolismo batterico

Elemento	Concentrazione [mg/L]	Elemento	Concentrazione [mg/L]
N	140	Zn	0.024
P	160	Cu	0.18
Mg	12	Mn	0.14
Ca	20.5	Mo	0.004
K	78	Co	0.25
Fe	5.6	Ni	0.025
B	0.009	Se	0.023

Al fine di garantire la presenza di questi micronutrienti, la norma UNI/11703:2018 fornisce la procedura di preparazione di tre soluzioni madre (Figura 20), composte come descritto di seguito:

- Soluzione A: 5.4g di KH_2PO_4 , 22.4g di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 10.6g di NH_4Cl in 1L di acqua distillata;
- Soluzione B: 1.5g di $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.0g di $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.4g di $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in 1L di acqua distillata;
- Soluzione C: 0.05g di $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.005g di H_3BO_3 , 0.005g di ZnCl_2 , 0.003g di CuCl_2 , 0.001g di $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1g di $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01g di $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.005g di Na_2SeO_3 in 1L di acqua distillata.

Esse devono corrispondere al 5%, 5% e 1% del volume della miscela, rispettivamente per le soluzioni A, B e C.



Figura 20 Soluzioni nutritive

3.3.5 Avvio e termine dell'esperimento

Una volta allestiti i reattori di prova, di controllo e in bianco, viene misurato il pH iniziale di ogni reattore. I reattori vengono mantenuti in condizioni di agitazione per favorire il contatto tra i batteri ed il substrato. Le condizioni mesofile devono essere garantite per tutta la durata dell'esperimento con fluttuazioni di massimo $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ dalla temperatura operativa. Il test deve avere durata minima di 21 giorni, tuttavia la prova può considerarsi terminata quando la produzione giornaliera di metano sia inferiore all'1% della produzione cumulata, per almeno 3 giorni consecutivi. Al termine della prova viene nuovamente misurato il pH della miscela e vengono effettuate le analisi sul digestato. Nella presente tesi sono stati utilizzati reattori di vetro da 1,1 L con due colli laterali dotati di setti perforabili per la captazione del biogas, e uno centrale mantenuto chiuso. I reattori sono stati dotati di

agitatore magnetico e mantenuti in condizioni mesofile, alla temperatura di 35 ± 0.5 °C.

Il BMP è espresso come volume di gas metano secco in condizioni standard (0°C e 101,33 kPa) per massa di solidi volatili (VS), con l'unità $\text{NL}_{\text{CH}_4}/\text{kg}_{\text{VS}}$; il BMP del substrato e del controllo vengono determinati sottraendo la produzione di metano dei bianchi dalla produzione lorda di metano dei test del substrato/controllo positivo.

Il test può essere considerato valido se il BMP medio dei reattori di controllo con cellulosa è compreso nel range $335 \text{ NmL}/\text{g}_{\text{VS}} \pm 25\%$.

3.3.6 Modalità di misura del metano prodotto

La misura del metano prodotto può essere effettuata mediante due tecniche: metodo manometrico e metodo volumetrico. Nel primo viene misurata la variazione di pressione nello spazio di testa del reattore; nel secondo viene misurato il volume di biogas prodotto. Nella presente tesi è stato impiegato il metodo volumetrico, di seguito è riportata la metodologia utilizzata.

Il biogas viene periodicamente prelevato mediante siringa da 100 mL, tramite i setti perforabili e inserito in un batch contenente NaOH 3 M, una trappola alcalina (Figura 21) che ha la seguente funzione: il biogas inserito all'interno della trappola è composto da anidride carbonica e metano, la prima reagisce con la soluzione di NaOH producendo carbonati che precipitano all'interno del reattore, il secondo genera una differenza di pressione che causa uno spostamento di volume di liquido

pari al volume di metano prodotto, che viene misurato mediante cilindro graduato.



Figura 21 Trappola alcalina

3.3.7 Cinetiche di reazione nella digestione anaerobica

La produzione di biometano è legata al consumo di substrato; la velocità di utilizzazione del substrato può essere valutata tramite l'impiego di diversi modelli matematici che fanno riferimento al percorso metabolico di utilizzazione. Tra i modelli disponibili per la valutazione dei parametri cinetici, nel presente elaborato sono state impiegate due diverse leggi: cinetica del 1° ordine e modello di Gompertz.

Sono stati utilizzati due modelli per valutare i risultati ottenuti dai test BMP; l'equazione del primo ordine (13) consente di stimare la produzione massima di metano B_0 [$\text{NL}\cdot\text{g}_{\text{vs}}^{-1}$] e il coefficiente di velocità di idrolisi apparente k [d^{-1}], il modello cinetico di primo ordine è particolarmente indicato per substrati in cui l'idrolisi risulta essere la fase limitante. L'equazione di Gompertz modificata (14) consente di stimare la massima produzione di metano P [$\text{NL}\cdot\text{g}_{\text{vs}}^{-1}$], il tasso massimo

di produzione di metano R_m [$NL \cdot g_{vs}^{-1} \cdot d^{-1}$], e la fase latenza λ [d] [187]. I parametri sono stati derivati applicando un metodo di risoluzione iterativo per ridurre al minimo la deviazione quadratica media tra la produzione cumulativa di metano al tempo t derivata dalla formula e il valore empirico [$NL \cdot g_{vs}^{-1}$].

Cinetica di primo ordine

$$B = B_0 \cdot [1 - \exp(-k \cdot t)] \quad (13)$$

Con:

- B produzione di metano cumulato al tempo t [$NL \cdot g_{vs}^{-1}$];
- B_0 metano prodotto in un tempo infinito [$NL \cdot g_{vs}^{-1}$];
- k coefficiente di velocità di idrolisi apparente in [$1/d$].

Gompertz modificato

$$M = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (14)$$

Con:

- M produzione di biogas cumulato [$NL \cdot g_{vs}^{-1}$];
- P rendimento potenziale di biogas [$NL \cdot g_{vs}^{-1}$];
- R_m tasso di massima produzione di biogas [$NL \cdot g_{vs}^{-1} \cdot d^{-1}$];
- λ durata della fase di latenza [d];

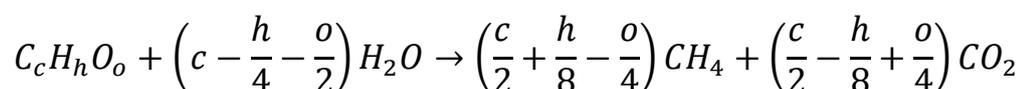
Il modello del primo ordine non è in grado di adattarsi perfettamente a curve di produzione cumulata di metano particolarmente complesse. Esso, infatti, è più adatto a processi in cui la reazione di idrolisi è cruciale,

come nel caso di rifiuti solidi [187]. Valori molto bassi di k possono indicare inibizione batterica. Substrati che comportano fasi di latenza significative sono più accuratamente approssimati dal modello di Gompertz. La fase di latenza (λ) nella digestione anaerobica è un periodo iniziale del processo durante il quale l'attività microbica è relativamente bassa e la produzione di biogas è ridotta. Questa fase rappresenta il tempo necessario affinché i microrganismi adattino il loro metabolismo alle condizioni del nuovo substrato e inizino a proliferare e degradare la materia organica in modo efficace.

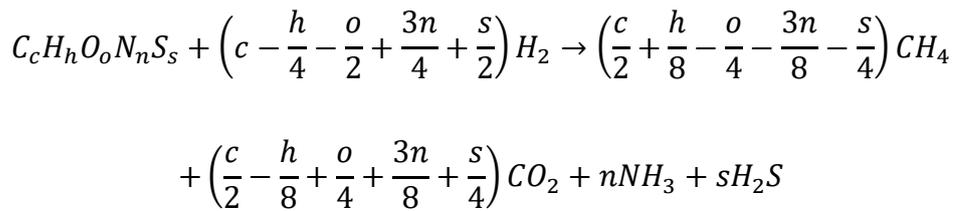
Il tasso di massima produzione di biogas (R_m) è un parametro cruciale per progettare e ottimizzare i processi di digestione anaerobica. Un tasso più alto indica un processo più efficiente e produttivo. Un'adeguata conoscenza di tale parametro può fornire informazioni per progettare il processo in maniera più efficiente in termini di HRT e OLR.

3.4 Potenziale teorico di metano

Buswell and Mueller nel 1952 hanno sviluppato una formula stechiometrica che permette di quantificare il biogas prodotto durante il processo di digestione anaerobica, conoscendo la composizione chimica di un substrato semplice:



Nel 1977 questa equazione è stata modificata da Boyle per valutare il contributo dei composti dell'azoto e dello zolfo (ammoniaca e idrogeno solforato) [188].



Noti i rapporti relativi di carbonio, idrogeno, ossigeno, azoto e zolfo e supponendo che questi siano gli unici elementi che compongono il substrato, è possibile calcolare la resa teorica di metano.

3.5 Valorizzazione del digestato

Il digestato è il materiale residuale che rimane dopo la digestione anaerobica della materia organica. Esso rappresenta una miscela di sostanze solide e liquide, contenente nutrienti, materia organica stabilizzata e una varietà di microrganismi. La sua composizione varia in base alle caratteristiche del reattore, ma soprattutto alla tipologia di substrato. Esso può contenere residui solidi di materia organica come fibre non digerite, lignina, e residui organici stabilizzati. La frazione liquida del digestato è ricca di azoto, fosforo, potassio e altri micronutrienti. L'azoto è principalmente presente sotto forma di azoto ammoniacale; tale fattore va attenzionato, infatti, esso è facilmente disponibile per le piante ma in condizioni particolari può portare a fenomeni di eutrofizzazione.

Il digestato è generalmente stabilizzato, il che significa che la maggior parte della materia organica facilmente degradabile è stata convertita in biogas, riducendo così la potenziale emissione di odori e gas serra durante lo stoccaggio e l'applicazione. Inoltre, la materia organica stabilizzata presente può migliorare la struttura del suolo.

Date le caratteristiche del digestato esso è principalmente impiegato come fertilizzante agricolo. Il suo impiego può essere di tipo diretto, applicato direttamente ai terreni agricoli come fertilizzante organico, migliorando la fertilità del suolo e fornendo nutrienti essenziali per le piante, oppure a seguito di un processo di compostaggio, per migliorarne la stabilità e ridurre ulteriormente il volume.

Il doppio vantaggio nell'impiego del digestato come ammendante dei terreni risiede nella sostituzione dei fertilizzanti chimici e miglioramento della sostenibilità delle pratiche agricole, unito allo smaltimento del residuo del processo di bioraffinazione da cui proviene.

Tuttavia, esso è un prodotto proveniente spesso da impianti di gestione di rifiuti organici, per tale ragione il suo impiego è rigidamente gestito da normative e leggi che ne definiscono le caratteristiche per tutelare l'agricoltura dallo spargimento indiscriminato di contaminanti o composti dannosi.

L'uso del digestato sui suoli agricoli in Europa è regolato da diverse normative e direttive che mirano a garantire la sicurezza ambientale, la salute umana e la qualità del suolo.

Il regolamento (UE) 2019/1009 sui prodotti fertilizzanti [189] stabilisce norme per la commercializzazione e l'uso dei prodotti fertilizzanti nell'Unione Europea, tra cui concimi organici e organico-minerali, ammendanti del suolo, biostimolanti, inclusi i fertilizzanti organici e il digestato. Specifica i requisiti di sicurezza, qualità ed etichettatura che i prodotti fertilizzanti devono soddisfare per essere venduti nell'UE. Lo stesso regolamento introduce per la prima volta i limiti relativi a contaminanti tossici, al fine di garantire un elevato livello di sicurezza ambientale e umana. Inoltre, definisce i contenuti minimi di nutrienti e

le caratteristiche necessarie a seconda di ogni prodotto. Tale regolamento è stato modificato dal regolamento n. 2022/1519 che, nell'ottica dell'economia circolare, agevola il recupero di rifiuti organici. È stato incluso il processo di separazione della frazione liquida e solida del digestato, a condizione che gli additivi utilizzati non superino determinate soglie di concentrazione. Tali processi permettono di agevolare l'accesso sul mercato interno per i prodotti fertilizzanti contenenti digestato [190].

Oltre a rispettare i requisiti dettati dai regolamenti sopracitati, il digestato deve essere conforme ai requisiti per la cessazione della qualifica di rifiuto secondo l'articolo 6 della Direttiva 2008/98/CE sui rifiuti [191]. Secondo tale direttiva, un rifiuto cessa di essere tale se è stato sottoposto a un'operazione di recupero, incluso il riciclaggio, e soddisfa le condizioni di cessazione di qualifica di rifiuto. nel caso specifico del digestato tali condizioni possono essere riassunte come segue:

- deve essere dimostrato che il digestato è comunemente utilizzato come fertilizzante agricolo o per altri scopi specifici;
- deve esistere un mercato o una domanda per il digestato trattato;
- il digestato deve soddisfare i requisiti tecnici e normativi applicabili ai prodotti fertilizzanti;
- l'utilizzo del digestato non deve comportare impatti negativi sull'ambiente o sulla salute umana.

In aggiunta alle normative sopracitate è interessante citare la direttiva 91/676/CEE sui nitrati [192]. Essa mira a individuare le zone vulnerabili ad elevati livelli di nitrati o ad eutrofizzazione, a promuovere programmi di azione e a monitorare la concentrazione di nitrati nel suolo fresco e

nelle acque superficiali. Come riportato precedentemente, il digestato può essere una ricca fonte di macronutrienti (tra i quali l'azoto), pertanto tale parametro deve essere attenzionato proprio per scongiurare fenomeni di inquinamento o eutrofizzazione.

3.6 Classificazione dei processi e delle tecnologie di digestione anaerobica

La digestione anaerobica può essere classificata in base alla percentuale di sostanza secca (TS) del substrato, ossia della miscela organica che viene introdotta nel reattore. I processi vengono suddivisi in wet, dry e semi-dry:

- Digestione a umido (wet digestion): substrato alimentato al reattore ha un contenuto di sostanza secca inferiore al 10% [193]. Si tratta di una miscela piuttosto diluita, che ha quindi una grande quantità di acqua. La digestione a umido è molto comune poiché permette una miscelazione efficiente e una gestione più semplice, anche se richiede più energia per il riscaldamento del reattore a causa dell'elevata presenza d'acqua. Essa è particolarmente indicata per materiali come i liquami zootecnici, questi reflui contengono una bassa concentrazione di solidi e un'alta percentuale di acqua, il che facilita la movimentazione del substrato all'interno del reattore.
- Digestione a secco (dry digestion): il contenuto di TS del substrato è compreso tra il 20 e il 40%, esso è quindi più concentrato e contiene meno acqua rispetto alla digestione a umido. La digestione a secco è adatta per materiali come la frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU) o per residui agricoli con alta percentuale di solidi [194]. La

minore presenza di acqua richiede un sistema di movimentazione più robusto, poiché il substrato è più viscoso, ma consente di ridurre i costi energetici di riscaldamento [193].

- Digestione a semisecco (semi-dry digestion): la percentuale di TS è solitamente compresa tra il 10% e il 20%. È una modalità meno comune rispetto alla digestione a umido e a secco, ma può essere utile per determinati tipi di biomasse che non si adattano perfettamente agli altri due processi.

Inoltre, i processi di digestione anaerobica possono essere suddivisi sulla base delle modalità di alimentazione, ovvero la modalità con cui il substrato viene introdotto nel reattore. Nel processo a alimentazione continua, il substrato viene introdotto costantemente nel reattore a una velocità definita. Questo tipo di alimentazione è particolarmente indicato per impianti di grandi dimensioni che richiedono una produzione costante di biogas. L'introduzione continua permette di mantenere stabili le condizioni di digestione. L'alimentazione in semi-continuo, invece, implica che il substrato venga aggiunto a intervalli regolari, ad esempio una o più volte al giorno. È una modalità intermedia che consente di bilanciare l'efficienza energetica e la stabilità del processo.

Nel sistema discontinuo, o in batch, il reattore viene riempito completamente con il substrato e lasciato in fermentazione per un periodo di tempo specifico fino al completamento della digestione. Una volta terminato, il reattore viene svuotato e ricaricato. Questo tipo di alimentazione non ha significativa rilevanza a livello industriale, ma può essere particolarmente utile su scala di laboratorio, come nel caso dei test BMP.

Un'ulteriore differenziazione può essere effettuata sulla base delle modalità in cui vengono gestite le fasi biochimiche, ovvero i diversi stadi attraverso cui si trasforma la materia organica. In un sistema monostadio, tutte le fasi della digestione anaerobica avvengono nello stesso reattore. Il vantaggio principale di un sistema monostadio è la semplicità e il minor costo di costruzione e gestione [195]. Tuttavia, poiché tutte le fasi convivono in un unico spazio, è necessario trovare un equilibrio ottimale per evitare che una fase interferisca negativamente con le altre. Questo tipo di processo è ampiamente usato per substrati omogenei e per volumi di digestione più piccoli.

Nei sistemi a due stadi, la digestione anaerobica viene suddivisa in due fasi separate, ciascuna ospitata in un reattore dedicato. Nel primo stadio, si svolgono l'idrolisi e l'acidogenesi, in cui i composti organici complessi vengono scomposti in molecole più semplici. Nel secondo stadio, la metanogenesi ha luogo in un ambiente separato e più stabile, che favorisce l'azione dei batteri metanigeni per la produzione di metano. Questo sistema offre un maggiore controllo e una migliore efficienza della produzione di biogas, poiché ciascun reattore può essere ottimizzato per le condizioni ideali della fase specifica [196]. Tuttavia, i sistemi bi-stadio sono più costosi e complessi da gestire.

Esistono, inoltre, diverse tecnologie e configurazioni per ottimizzare la digestione anaerobica. I digestori a flusso continuo a miscelazione completa (CSTR - Continuous Stirred-Tank Reactor) sono tra i più comuni e utilizzati su larga scala e supportano una vasta gamma di substrati, inoltre essi offrono il miglior controllo dei parametri operativi. L'alimentazione avviene in modo continuo così come anche la rimozione del materiale digerito. La miscelazione garantisce che i substrati entrino in contatto con i microrganismi e che il calore e i nutrienti siano

distribuiti uniformemente. Questa tecnologia è adatta a substrati liquidi o a bassa viscosità [197].

I reattori di tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) sono costituiti da un sistema di alimentazione posto nella parte inferiore, il substrato viene fatto fluire attraverso i fanghi anaerobici, dal basso verso l'alto. Il biogas prodotto gorgoglia favorendo la miscelazione. Questi digestori sono particolarmente indicati per l'impiego di OLR elevati HRT ridotti, tuttavia sono adatti a rifiuti con un elevato tenore di TS [198].

I biodigestori ABR (Anaerobic Baffled Reactors) sono sistemi caratterizzati da un'elevata capacità di OLR e presentano vantaggi distintivi rispetto ai digestori a flusso ascendente e ai sistemi a filtro anaerobico. Tra i principali benefici si trovano la capacità di resistere agli shock provocati da OLR elevati e ad HRT più lunghi rispetto ad altri sistemi [199]. Nei reattori a membrana anaerobica (AnMBR) il digestato passa attraverso un modulo di filtrazione a membrana che separa solidi e liquidi, migliorando il recupero del biogas e ottenendo un eccesso di effluente purificato. Il sistema a membrana permette di disaccoppiare il tempo di ritenzione dei solidi dal tempo di ritenzione idraulica. Questa tecnologia è utile per il trattamento di reflui con elevate concentrazioni di solidi sospesi [200].

Esistono inoltre vari altri modelli di reattori e soluzioni ibride utilizzabili per la digestione anaerobica di scarti agroindustriali. Tra questi, si distinguono i reattori AnBBR (Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor), Packed-Bed (APBR), Anaerobic Structured-Bed (ASTBR), EGBR (Expanded Granular Bed Reactor), EGSB (Expanded Granular Sludge Blanket), SBR (Sequential Batch Reactor) e LBR (Leachate Bed Reactor) [201].

3.7 Vantaggi della co-digestione anaerobica

La digestione anaerobica di singoli substrati (mono-digestione) è largamente impiegata sia per colture selezionate che per specifici flussi di rifiuti, tuttavia, in molti casi questo approccio può comportare una serie di svantaggi. Ad esempio, materiali lignocellulosici ad alto contenuto di carbonio non sono particolarmente adatti per la mono-digestione in quanto essi risentono della scarsa presenza di azoto e del rapporto C/N sbilanciato [202]. D'altra parte, substrati ad alto contenuto proteico possono causare composti tossici come ammoniaca (NH_3) e idrogeno solforato (H_2S) [203]. Inoltre, rifiuti organici facilmente biodegradabili come i rifiuti alimentari possono causare un accumulo di VFA nel reattore, inibendo il processo di metanogenesi [204]. Ulteriori problematiche legate alla mono-digestione possono essere ad esempio l'accumulo di sostanze inibenti come metalli pesanti o composti organici tossici e la disponibilità limitata di alcuni substrati durante tutto l'anno (colture stagionali); ognuno di questi fattori può causare la riduzione della produzione di metano e l'instabilità complessiva del reattore [205].

Una valida soluzione a ciascuna di queste problematiche è la co-digestione anaerobica, la quale è un processo che prevede la digestione simultanea di due o più tipi di substrati organici in un unico reattore, come rifiuti agricoli, reflui zootecnici e fanghi di depurazione. Combinare materiali con caratteristiche complementari può portare ad un'azione sinergica e benefica per il reattore.

La co-digestione anaerobica è un processo che facilita interazioni sinergiche tra i diversi substrati, apportando numerosi vantaggi operativi. Essa può migliorare l'efficienza del processo attraverso un bilanciamento dei nutrienti, l'arricchimento con oligoelementi, la

diluizione di composti tossici o inibitori e la promozione di una maggiore diversità microbica. È stato evidenziato come un corretto equilibrio del rapporto C/N ottenuto con la co-digestione di substrati complementari possa prevenire l'accumulo di acidi grassi volatili (VFA) e migliorare la capacità tampone del sistema [193] . Questi benefici derivano dalla capacità della co-digestione di mantenere un ambiente stabile nel digestore.

Inoltre, la co-digestione favorisce la disponibilità di oligoelementi, essenziale per la stabilità e la produttività della digestione anaerobica. La presenza di questi oligoelementi favorisce non solo la diversità microbica, ma anche l'attività enzimatica e le interazioni simbiotiche tra i microrganismi, elementi cruciali per una digestione efficiente. La co-digestione con liquami suini, naturalmente ricchi di elementi come ferro e nichel può prevenire l'accumulo eccessivo di VFA, stabilizzando il processo e incrementando la produzione di metano [207]. Inoltre, questi metalli agiscono da cofattori per vari enzimi chiave nella metanogenesi, migliorando il metabolismo anaerobico dei substrati e contribuendo a un ambiente di reazione più stabile.

Un ulteriore beneficio della co-digestione risiede nel fatto che alcuni co-substrati apportano popolazioni microbiche essenziali per la digestione anaerobica, contribuendo così alla sostenibilità di una comunità microbica diversificata e riducendo il rischio perdita di microrganismi essenziali durante il processo. La presenza di questi microrganismi è particolarmente utile per mantenere la funzionalità a lungo termine del digestore. Ad esempio, la co-digestione di letame suino e rifiuti alimentari ha dimostrato di aumentare la diversità microbica e favorire la fase metanigena. L'effetto era particolarmente evidente a tempi di ritenzione ridotti, suggerendo che il letame suino, con il suo contributo

microbico, favorisca la stabilità del processo [197]. Al contrario, studi sulla co-digestione di fanghi di depurazione con rifiuti alimentari, erba e scarti da giardino hanno rilevato una diminuzione della diversità microbica. Tuttavia, questo fenomeno ha portato alla formazione di una comunità microbica altamente specializzata nella degradazione di materiali lignocellulosici, che ha contribuito a migliorare la stabilità operativa del digestore [208].

Un altro vantaggio della co-digestione riguarda la capacità di ridurre la concentrazione di composti inibitori grazie a un effetto di diluizione. La co-digestione può infatti abbassare i livelli di azoto ammoniacale totale (TAN) e di composti derivati dalla lignina, entrambi noti per il loro potenziale effetto tossico sui batteri metanigeni [209].

La co-digestione anaerobica, quindi, non solo rappresenta una soluzione per migliorare la produzione di biogas, ma offre anche opportunità per ottimizzare la stabilità e l'efficienza del processo. Questi vantaggi, legati all'integrazione microbica, all'apporto nutrizionale e alla mitigazione dei composti inibitori, pongono le basi per sviluppi futuri nella gestione e valorizzazione dei rifiuti organici su ampia scala.

4 MATERIALI E METODI PER LA VALORIZZAZIONE DEGLI SCARTI DEL PESCE

Nel presente capitolo sono descritti in dettaglio i materiali e i metodi impiegati per condurre una serie di esperimenti finalizzati allo sviluppo di un intero processo di bioraffinazione degli scarti della filiera del tonno.

In primo luogo, è discussa la procedura utilizzata per i test di valutazione del massimo potenziale metanigeno (BMP - Biochemical Methane Potential), impiegata per effettuare degli esperimenti preliminari per valutare l'effetto di diversi solventi sul processo di digestione anaerobica. Dai risultati dei test preliminari si è scelto di concentrare la ricerca su tre solventi, d-Limonene, 2-Meox ed etanolo. È stato inoltre aggiunto allo studio l'olio essenziale di arancia in quanto esso è costituito per la maggior parte da d-Limonene, ma ha un valore economico minore.

Olio essenziale, d-Limonene, 2-Meox ed etanolo sono stati utilizzati in test di estrazione dell'olio di pesce dalle parti molli degli scarti del tonno. Il residuo di tale processo è stato poi impiegato come substrato in test di co-digestione anaerobica in semi-continuo con code di cipolla.

Infine, il capitolo si conclude con due diverse opzioni di valorizzazione per il digestato prodotto dagli esperimenti in semi-continuo: i test di fitotossicità indagano l'effetto dell'impiego del digestato tal quale come

ammendante dei terreni, i test di estrazione di struvite valutano la possibile valorizzazione dell'industria dei concimi.

Questa sezione del lavoro fornisce un quadro completo delle metodologie adottate, permettendo di comprendere le basi sperimentali su cui si fondano i risultati discussi nel capitolo successivo.

4.1 Test in batch per la valutazione dell'effetto dei solventi sulla digestione anaerobica

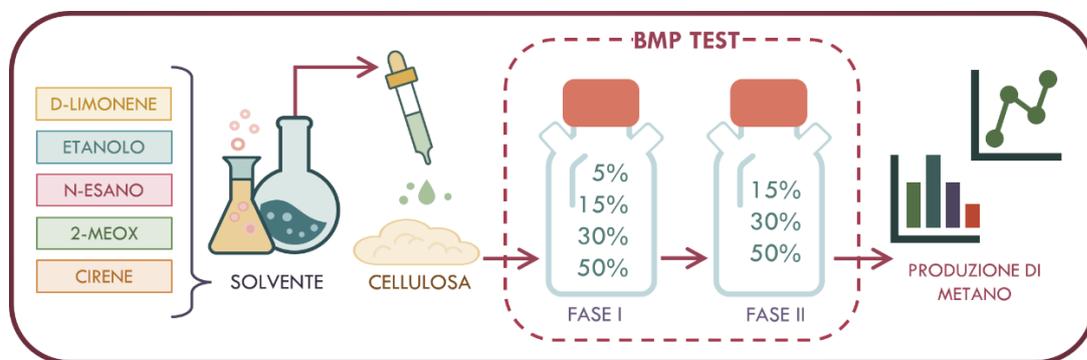


Figura 22 Design dell'esperimento

I solventi impiegati per estrarre composti ad alto valore da biomasse e rifiuti organici spesso rimangono impregnati nei residui solidi post-estrazione. Questi residui possono essere trattati per recuperare il solvente impregnato mediante ulteriori processi di lavorazione spesso energivori e costosi.

L'obiettivo della bioraffinazione è quello di valorizzare ogni scarto fino ad annullare la produzione di rifiuti. Esplorare gli effetti che i solventi hanno sul processo di digestione anaerobica permette di aprire nuovi orizzonti sulla valorizzazione dei residui dei processi di estrazione, valutando caso per caso se sia più efficiente impiegare processi di recupero dei solventi o utilizzare lo scarto come substrato tal quale.

I solventi comunemente utilizzati nella bioraffinazione, come l'n-esano, il d-Limonene e l'etanolo, hanno diverse proprietà chimiche e fisiche che possono interagire in modo complesso con i microorganismi coinvolti nella digestione anaerobica. Per esempio, l'etanolo è noto per stimolare la crescita di metanigeni e facilitare il trasferimento diretto di elettroni interspecie (DIET), che può aumentare la produzione di metano [193]. Tuttavia, la presenza di solventi come il d-Limonene può avere effetti inibitori sui microorganismi anaerobici, rendendo necessario un pretrattamento dei substrati per rimuovere o neutralizzare tali composti.

La necessità di uno studio sistematico sugli effetti dei solventi sul processo di digestione anaerobica è quindi evidente. Comprendere come diversi solventi influenzano i parametri chiave del processo anaerobico, come la crescita microbica, le cinetiche di reazione e la produzione di metano, è essenziale per ottimizzare l'integrazione della bioraffinazione con la digestione anaerobica.

A tal fine, è stato effettuato uno studio preliminare per valutare l'effetto di diverse percentuali di diversi solventi sulla digestione anaerobica di cellulosa microcristallina.

La cellulosa microcristallina viene spesso utilizzata come controllo nei test BMP, grazie alle sue particolari caratteristiche: la sua semplice composizione agevola il calcolo del suo BMP teorico, inoltre la sua gestione, conservazione e impiego è molto semplice [185]. Per queste ragioni è stata scelta come substrato standard, da impregnare con i solventi designati. Infatti, l'obiettivo di questo esperimento è conoscere l'effetto dei solventi in maniera il più possibile disgiunta dalla loro interazione con il substrato in esame, al fine di avere una panoramica

consapevole dell'effetto sulle comunità batteriche. La cellulosa fa le veci di un qualsiasi substrato di natura organica proveniente da un processo di bioraffinazione, impregnato del solvente impiegato in tale processo.

Nel presente studio sperimentale sono stati presi in esame cinque tra i solventi più comuni o di maggiore interesse per la ricerca. Quattro di origine biologica: d-Limonene, etanolo, 2-Meox e cirene; uno che ha origine dal petrolio: n-esano. Tutti i solventi sono stati acquistati da fonti commerciali (Merck Life Science S.r.l. e Thermo Scientific) e utilizzati senza ulteriore purificazione.

La preparazione del substrato è stata effettuata seguendo la procedura di seguito riportata: la cellulosa è stata pesata in una bilancia analitica e distribuita uniformemente su un vetro di orologio; successivamente, sempre mantenendo il vetro di orologio sulla bilancia, il solvente è stato dosato goccia a goccia in maniera uniforme su tutto il substrato fino a raggiungere il peso necessario.



Figura 23 Preparazione del substrato

Il solvente è stato dosato in modo tale da rappresentare il 5, 15, 30, 50% del peso totale del substrato (cellulosa+solvente), secondo la relazione:

$$g_{cellulosa} : 100 - \%_{solvente} = g_{solvente} : \%_{solvente}$$

$$\%_{solvente} = \frac{g_{solvente}}{g_{solvente} + g_{cellulosa}} = \frac{S}{S + C}$$

Tali valori sono stati scelti per ottenere una panoramica completa dell'effetto dei solventi anche ad alte concentrazioni, nell'ottica di poter impiegare un substrato imbevuto senza alcun pretrattamento di rimozione, o comunque di individuare le concentrazioni critiche di solvente per la digestione anaerobica.

I grammi di cellulosa sono stati calcolati per ogni esperimento mantenendo un rapporto di 3 g_{VSinoculo}/g_{VSubstrato}.

Il test è stato suddiviso in cinque cicli (uno per ogni solvente), ogni ciclo è composto da due fasi:

- I fase: l'inoculo impiegato per il test è stato prelevato direttamente da un digestore mesofilo funzionante, ogni test consisteva in reattori in triplicato alimentati con cellulosa come controllo e reattori in triplicato utilizzando come substrato la cellulosa impregnata di solvente in rapporti del 5%, 15%, 30% e 50% rispettivamente del rapporto solvente/solvente+cellulosa (S/(S+C));
- II fase: al termine della prima fase i digestati dai reattori con diverse percentuali di solvente che avevano mostrato una significativa produzione di biometano sono stati mescolati e utilizzati come inoculo in una seconda fase di test BMP, effettuati per investigare se la comunità microbica si fosse adattata alla presenza dei solventi,

questo secondo test è stato effettuato solo su substrati con rapporti 15%, 30% e 50% S/(S+C).

Tabella 9 Nomenclatura

Nome	$\left(\frac{S}{S+C}\right)^*$ [%]	Fase	Solvente
Lim5-I	5	I	d-Limonene
Lim15-I	15		
Lim30-I	30		
Lim50-I	50		
Lim15-II	15	II	
Lim30-II	30		
Lim50-II	50		
EtOH5-I	5	I	Etanolo
EtOH15-I	15		
EtOH30-I	30		
EtOH50-I	50		
EtOH15-II	15	II	
EtOH30-II	30		
EtOH50-II	50		
Hexn5-I	5	I	n-Esano
Hexn15-I	15		
Hexn30-I	30		
Hexn50-I	50		
Hexn15-II	15	II	
Hexn30-II	30		
Hexn50-II	50		
Meox5-I	5	I	2-Meox
Meox15-I	15		
Meox30-I	30		
Meox50-I	50		
Meox15-II	15	II	
Meox30-II	30		
Meox50-II	50		
Cyr5-I	5	I	Cirene
Cyr15-I	15		
Cyr30-I	30		
Cyr50-I	50		
Cyr15-II	15	II	
Cyr30-II	30		
Cyr50-II	50		

*solvente/(solvente+cellulosa)

La Tabella 9 riporta la nomenclatura utilizzata per far riferimento a ciascun test, per ogni fase di ciascun solvente.

L'esperimento è stato condotto seguendo la procedura riportata nel paragrafo 3.3. Ogni reattore è stato caricato come segue: substrato, acqua di diluizione, soluzioni nutrienti e inoculo batterico periodicamente prelevato da un digestore mesofilo attivo e caratterizzato ogni volta in termini di pH, TS (solidi totali) e VS (solidi volatili) (vedi paragrafo 3.3.2).



Figura 24 Reattori batch

La cellulosa microcristallina (CAS 9004-34-6) impiegata per l'esperimento era caratterizzata da un tenore di solidi totali (TS) di $95,2\% \pm 0,08\%$ e di VS di $99,6\% \pm 0,09\%$. I valori di TS, VS e pH iniziali degli inoculi utilizzati in ogni ciclo sono riportati in Tabella 10.

Tabella 10 Caratterizzazione inoculo

Ciclo (Solvente)	Fase	TS [%]	VS [% _{TS}]	pH
d-Limonene	I	4,1 ± 0,02	67,7 ± 0,64	8,00
	II	2,7 ± 0,04	63,6 ± 0,30	7,64
Etanolo	I	4,3 ± 0,03	72,0 ± 0,44	7,69
	II	2,9 ± 0,17	67,2 ± 0,47	7,41
n-Esano	I	5,9 ± 0,04	67,3 ± 0,20	7,66
	II	3,4 ± 0,04	70,9 ± 0,15	7,94
2-Meox	I	1,4 ± 0,12	60,1 ± 0,57	7,60
	II	2,7 ± 0,23	66,2 ± 0,73	7,74
Cirene	I	4,9 ± 0,04	72,2 ± 0,28	7,77
	II	2,1 ± 0,03	63,6 ± 0,08	7,74

NB: gli inoculi impiegati nelle fasi I di ogni ciclo provengono da un digestore anaerobico mesofilo; gli inoculi impiegati nelle fasi II provengono dal mix di digestati della fase precedente.

Le concentrazioni di solvente nei reattori sono dipendenti dalle quantità di substrato, che nei test BMP sono funzione della percentuale di VS dell'inoculo impiegato. Pertanto, esse rappresentano percentuali in peso prestabilite del solvente, ma variano in termini di concentrazione di solvente nella miscela del reattore (in mg/L). In Tabella 11 e Tabella 12 sono riportate le concentrazioni di solvente nei reattori per ogni rapporto S/(S+C), rispettivamente per la fase I e la fase II di ogni ciclo.

Tabella 11 Concentrazione di solvente in mg/L nei reattori batch - fase I

Fase I	Concentrazione [mg/L]			
	5%	15%	30%	50%
Limonene	289	969	2353	5491
Etanolo	318	1065	2586	6033
n-Esano	415	1383	3359	7837
2-Meox	125	419	1018	2376
Cirene	367	1232	2992	6981

Tabella 12 Concentrazione di solvente in mg/L nei reattori batch - fase II

Fase II	Concentrazione [mg/L]		
	15%	30%	50%
Limonene	607	1474	3440
Etanolo	674	1638	3825
n-Esano	701	1703	3974
2-Meox	607	1516	3537
Cirene	467	1135	2649

Durante la fase di analisi dei risultati sono stati esclusi dall'elaborazione dati i valori ottenuti dai reattori considerati outlier, nello specifico un reattore per ogni triplicato di Meox15-II, Meox50-II ed un reattore di controllo nella prima fase del test con cirene.

4.2 Filiera del tonno: Callipo s.r.l.

Gli scarti impiegati nella ricerca sono stati forniti dalla ditta Callipo s.r.l., nata nel 1913 a Pizzo (VV), un'importante realtà dell'imprenditoria calabra. Essa, infatti, è stata la prima in Calabria e tra le prime in Italia ad incasolare il pregiato Tonno del Mediterraneo. Attualmente, il tonno pescato negli oceani viene congelato intero a bordo dei pescherecci e trasferito nello stabilimento di Maierato (VV) dove vengono effettuati i necessari controlli documentali e di qualità e ogni pesce viene adeguatamente selezionato; le fasi successive della linea di lavorazione sono:

- Cottura: Il tonno viene cotto a vapore per mantenere inalterate le caratteristiche organolettiche e i valori nutritivi, viene poi raffreddato, trasferito nelle celle di condizionamento ed asciugato a temperatura controllata.
- Monda: il tonno cotto viene trasferito al reparto monda dove è sottoposto all'attenta pulitura ed alla selezione qualitativa.

- Invasamento: I filetti di tonno vengono invasettati manualmente dagli operatori, con procedimento ancora completamente artigianale ma garantito da importanti misure di sicurezza ed igiene; una volta riempiti, i vasi vengono condotti sotto il dosatore del sale e la colmatrice di olio di oliva.
- Sterilizzazione: i prodotti vengono trasferiti nelle autoclavi per la sterilizzazione.
- Controllo qualità: al termine della fase di sterilizzazione il laboratorio effettua sui campioni verifiche quali la determinazione del peso sgocciolato, la concentrazione di sale, il controllo dell'aggraffatura, le prove di stabilità sul prodotto finito, la rilevazione della temperatura, dell'umidità e dell'istamina, i controlli microbiologici e chimici.
- Confezionamento: su ciascuna confezione viene inserito, in maniera automatizzata, il relativo lotto di produzione.
- Stagionatura: questa fase ha lo scopo di garantire le qualità intrinseche del prodotto a seconda dei formati.



Figura 25 Tonno Yellowfin

Il sistema garantisce la tracciabilità di filiera, in quanto sintetizza le partite di acquisto di ciascun componente del prodotto finito e gli identificativi dei rispettivi fornitori. Per produrre i Filetti di Tonno in vaso di vetro, l'azienda utilizza in media solo il 50% di tutti i tranci lavorati per garantire ai consumatori maggiore qualità. L'azienda utilizza

esclusivamente Tonno Yellowfin, (*Thunnus albacares*) (Figura 25), noto anche come tonno pinna gialla. Questo pesce si distingue per le sue lunghe pinne dorsali gialle, da cui prende il nome. Il corpo del tonno yellowfin è robusto, con una carne che varia dal rosa chiaro al rosso scuro, particolarmente apprezzato per il suo sapore delicato e la consistenza morbida.

4.3 Preparazione dei materiali per il processo di bioraffinazione degli scarti della filiera ittica

I test di valutazione del potenziale metanigeno della cellulosa impregnata di diversi solventi hanno offerto una panoramica più chiara su quali fossero gli effetti di tali solventi sul processo di digestione anaerobica.

Successivamente, sono stati preparati i materiali impiegati nel processo di bioraffinazione proposto nel presente elaborato; essi sono stati forniti direttamente dalla ditta Callipo s.r.l., e si compongono delle parti del tonno non utilizzate per l'alimentazione umana. Sono state prese in esame due differenti tipologie di scarto, le interiora (cuore, fegato, organi interni, ecc.) (Figura 26) principalmente composte da parti molli e ricche di sangue; e le teste (Figura 27), le quali vengono tagliate dal corpo del pesce nella prima fase di lavorazione. Queste ultime sono state lavorate in modo tale da separare le parti molli (cervello, occhi, muscoli, lingua, ecc.) dalle ossa del cranio.



Figura 26 Interiora



Figura 27 Teste di tonno

Tutte le parti molli recuperate sono state impiegate per effettuare diversi test di estrazione di olio di pesce. Precedentemente a questi test esse sono state sottoposte ad una fase preparatoria di pulizia e rimozione del sangue, attraverso lavaggio in acqua e centrifugazione mediante una centrifuga per alimenti, al fine di ottenere un prodotto il più possibile pulito e privo di sangue e altri fluidi. È stata inoltre effettuata una fase di sgocciolatura e asciugatura a temperatura ambiente. Tuttavia, le caratteristiche fisiche dei pesci di grande taglia non permettono una pulizia approfondita. Parte del sangue rimane all'interno di vene e arterie e causa delle difficoltà nell'estrazione dell'olio di pesce. Pertanto, si rende necessario trovare un metodo di pulizia più efficace per la rimozione dei fluidi dai tessuti del pesce.

Le ossa ricavate dalla lavorazione delle teste sono state lavate accuratamente e asciugate prima a temperatura ambiente con l'ausilio di carta assorbente (Figura 28). Successivamente al fine di rimuovere tutta l'acqua in eccesso sono state poste in stufa a 70°C per tre giorni (Figura 29). Infine, sono state triturate mediante l'impiego di un mulino Pulverisette 15 per ottenere un impasto il più possibile omogeneo (Figura 30).



Figura 28 Ossa del tonno, fase di asciugatura



Figura 29 Ossa del tonno



Figura 30 Ossa del tonno triturate, post trattamento a 70°C

Le ossa sono state impiegate come fonte di fosforo in test di precipitazione di struvite; pertanto, dopo la fase di asciugatura è stato effettuato un passaggio in muffola a 550°C per rimuovere tutti i residui organici e ottenere una polvere di ossa dall'aspetto simile al carbone (Figura 31).



Figura 31 Ossa del tonno triturate, post trattamento a 550°C

4.4 Estrazione dell'olio di pesce

La procedura utilizzata per l'estrazione dell'olio di pesce è stata ricavata da Ciriminna et al. [114] ed è sostanzialmente simile a quella riportata nel paragrafo 2.5. Sono stati effettuati diversi cicli di estrazione con differenti solventi per valutarne la capacità di estrazione; lo studio effettuato ha avuto come obiettivo la valutazione del solvente più adatto all'estrazione di olio di pesce, che al contempo non compromettesse il successivo processo di digestione anaerobica. Nello specifico, i solventi utilizzati sono stati: il d-Limonene, in quanto esso è lo stesso solvente utilizzato nello studio da cui è stata ricavata la procedura; l'etanolo, scelto sulla base dei promettenti risultati ottenuti dai test BMP preliminari; il 2-Meox, anch'esso sulla base dei risultati ottenuti dai test preliminari ma anche a causa delle sue proprietà chimico-fisiche; l'olio essenziale, per il suo elevato contenuto di d-Limonene.

L'olio essenziale d'arancia è un olio volatile estratto dalle bucce delle arance, ottenuto principalmente attraverso un processo di spremitura a freddo delle bucce. Questo olio è molto utilizzato in aromaterapia, cosmetica, e nell'industria alimentare per il suo profumo fresco, dolce e agrumato, oltre che per le sue proprietà benefiche. È principalmente composto da d-Limonene, il quale può costituire fino al 90-95% dell'olio essenziale. Sono inoltre presenti altri composti terpenici in quantità minori come mircene e linalolo, e altri composti che conferiscono il tipico e caratteristico odore agrumato (decanale, octanale, citronellale, ecc.) [211].

L'interesse nei confronti dell'impiego dell'olio essenziale di arancia nel presente studio nasce proprio dalla sua composizione. Esso è stato pertanto testato come alternativa più economica rispetto al

monoterpene proposto dallo studio di Ciriminna et. al. (un ordine di grandezza di differenza).

L'olio essenziale è stato fornito da Amedeo Giovanni s.r.l., un'azienda locale (Gallico superiore, RC, Italia) che concentra la sua attività sulla produzione di succhi concentrati e oli essenziali dalla lavorazione degli agrumi.

La procedura adattata è di seguito riportata: 150g di scarti di tonno lavati e asciugati sono stati frullati con 150 g di solvente mantenuto precedentemente a -18 °C e mantenuti per una notte a -18 °C. successivamente è stata aggiunta un'ulteriore aliquota di solvente refrigerato (150 g) ed il composto è stato mantenuto in agitazione per 24 ore a 150 rpm grazie all'ausilio di un incubatore orbitale (Figura 32). L'intera procedura è stata effettuata utilizzando bottiglie di vetro da 1 L, mantenendo uno spazio di testa di circa due terzi della bottiglia.

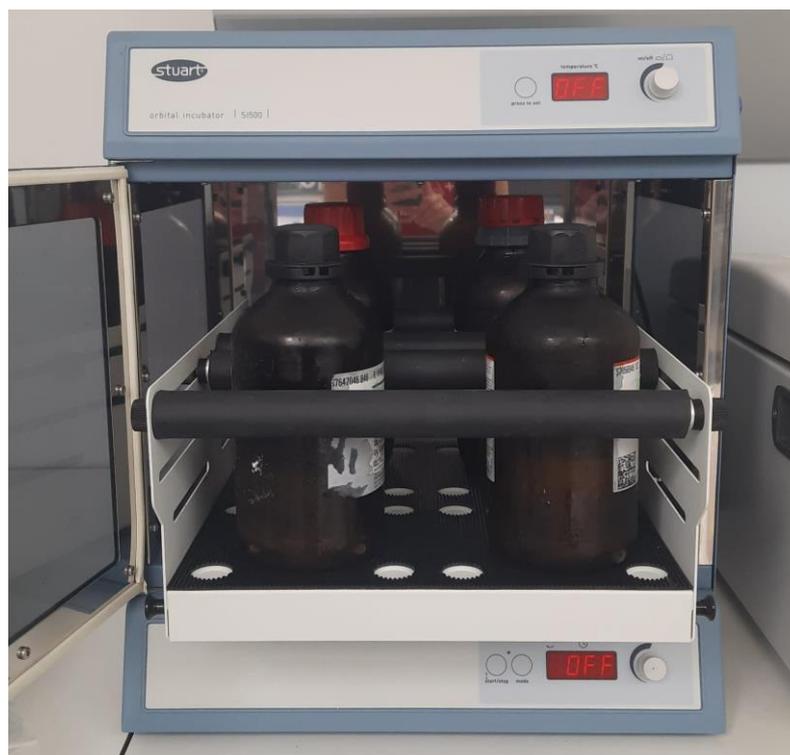


Figura 32 Orbital incubator

Al termine delle 24 ore il contenuto delle bottiglie è stato travasato in dei becher affinché avvenisse la separazione tra la fase solida ed il surnatante. Quest'ultimo è stato separato e filtrato sottovuoto mediante l'impiego di carta filtro. La fase solida, ancora imbevuta della fase liquida, è stata centrifugata per 5 minuti a 10000 rpm, in modo tale da recuperare ulteriore fase liquida e ridurre l'umidità del residuo. In Figura 33 e in Figura 34 sono riportate le fasi liquide e solide post estrazione ottenute dall'impiego di diversi solventi, per estrazioni effettuate rispettivamente da interiora e da teste di tonno.



Figura 33 Estrazione dalle interiora con tre diversi solventi (d-Limonene, 2-Meox, etanolo): Fase solida e fase liquida



Figura 34 Estrazione dalle teste con tre diversi solventi (etanolo, d-Limonene, olio essenziale): Fase solida e fase liquida

Tabella 13 Condizioni di estrazione olio di pesce

CODICE	Solvente	Substrato	Pressione [mbar]	Temperatura [°C]
LIM-I-I	Limonene	Interiora	10	50
LIM-I-II	Limonene	Interiora	10	45
LIM-T	Limonene	Teste	10	45
EtOH-I-I	Etanolo	Interiora	600	70
EtOH-I-II	Etanolo	Interiora	600	70
EtOH-T	Etanolo	Teste	600	70
MEOX-I-I	2-Meox	Interiora	600	70
MEOX-T	2-Meox	Teste	600	50
MEOX-I-II	2-Meox	Interiora	600	50
OlioEss-T	Olio essenziale	Teste	10	45

Sono stati effettuati diversi cicli di estrazione con lo stesso solvente per collezionare abbastanza residuo solido per portare a completamento i successivi test di digestione anaerobica. I test effettuati sono riportati in Tabella 13. Per separare l'olio di pesce e recuperare il solvente impiegato la fase liquida è stata inserita in un pallone rotante collegato ad un evaporatore rotante con pompa da vuoto (Figura 35). Le condizioni di temperatura e pressione sono state modificate sulla base del solvente impiegato. In particolare, è stata utilizzata una pompa da vuoto per raggiungere i 10 mbar per i solventi a più alto punto di ebollizione (d-Limonene e olio essenziale), mentre per etanolo e 2-Meox è stata impiegata una pompa con pressione di lavoro assoluta di 600 mbar. La temperatura è stata modificata per efficientare il processo di estrazione ed evitare di compromettere le proprietà dell'olio. Il solvente è stato

recuperato e potrebbe essere riutilizzato sempre nello stesso processo estrattivo.



Figura 35 Rotavapor

Al termine del processo di estrazione, gli oli sono stati recuperati e collezionati in porta campioni di vetro, sono stati poi filtrati per rimuovere eventuali impurità solide.



Figura 36 Olio di pesce estratto con d-Limonene

4.4.1 Determinazione acidi grassi

La composizione degli acidi grassi degli oli di tonno è stata valutata seguendo il metodo standard che prevede la transesterificazione dei trigliceridi dell'olio e l'analisi GC-MS/GC-FID degli esteri metilici degli acidi grassi rispettivi. Per l'analisi degli acidi grassi, a un campione di 100 mg di olio sono stati aggiunti 2 mL di eptano (CHROMASOLV™, per HPLC, $\geq 99\%$). Gli acidi grassi sotto forma di trigliceridi sono stati transesterificati per ottenere gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) necessari per l'analisi GC-MS, trattando il residuo di grasso con KOH concentrato disciolto in MeOH.

La quantificazione degli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) è stata eseguita con GC-FID, mentre l'identificazione è stata effettuata con standard puri (Mix FAME) analizzati tramite GC-FID e GC-MS utilizzando la NIST Mass Spectral Library.

L'analisi GC-FID è stata eseguita utilizzando uno Shimadzu GC 2010 plus Tracera dotato di rivelatore a ionizzazione di fiamma. Un campione di 0,2 μL della soluzione FAME è stato iniettato nel GC (rapporto di split 148) utilizzando una colonna Mega-10 (Mega, 100 m 0,25 mm id 0,20 μm di spessore del film) con un autocampionatore AOC-20i Shimadzu, utilizzando elio (6.0) come gas vettore (flusso di 0,52 mL/min). Il gradiente di temperatura utilizzato è stato il seguente: la colonna è stata mantenuta per 8 minuti a $T = 165^\circ\text{C}$, dopodiché la temperatura è stata aumentata a un tasso di $2^\circ\text{C}/\text{min}$ fino a 210°C , con un'isoterma finale di 45 minuti. Il tempo complessivo per l'analisi è stato di 75,50 minuti. Le temperature di iniettore e rivelatore erano entrambe impostate a 250°C .

L'analisi GC-MS è stata eseguita utilizzando uno spettrometro di massa Shimadzu single quadrupole GC/MS QP2010 Ultra. Un campione di 1 µL della soluzione FAME è stato iniettato nel GC (rapporto di split 38) utilizzando una colonna SP-2380 (Supelco, 100 m 0,25 mm id 0,20 mm di spessore) con un autocampionatore AOC-20i, utilizzando elio (6.0) come gas vettore (flusso di 0,59 mL/min). Il gradiente di temperatura utilizzato è stato lo stesso dell'analisi GC-FID. L'iniettore era a 250 °C. Dopo la sintonizzazione automatica, la tensione del moltiplicatore di elettroni è stata impostata a 70 eV. I dati sono stati acquisiti nell'intervallo m/z 20–500 a 0,30 s per scansione, mantenendo la sorgente ionica a 270 °C. I tempi di ritenzione e i dati di massa dei frammenti molecolari ottenuti sono stati elaborati utilizzando il software dello strumento. Tutti i composti FAME sono stati identificati mediante confronto critico con i dati spettrali di massa della NIST 11 Mass Spectral Library.

4.5 Test in semi-continuo

Il residuo solido ottenuto dall'estrazione è stato utilizzato come substrato per test di co-digestione anaerobica in semi-continuo. Il co-substrato preso in esame è costituito da code di cipolla, provenienti da cipolle di coltivazione locale. Questa scelta è stata effettuata inseguendo due principali obiettivi: la ricerca di un substrato con alto contenuto di carbonio, che andasse a bilanciare la presenza di azoto degli scarti del pesce, e la volontà di promuovere un processo che rispecchiasse le esigenze della realtà del territorio calabro, in accordo con i principi di sostenibilità locale. Le code di cipolla sono infatti un sottoprodotto altamente presente, in quanto la Calabria è famosa per la produzione di cipolle di qualità, peraltro, nella stessa zona in cui sono numerosi anche gli stabilimenti di produzione del tonno.

4.5.1 Caratterizzazione dei materiali utilizzati nei test in semi-continuo

I materiali impiegati nel test di digestione anaerobica in semi-continuo sono stati inizialmente caratterizzati in termini di TS, VS, seguendo la procedura riportata nel paragrafo 3.3.2. I materiali caratterizzati sono stati: scarti di tonno tal quali e provenienti dai cicli di estrazione di olio di pesce con d-Limonene, 2-Meox, etanolo e olio essenziale; code di cipolla impiegate come co-substrato; inoculo batterico. Inoltre, è stato misurato il pH iniziale dell'inoculo che è risultato essere pari a 7,77. In Tabella 14 sono riportati i valori di TS e VS per ogni materiale impiegato.

Tabella 14 Caratterizzazione iniziale

Materiale	TS [%]	VS [% _{TS}]
Inoculo	4,4±0,15	65,7 ± 1,03
Code di cipolla	11,3 ± 0,49	89,6 ± 1,28
Scarti del tonno tal quali	42,0 ± 3,52	93,2 ± 2,80
Scarti del tonno da estrazione con d-Limonene	21,0 ± 0,82	86,8 ± 5,85
Scarti del tonno da estrazione con 2-Meox	20,0 ± 0,14	80,9 ± 6,71
Scarti del tonno da estrazione con etanolo	37,3 ± 1,68	92,8 ± 0,91
Scarti del tonno da estrazione con olio essenziale	28,3 ± 0,69	85,2 ± 0,55

Gli scarti di tonno ottenuti dalle estrazioni di olio di pesce effettuate mediante l'impiego di 2-Meox, d-Limonene ed etanolo sono stati analizzati per misurarne la concentrazione di solvente residuo nel substrato.

È stato impiegato un metodo di estrazione liquido-solido per isolare e quantificare i solventi presenti. Inizialmente 2g di campione sono stati pesati e trasferiti in un pallone di vetro, a questi sono stati aggiunti 10 ml di soluzione composta da etil acetato contenente toluene in concentrazione 1g/L (utilizzato come standard interno), il rapporto solido-liquido è stato infatti posto pari a 1:5.

Il pallone contenente le due fasi è stato mantenuto in agitazione per un'ora a 1500 rpm, per permettere al solvente residuo di essere estratto in modo efficiente dal campione solido. Al termine dell'agitazione, il contenuto del pallone è stato fatto decantare al fine di recuperare la fase liquida.

Successivamente è stato aggiunto alla fase liquida del sodio fosfato anidro per rimuovere eventuali tracce di acqua e rendere il campione adatto per l'analisi GC. Infine, il campione è stato filtrato mediante filtro 0,45 µm e sottoposto ad analisi GC.

I risultati riportati in Tabella 15 rappresentano la concentrazione di ogni solvente nel residuo di pesce ottenuto dai test di estrazione di olio di pesce effettuati con d-Limonene, 2-Meox ed etanolo. Essi sono espressi come milligrammi di solvente su grammi di residuo solido.

Tabella 15 Concentrazione di solvente nei residui solidi ottenuti dal processo di estrazione dell'olio di pesce

Solvente	Concentrazione [mg/g]
d-Limonene	68,4
2-Meox	13,8
Etanolo	300,7

Si può ipotizzare che le differenze nelle concentrazioni di solvente residuo nella fase solida potrebbero derivare da vari fattori legati alle proprietà fisico-chimiche dei solventi utilizzati e alla natura della matrice solida. Ad esempio, solventi con differenti polarità interagiscono in modo diverso con la matrice solida. L'etanolo, essendo un solvente polare, tende a aderire di più ai componenti polari del residuo solido rispetto a solventi apolari. Un ulteriore fattore che può influenzare la concentrazione di solvente nel residuo solido di estrazione è il punto di ebollizione. Il 2-Meox, oltre ad essere un solvente medio-polare, ha un punto di ebollizione significativamente più basso del d-Limonene, questo potrebbe spiegare la ridotta presenza di 2-Meox rispetto agli altri due solventi.

4.5.2 Avvio e svolgimento del test

Sono stati predisposti sei reattori BRS (BioReactor Simulator) della Bioprocess Control che simulano i processi di digestione anaerobica in continuo e semi-continuo. Il sistema prevede reattori dal volume di 2 L forniti di un agitatore meccanico dalla potenza regolabile, un tubo di alimentazione ed uno di scarico del digestato (Figura 37).

Il sistema in continuo consente di alimentare i reattori tramite il canale di ingresso, mentre un volume equivalente di digestato fuoriesce grazie all'effetto sifone dal tubo di uscita, in quanto il sistema è progettato per mantenere costante il volume all'interno del reattore. I reattori sono mantenuti in condizioni mesofile tramite un bagno termostatico (35 °C). Sono inoltre collegati tramite dei tubi di captazione di biogas a delle trappole di NaOH che catturano l'anidride carbonica secondo il principio

esposto nel paragrafo 3.3.6. Il gas rimanente, composto quasi esclusivamente da metano (altri gas in tracce), viene inviato in un sistema che ne permette la misurazione automatica, basata su una matrice di flussimetri brevettata che utilizza i principi di spostamento dell'acqua e di galleggiamento. Il design dell'esperimento è riportato in Tabella 16.



Figura 37 Reattori in semi-continuo

Tabella 16 Design dell'esperimento

Reattore	Substrato
A	100% _{VS} code di cipolla
B	70% _{VS} code di cipolla 30% _{VS} scarti del tonno tal quali
C	70% _{VS} code di cipolla 30% _{VS} scarti del tonno da estrazione con d-Limonene
D	70% _{VS} code di cipolla 30% _{VS} scarti del tonno da estrazione con 2-Meox
E	70% _{VS} code di cipolla 30% _{VS} scarti del tonno da estrazione con etanolo
F	70% _{VS} code di cipolla 30% _{VS} scarti del tonno da estrazione con olio essenziale

Nello specifico: il reattore A è stato alimentato esclusivamente con code di cipolla, al fine di valutare se la co-digestione fosse effettivamente in grado di migliorare la produzione di metano derivante da questo substrato. Il reattore B è stato alimentato con code di cipolla e scarti del pesce (parti molli) non trattate ulteriormente; tale reattore è stato utilizzato come controllo per verificare se il processo di estrazione dell'olio di pesce e la presenza dei solventi causassero variazioni in termini di produzione di metano. I reattori C, D, E ed F sono stati alimentati tutti con code di cipolla e rispettivamente scarti imbevuti di d-Limonene, 2-Meox, etanolo e olio essenziale. Il rapporto tra le code di cipolla e gli scarti del pesce è stato fissato per ogni reattore in co-digestione pari a 70:30 sulla base dei solidi volatili. Il carico organico (OLR) è stato fissato a 1 g_{VS}·L⁻¹·d⁻¹, mentre il tempo di residenza idraulico (HRT) è stato posto dapprima pari a 14 giorni, successivamente al termine di due HRT è stato variato per un ulteriore

HRT di 21 giorni. Tale variazione ha permesso di indagare l'effetto della modifica del tempo di residenza sulla produzione di metano e sulla stabilità dell'intero processo.

L'alimentazione è stata effettuata cinque giorni a settimana e il substrato alimentato era pari a 7/5 dell'alimentazione corrispondente a $1 \text{ gvs}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. In questo modo è stato possibile fornire durante i giorni feriali anche il substrato necessario al sostentamento durante i giorni di chiusura del laboratorio. Nella Tabella 17 sono riportati i valori in grammi dei substrati impiegati per l'alimentazione giornaliera e il volume di diluente (acqua) impiegati per soddisfare un HRT dapprima di 14 giorni e successivamente di 21.

Tabella 17 Alimentazione giornaliera

Reattore	Solvente	Scarti del pesce [g]	Code di cipolle [g]	V diluente (HRT 14 d) [mL]	V diluente (HRT 21 d) [mL]
A	-	-	26,3		
B	-	2,0			
C	Limonene	4,4		190	127
D	2-Meox	4,9	18,4		
E	Etanolo	3,3			
F	Olio essenziale	2,3			

La prova è stata avviata il 9 giugno 2024 ed ha avuto durata complessiva di 51 giorni. Tre giorni prima dell'avvio i reattori sono stati riempiti con 1 L di inoculo proveniente da un digestore anaerobico mesofilo e avente

pH iniziale pari a 7,77, sono stati inoltre aggiunti 900 ml di acqua; tale operazione permette ai batteri di acclimatarsi e consumare eventuale carbonio endogeno ancora presente nell'inoculo. Il pH del digestato veniva misurato giornalmente ed ogni qualvolta raggiungeva valori inferiori a 6,6 venivano somministrati 2 g/L di NaHCO₃ per fornire capacità tampone al sistema e scongiurare l'acidificazione del reattore.

Il digestato è stato collezionato settimanalmente ed analizzato in termini di TS, VS, VFA e FOS/TAC, seguendo le procedure riportate nei paragrafi 3.3.2 e 3.2.3. Inoltre, il digestato residuo è stato impiegato in contemporanei test di fitotossicità e test di estrazione di struvite.

4.6 Test di fitotossicità

Il digestato settimanale proveniente dai reattori B, C, D ed E è stato impiegato in test di fitotossicità per valutare l'effetto dei solventi sulla capacità fertilizzante del digestato.

L'esperimento è stato effettuato su piante di peperoncino Diavolicchio, una varietà tipicamente calabrese. Ad ogni reattore è stato associato un vaso, tre piante per vaso sono state messe in dimora giorno 10/06/2024 in vasi di 30 cm diametro. Ciascun vaso è stato settimanalmente irrigato con una miscela composta da 50% di acqua e 50% di campione composito di digestato settimanale. È stato inoltre predisposto un vaso di controllo irrigato con una soluzione di nitrato d'ammonio dalla concentrazione di 150mg/L di azoto.

Durante l'arco dell'intero esperimento è stata misurata l'umidità del terreno prima e dopo l'irrigazione mediante l'impiego di un misuratore da giardinaggio. Con lo stesso strumento è stato inoltre misurato il pH

settimanale, in triplicato, con l'accortezza di effettuare la misura nei punti congiungenti le tre piante.

Al termine dell'esperimento le piante sono state prelevate e sono state effettuate le seguenti misure:

- peso finale della pianta;
- lunghezza della parte epigea (parte sopra il suolo): misurata dalla base della pianta alla punta più alta;
- lunghezza della parte ipogea (radici): misurata dalla base della pianta fino alla punta più lunga delle radici;
- lunghezza totale della pianta: somma della lunghezza della parte epigea e ipogea;
- diametro del fusto: misurato alla base del fusto;
- numero di foglie;
- peso della biomassa secca: le piante sono state essiccate a 50°C e pesate per determinare la biomassa secca.



Figura 38 Messa in dimora delle piantine - Misuratore di pH e umidità

Tabella 18 Test di fitotossicità

Vaso	Solvente residuo nel digestato	Rapporto H ₂ O:digestato
Bianco	-	100*:0
B	-	50:50
C	Limonene	50:50
D	2-Meox	50:50
E	Etanolo	50:50

*soluzione di NH₄NO₃

4.7 Valorizzazione del digestato per la produzione di struvite

Sono stati eseguiti esperimenti di precipitazione della struvite dai digestati provenienti dai reattori B (controllo) e C (scarti del pesce imbevuti in d-Limonene), nello specifico i campioni di digestato prelevati giornalmente sono stati collezionati e conservati a -18°C per un arco di tempo pari ad un HRT (14 giorni). Il digestato proveniente da digestione anaerobica di scarti del tonno può costituire una buona fonte di ammonio e la precipitazione della struvite può favorire la stabilizzazione dell'ammonio per l'impiego in agricoltura.

Il residuo osseo ottenuto dalla separazione delle parti molli dalle teste di tonno, post trattamento a 550°C , è stato utilizzato come fonte di fosforo per la precipitazione della struvite. 10 g di residuo osseo sono stati mantenuti in agitazione per 12 ore con 90 mL di H_2O e 10 mL di H_2SO_4 concentrato, al fine di solubilizzare il fosforo. L'acido solforico è stato impiegato per limitare la solubilizzazione del calcio dalla farina d'ossa, mantenendolo prevalentemente nella forma insolubile di CaSO_4 . La fase liquida ricca di fosforo disciolto è stata separata per centrifugazione (10 min 4000 rpm).

La fonte di magnesio impiegata è una soluzione di $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (13,5 g/50 mL), un sottoprodotto della produzione di sale da cucina.

La caratterizzazione dei digestati e del residuo osseo in termini di pH e concentrazioni di N-NH_4^+ , P-PO_4^{3-} , Mg^{2+} sono riportate in Tabella 19.

Tabella 19 Caratterizzazione materiali per la precipitazione di struvite

Campione	pH	N-NH ₄ ⁺ [mg/L]	P-PO ₄ ³⁻ [mg/L]	Mg ²⁺ [mg/L]
Digestato B	7,40	420,6	20,0	66,8
Digestato C	7,30	647,4	23,5	68,8
Residuo osseo calcinato a 550°C	-	-	12345,6	-

Sono state effettuate diverse prove al variare del pH e del rapporto molare tra N, P e Mg al fine di individuare la combinazione migliore per la precipitazione di struvite. Le prove sono state effettuate a pH 9 e 10 per entrambi i digestati e sono stati testati rapporti N:P e N:Mg pari a 1, 1,1, 1,3 e 1,5. In Tabella 20 sono schematizzate le prove effettuate.

Tabella 20 Prove di precipitazione della struvite

Codice	pH	Campione	N/P	H ₃ PO ₄ [mL]	N/Mg	MgCl ₂ *6H ₂ O [mL]
B9_1	9	Digestato B	1	3,7	1	1,2
B9_1.1			1,1	4,1	1,1	1,4
B9_1.3			1,3	4,8	1,3	1,6
B9_1.5			1,5	5,5	1,5	1,9
B10_1			1	3,7	1	1,2
B10_1.1	10		1,1	4,1	1,1	1,4
B10_1.3			1,3	4,8	1,3	1,6
B10_1.5			1,5	5,5	1,5	1,9
C9_1			9	Digestato C	1	5,7
C9_1.1	1,1	6,3			1,1	2,2
C9_1.3	1,3	7,4			1,3	2,6
C9_1.5	1,5	8,6			1,5	3,0
C10_1	10				1	5,7
C10_1.1			1,1	6,3	1,1	2,2
C10_1.3			1,3	7,4	1,3	2,6
C10_1.5			1,5	8,6	1,5	3,0

La procedura impiegata è la seguente: 50 mL di digestato venivano versati in un becher da 100 mL e mantenuti in agitazione con misurazione costante del pH, una quantità predeterminata di cloruro di

magnesio veniva additivata al digestato e successivamente veniva aggiunta la soluzione con fosforo estratto dai residui ossei; contemporaneamente veniva additivata una soluzione di NaOH 4 N per raggiungere il pH desiderato. Le quantità relative ad ogni prova sono riportate in Tabella 20. Tali quantità sono state calcolate sulla base della concentrazione di azoto, fosforo e magnesio presenti dei tre materiali impiegati, al fine di ottenere i rapporti molari predefiniti all'interno della soluzione finale. Le miscele di reazione sono state mantenute costantemente in agitazione per altri 20 min dopo il completamento dell'aggiunta dei reagenti. Tutti gli esperimenti sono stati condotti a temperatura ambiente e pressione atmosferica.

Al termine della prova, 50 ml della miscela sono stati centrifugati per 10 min a 4000 rpm, la fase liquida è stata quindi campionata per determinazioni analitiche.

Le concentrazioni di azoto ammoniacale e fosforo e magnesio sono state misurate mediante metodi spettrofotometrici UV e spettrofotometria ad assorbimento atomico (GBC Scientific Equipment, Braeside (Victoria), Australia) prima e dopo la procedura di estrazione [212].

Il rendimento di rimozione di azoto e fosforo è stato calcolato come la differenza tra le concentrazioni finali e iniziali rapportate a quelle iniziali.

5 RISULTATI E DISCUSSIONE SULLA PRODUZIONE DI BIOPRODOTTI E BIOENERGIA

In questo capitolo vengono presentati i risultati ottenuti dagli esperimenti condotti durante l'intero studio, in cui è stato proposto un processo di bioraffinazione degli scarti del tonno e con l'obiettivo di ottenere come prodotti olio di pesce, biometano e fertilizzanti.

Nella prima parte del capitolo, vengono discussi i risultati dei test di biometanazione, effettuati per valutare in fase preliminare l'effetto di diversi solventi sul processo di digestione anaerobica. Da questo studio sono state tratte le conclusioni necessarie per scegliere quali solventi impiegare nelle fasi successive della ricerca.

Successivamente sono riportati i risultati dell'estrazione dell'olio di pesce, dove vengono confrontate le caratteristiche dei diversi oli estratti dagli scarti del tonno.

Il capitolo prosegue con i test di digestione anaerobica in semi-continuo, in cui sono stati impiegati come substrati i residui delle estrazioni dell'olio di pesce, assieme ad un co-substrato comune, le code di cipolla.

Viene poi presentata l'analisi dei test di fitotossicità, che esamina l'impatto del digestato proveniente dai test in semi-continuo, utilizzato come fertilizzante sulle piante.

Infine, il capitolo si conclude con i risultati dei test per la produzione di struvite, esplorando la fattibilità e l'efficacia di questo processo come metodo di valorizzazione del digestato.

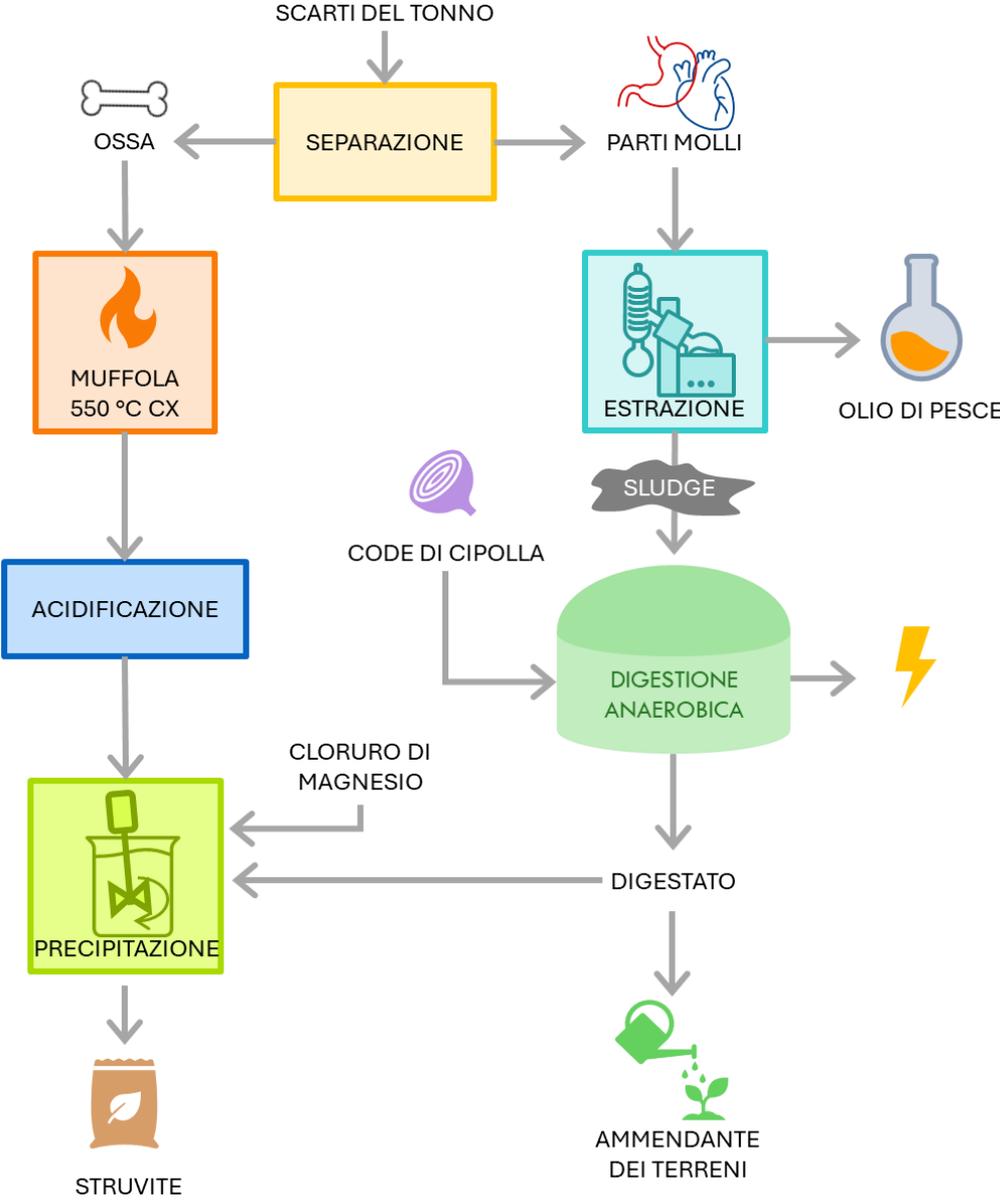


Figura 39 Schema di processo

5.1 Risultati dei test di biometanazione

Nel presente paragrafo sono discussi i risultati dei test BMP effettuati per valutare gli effetti di d-Limonene, etanolo, n-esano, 2-Meox e cirene sul processo di digestione anaerobica. Saranno preliminarmente presentati i risultati in termini di produzione netta cumulata di metano e le analisi effettuate sul digestato al termine dell'esperimento per ogni ciclo. Inoltre, vengono analizzati i parametri ottenuti mediante l'impiego di due modelli cinetici. Infine, viene esposta una panoramica di tutti i BMP ottenuti, confrontando i risultati di ogni ciclo.

5.1.1 Produzione di metano

La Figura 40 mostra le curve di produzione cumulata di metano nel corso dei 25 giorni di test, ottenute dalle medie dei batch in triplicato contenenti cellulosa microcristallina impregnata con d-Limonene a diverse concentrazioni. Come si può notare, il d-Limonene esercita un effetto inibitorio che diventa sempre più evidente con l'aumentare della concentrazione. Questo comportamento è ben documentato, poiché il d-Limonene a causa delle sue proprietà antibatteriche è riconosciuto come significativo inibitore della digestione anaerobica. A una concentrazione del 50% di d-Limonene, l'attività microbica è totalmente compromessa, portando alla completa inibizione del reattore. Questo è evidente anche dal grafico, dove la curva di Lim50-I mostra valori negativi, poiché alla produzione lorda di metano, risultata nulla, è stata sottratta la produzione endogena. Per concentrazioni di d-Limonene al 5% e al 15%, la produzione cumulata di metano è vicina al valore teorico per la cellulosa microcristallina, raggiungendo rispettivamente $323 \text{ NmL/gvs} \pm$

6% e $298 \text{ NmL/gvs} \pm 3\%$. Tuttavia, con un tenore di solvente al 30%, la produzione di metano è significativamente ridotta. Nello specifico, si è osservata una riduzione del 11, 17, 40% nella produzione specifica cumulata di metano rispettivamente a un $S/(S + C)$ di 5, 15 e 30% di solvente, rapportate al valore medio di cellulosa non impregnata dello stesso ciclo ($364 \pm \text{NmL/gvs}$).

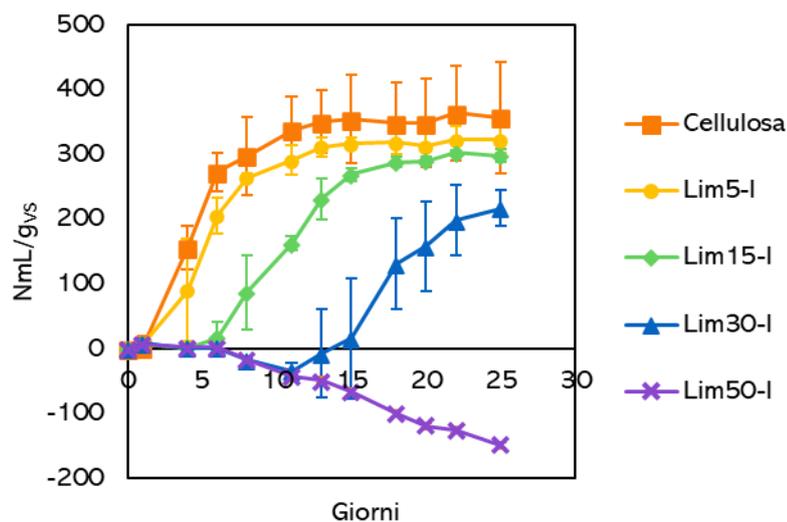


Figura 40 Produzione netta cumulata di metano - *d*-Limonene I fase

Tuttavia, nella II fase (Figura 41), tutti i reattori hanno mostrato produzioni cumulate di metano superiori a quelle determinate nella I fase; infatti, le riduzioni percentuali di produzione specifica cumulata di metano sono state del 7%, 10% e 52% rispettivamente a un $S / (S + C)$ di 15%, 30% e 50% di solvente, indicando che i batteri erano già adattati alla presenza di *d*-Limonene. Tuttavia, anche in questo caso, per un $S/(S + C)$ del 50%, l'inibizione è evidente. Dai risultati è evidente che il secondo test BMP (con inoculo riciclato) ha mostrato risultati migliori per ogni concentrazione di *d*-Limonene, questo mostra la capacità dei batteri di adattarsi alla presenza del solvente, ed inoltre, è plausibile pensare che tra le due fasi non ci sia stato un accumulo del solvente;

questo potrebbe essere causato dalla degradazione del d-Limonene in p-cimene, un terpene considerato meno attivo contro i batteri rispetto al suo precursore [213], è inoltre plausibile pensare che il solvente sia in parte evaporato durante la I fase del test [50].

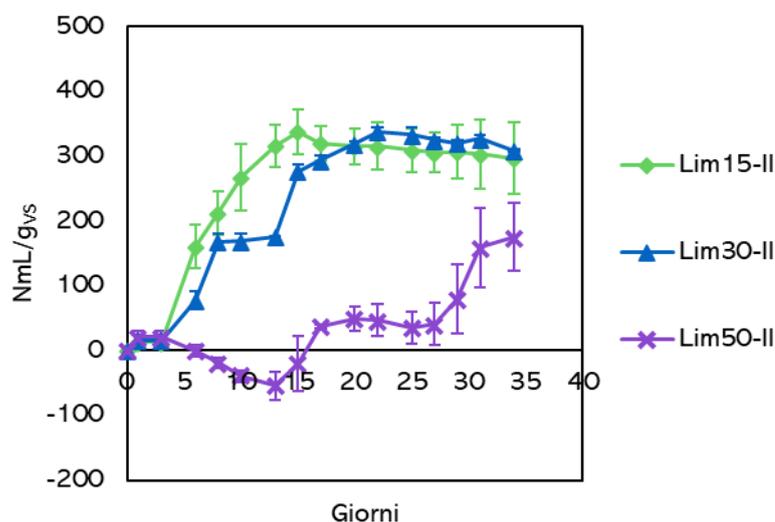


Figura 41 Produzione netta cumulata di metano - d-Limonene II fase

Nei test BMP in cui è stato utilizzato l'etanolo come solvente, i grafici di produzione cumulata di metano evidenziano un aumento della produzione con l'incremento delle concentrazioni di EtOH (Figura 42). La maggiore produzione cumulata di metano è associata alla cellulosa microcristallina imbevuta con il 50% di etanolo che risulta pari a 721 NmL/gvs \pm 26%, seguito dal campione al 30% (568 \pm 14% NmL/gvs), al 15% (482 \pm 7% NmL/gvs) e infine al 5% (441 \pm 4% NmL/gvs).

Questo fenomeno può essere spiegato principalmente da due fattori: l'etanolo è stato utilizzato dai microrganismi sia come substrato aggiuntivo, essendo biodegradabile, sia come additivo che favorisce il processo di digestione anaerobica. È noto, infatti, che l'etanolo ha la capacità di stimolare le comunità microbiche coinvolte nel trasferimento diretto interspecie di elettroni (DIET), come evidenziato da studi recenti [64], [65]. In particolare, il pretrattamento di fanghi attivi tramite

fermentazione biologica con etanolo ha dimostrato un incremento significativo nella produzione di metano, con una maggiore conduttanza del fango pretrattato, a indicare l'attivazione del metabolismo sintrofico DIET [210].

L'etanolo si è rivelato un solvente capace di stimolare il processo di digestione anaerobica, come indicato dall'aumento della produzione di metano ben oltre la media rispetto alla sola cellulosa microcristallina, con un incremento della produzione di metano che varia tra il 32% e oltre il 115%. Tuttavia, aumentando la concentrazione di etanolo, non solo si osserva un incremento della produzione di metano dovuto alla parziale degradazione dell'etanolo stesso, ma anche un aumento della deviazione standard dei campioni. In generale, un'alta deviazione standard rappresenta una forte variabilità dei dati, e quindi un comportamento disomogeneo tra i reattori che compongono un triplicato; questo può rappresentare un processo di digestione anaerobica disturbato, pertanto, anche se i risultati ottenuti dallo studio sull'etanolo sono promettenti, è possibile affermare che il solvente possa comportare degli effetti negativi in termini di stabilità del processo.

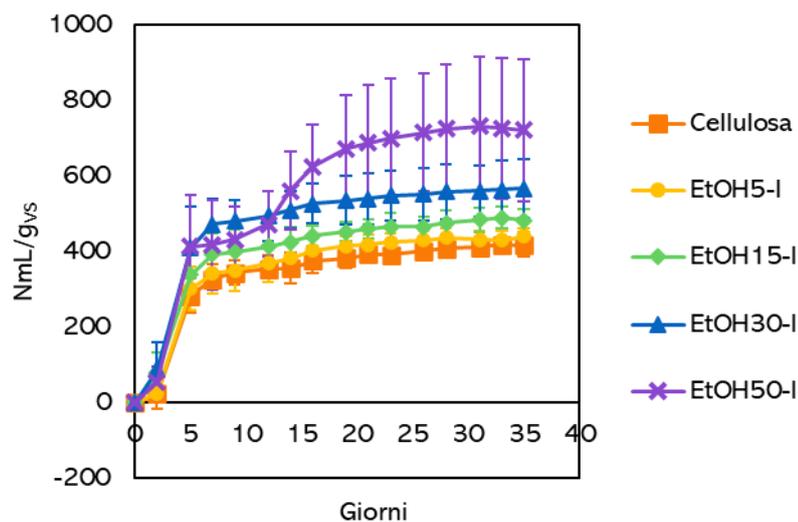


Figura 42 Produzione netta cumulata di metano - Etanolo I fase

Durante la fase I, i reattori EtOH50-I hanno raggiunto il più alto BMP medio, nonostante abbiano mostrato una fase di adattamento prolungata fino al quindicesimo giorno. Nella fase II, i reattori EtOH50-II hanno seguito una tendenza simile, con una produzione iniziale di metano paragonabile agli altri reattori, seguita però da una lunga fase di ritardo fino al ventesimo giorno del test, e una produzione finale inferiore rispetto alla fase precedente. Con il secondo ciclo di digestione anaerobica, infatti, si evidenziano gli effetti dovuti all'accumulo di etanolo all'interno dei reattori. Nei reattori EtOH15-II e EtOH50-II la produzione rientra nel range di produzione della cellulosa e la variabilità dei dati è molto accentuata, attestandosi rispettivamente ai valori di $419 \text{ NmL/gvs} \pm 41\%$ e $422 \text{ NmL/gvs} \pm 86\%$, e ciò è indice del fatto che il solvente può interferire con il processo degradativo causando instabilità. Tuttavia, con una percentuale di solvente del 30% la produzione di metano risulta quasi raddoppiata rispetto al valore teorico della cellulosa e la deviazione standard è fortemente contenuta ($308 \text{ NmL/gvs} \pm 1\%$), mostrando un incremento del 17% nella produzione di metano rispetto alla fase I.

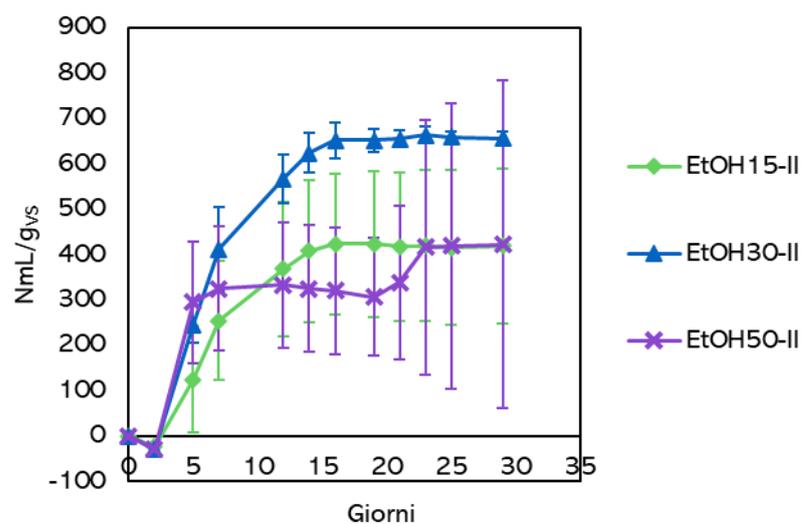


Figura 43 Produzione netta cumulata di metano - Etanolo II fase

Questi risultati suggeriscono che, fino a una concentrazione di etanolo pari al 30% del rapporto S/(S+C), il solvente non solo è tollerato ma viene anche degradato efficacemente durante il processo di digestione anaerobica. Tuttavia, alla concentrazione massima, l'etanolo, probabilmente in combinazione con i residui già presenti nell'inoculo, ha interferito significativamente con la produzione di metano. Sebbene le produzioni di metano rimangano superiori rispetto a quelle ottenute con cellulosa non trattata, le barre di errore indicano una variabilità considerevole tra i risultati ottenuti.

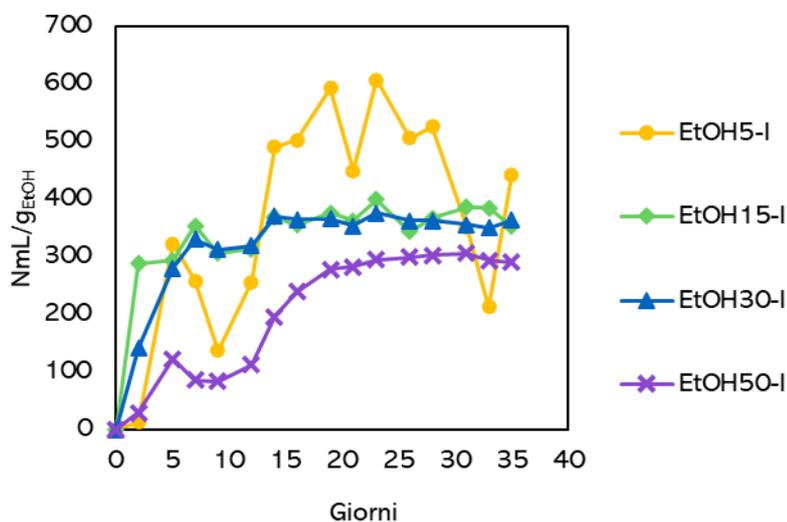


Figura 44 Produzione netta cumulata di metano, riferita al solo etanolo - Etanolo I fase

La Figura 44 mostra l'andamento della produzione cumulata netta di metano attribuita unicamente all'etanolo, ottenuta come differenza rispetto alla produzione media dai reattori alimentati solo con cellulosa durante la fase I. Si può notare che i reattori E15-I ed E30-I hanno avuto rese simili, mentre i reattori E50-I hanno mostrato una resa inferiore e un andamento disturbato; per quanto riguarda la curva dei reattori E5-I, essa mostra un andamento disturbato a causa del suo andamento estremamente vicino a quello della cellulosa non impregnata, pertanto

rapportando la differenza tra le due curve ai grammi di etanolo utilizzati, la curva risultante mostra in maniera enfatizzata le differenze tra i due test. Non è pertanto possibile effettuare considerazioni significative, tuttavia, come è evidente dal grafico, la curva di EtOH-5% si mantiene per lo più al di sopra delle altre. Tale grafico suggerisce che la produzione specifica di metano da etanolo sia strettamente connessa alla quantità di etanolo presente nel reattore, maggiore è l'etanolo presente, minore è la produzione specifica di metano.

Per calcolare la produzione teorica di metano derivante dalla biodegradazione dell'etanolo è stata utilizzata la ben nota equazione di Buswell, descritta nel paragrafo 3.4. La Tabella 21 mostra che nel reattore E5-I è stata raggiunta una biodegradazione del solvente pari all'81%; questa percentuale diminuisce con l'aumentare della concentrazione di etanolo, a conferma di quanto evidenziato dalla produzione specifica di metano rispetto al solo etanolo. Pertanto, si può dedurre che, sebbene l'etanolo sia un substrato interessante per i processi di bioraffinazione, esso possa rappresentare un fattore di disturbo del processo di digestione anaerobica al crescere della sua percentuale.

Tabella 21 Comparazione tra BMP teorico ed empirico

S/(S+C) EtOH	BMP empirico [NmL/g _{EtOH}]	BMP-Buswell [mL/g _{EtOH}]	Rapporto [%]
5 %	592	731	81%
15%	399		55%
30%	376		51%
50%	306		42%

Durante il primo test condotto con n-esano (Figura 45), il reattore Hexn5-I ha mostrato un incremento della produzione di metano di circa

il 30% rispetto al controllo contenente solo cellulosa, indicando che l'n-esano può essere biodegradato. Tuttavia, concentrazioni più elevate di n-esano hanno portato a una riduzione della produzione di metano, suggerendo un effetto inibitorio sul processo di digestione anaerobica a concentrazioni maggiori. In particolare, Hexn50-I ha evidenziato una significativa variabilità, soprattutto nella prima fase del test, con una stabilizzazione solo negli ultimi giorni. Questo indica un forte disturbo del processo, accompagnato da una lunga fase di latenza, come evidenziato dal plateau osservato tra il 12° e il 20° giorno.

Confrontando questi risultati con la seconda fase del test (Figura 46), si nota che Hexn50-II ha registrato un incremento del 35% nella produzione di metano rispetto a Hexn50-I. È plausibile che l'n-esano rimasto dal ciclo precedente sia stato biodegradato o evaporato, consentendo ai batteri sopravvissuti di adattarsi meglio alla presenza del solvente.

Studi precedenti hanno già investigato l'effetto dell'n-esano sulla digestione anaerobica, utilizzando test di tossicità anaerobica in batch su rifiuti microalgali trattati per l'estrazione di lipidi [214]. Da tali studi emerge che concentrazioni di n-esano inferiori a 4 g_{COD}/L (equivalenti a un rapporto S/(S+C) del 30%) hanno un impatto trascurabile, mentre concentrazioni più elevate risultano inibenti. Una concentrazione di 10 g_{COD}/L (leggermente inferiore ad un rapporto S/(S+C) del 50%) ha comportato un lungo periodo di latenza, similmente a quanto osservato nel presente studio. Tuttavia, l'inibizione osservata è risultata essere inferiore, probabilmente a causa delle diverse caratteristiche del substrato utilizzato e del design dell'esperimento.

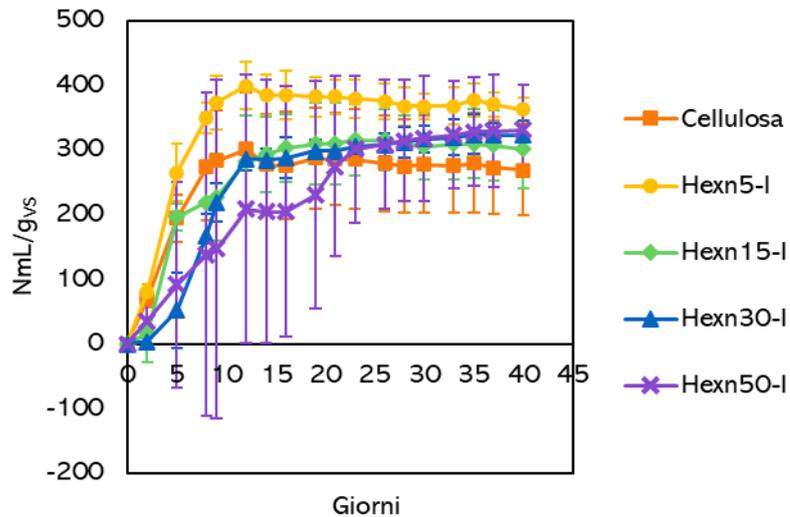


Figura 45 Produzione netta cumulata di metano - n-Esano I fase

La seconda fase del test ha evidenziato una significativa capacità di adattamento dei batteri alla presenza dell'esano. I reattori Hexn15-II hanno mostrato una produzione in termini di metano ($413 \text{ NmL/gvs} \pm 3\%$) analoga a quella teorica, mentre gli altri campioni hanno entrambi registrato un aumento superiore al 34%. In particolare, i reattori Hexn30-II e Hexn50-II mostrano una produzione cumulata specifica pari a $450 \text{ NmL/gvs} \pm 6\%$ e $450 \text{ NmL/gvs} \pm 16\%$, rispettivamente.

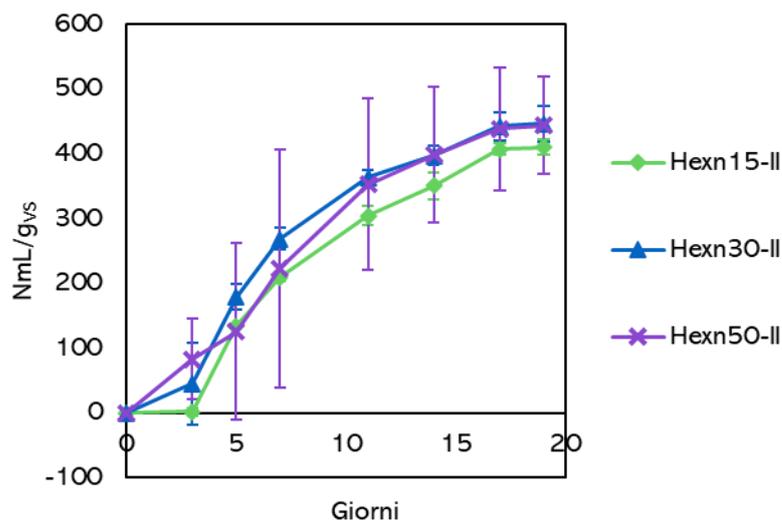


Figura 46 Produzione netta cumulata di metano - n-Esano II fase

Il 2-Meox non sembra aver influenzato negativamente la produzione di metano a basse concentrazioni (Figura 47), dove i valori registrati sono paragonabili, e in alcuni casi superiori, a quelli della sola cellulosa microcristallina. In particolare, alla concentrazione del 5%, la produzione cumulata è stata la più alta, pari a 465 ± 10 NmL/g_{VS}, mentre le concentrazioni superiori hanno evidenziato una forte variabilità dei dati.

Ponendo a confronto i risultati ottenuti tra la prima e la seconda fase (Figura 48) risulta alquanto evidente che le barre di errore siano significativamente contenute nei test effettuati con inoculo precedentemente adattato. Le produzioni di metano ottenute durante la seconda fase sono simili per tutte le concentrazioni testate: $341 \pm 14,0$ NmL/g_{VS}, $340 \pm 28,0$ NmL/g_{VS} e $356 \pm 15,0$ NmL/g_{VS} rispettivamente per un rapporto S/(S+C) del 15%, 30% e 50%. Si può pertanto dedurre che il 2-Meox non influisca significativamente sul processo di digestione anaerobica, specialmente in seguito ad una fase di adattamento batterico.

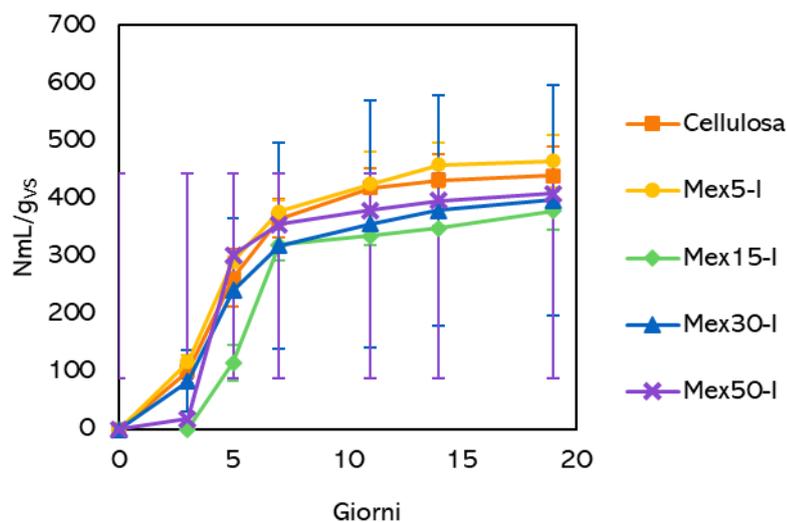


Figura 47 Produzione netta cumulata di metano - 2-Meox I fase

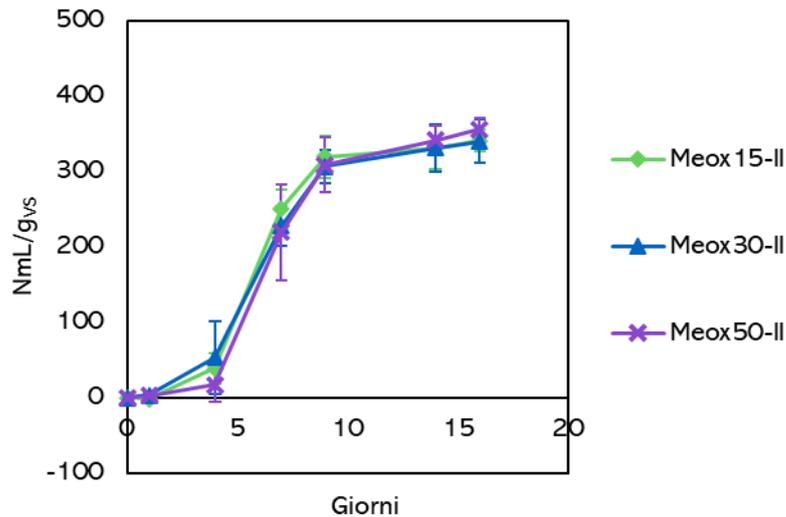


Figura 48 Produzione netta cumulata di metano – 2-Meox II fase

Il substrato celluloso addizionato con cirene ha mostrato una produzione di metano generalmente in linea con quella teorica, sebbene vi siano state alcune variazioni significative. In particolare, la deviazione standard è risultata piuttosto elevata, anche a basse concentrazioni, a eccezione del campione contenente il 50% di cirene. Questo suggerisce che il cirene tende a interferire con il processo di digestione anaerobica. La produzione cumulata più alta è stata registrata nel campione con il 50% di cirene, raggiungendo $372 \text{ NmL/gvs} \pm 13\%$, seguito dal campione al 5% con $368 \text{ NmL/gvs} \pm 41\%$, al 30% con $325 \text{ NmL/gvs} \pm 51\%$, e infine al 15% con $324 \text{ NmL/gvs} \pm 45\%$.

Durante la seconda fase del test, si è osservato un effetto opposto per il cirene, dove le barre di errore si sono ridotte e la produzione di metano è aumentata. Tale fenomeno potrebbe essere spiegato ipotizzando che il solvente venga in minima parte utilizzato come substrato dai batteri, soprattutto nella seconda fase, dove le concentrazioni del 30% e 50% di S/(S+C) ratio hanno portato a una maggiore produzione di metano.

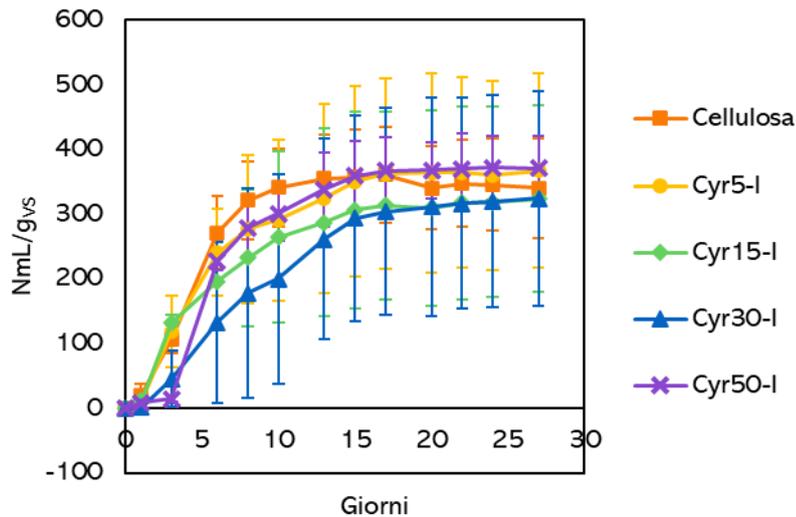


Figura 49 Produzione netta cumulata di metano – Cirene I fase

Con il secondo ciclo di digestione anaerobica, le prestazioni sono migliorate, specialmente alle concentrazioni più elevate, suggerendo che i microrganismi abbiano iniziato ad adattarsi alla presenza del cirene, riuscendo anche a degradarlo in parte. I reattori Cyr15-II hanno mostrato una produzione cumulata di $317 \text{ NmL/gvs} \pm 21\%$, comparabile a quella della cellulosa microcristallina di riferimento. Gli altri campioni hanno registrato un aumento della produzione superiore al 30%, Cyr30-II che ha raggiunto $461 \text{ NmL/gvs} \pm 2\%$ e Cyr50-II che ha prodotto $438 \text{ NmL/gvs} \pm 28\%$.

Inoltre, la variabilità tra i risultati ottenuti nel secondo ciclo è stata decisamente più contenuta rispetto al primo, indicando una maggiore stabilità del processo degradativo.

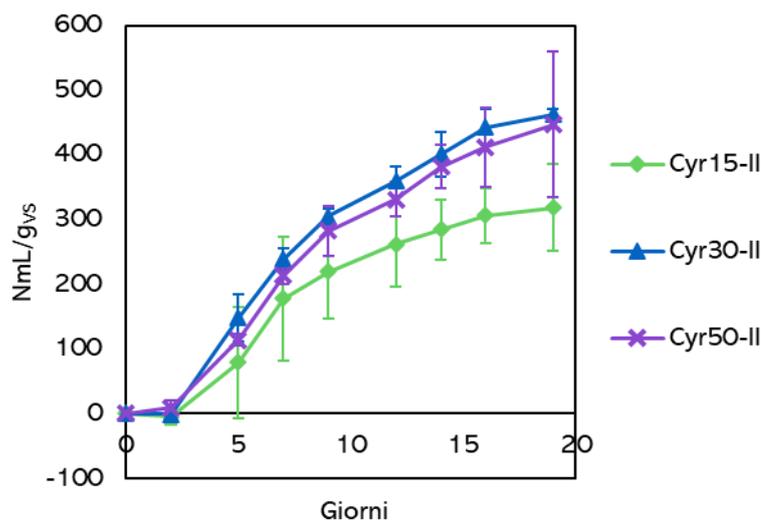


Figura 50 Produzione netta cumulata di metano – Cirene II fase

5.1.2 Comparazione dei risultati

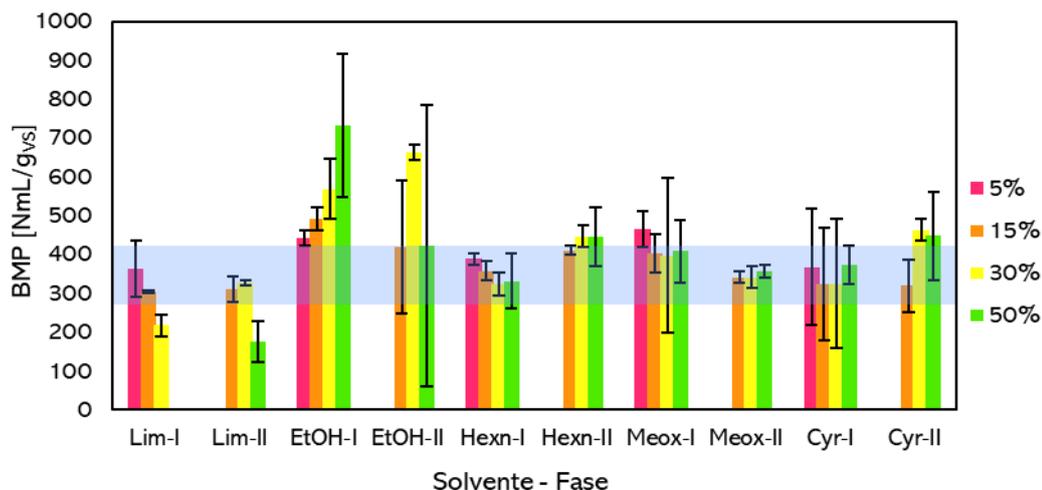


Figura 51 Confronto tra i BMP di ogni ciclo

Nella Figura 51 sono riportati i risultati in termini di massima produzione di metano di tutti i batch test effettuati con i diversi solventi, unitamente alla fascia corrispondente al range di produzione della cellulosa microcristallina (275 a 425 NmL/gvs) secondo la norma UNI/TS 11703:2018. Seguendo l'ordine riportato in Figura 51, il d-

Limonene durante la prima fase rientra perfettamente nel range solo per una concentrazione di solvente nel substrato del 5%, per concentrazioni più alte l'inibizione è evidente, fino a raggiungere un'inibizione totale per un rapporto $S/(S+C)$ del 50%. Durante la seconda fase i batteri hanno mostrato capacità di adattamento alla presenza di solvente, infatti Lim15-II e Lim30-II rientrano nel range della cellulosa.

I risultati relativi a EtOH-I mostrano un BMP maggiore rispetto a quello atteso per la sola cellulosa, per tutte le concentrazioni studiate, ma confrontando questi risultati con la II fase, EtOH50-II mostra una notevole riduzione rispetto a I fase, la concentrazione ritenuta ottimale è pertanto quella al 30%. Per quanto riguarda l'impiego di n-esano, la I fase mostra valori totalmente compresi nel range della cellulosa non impregnata, anche se con un leggero decremento della produzione all'aumentare della presenza dell'esano. La II fase mostra invece un'elevata capacità di adattamento ed una plausibile degradazione dell'esano a favore della produzione di metano. Il 2-Meox durante la I fase mostra dei risultati promettenti, in quanto tutti i BMP si posizionano lungo il range superiore della cellulosa non impregnata; nella II fase del test tutti i valori rientrano nel range della cellulosa non impregnata e le barre di errore risultano significativamente contenute rispetto a tutti gli altri solventi testati; tale risultato può essere interpretato come una significativa capacità di adattamento dei batteri a questo tipo di solvente, infatti, rispetto alla prima fase del test, dalla seconda fase è possibile dedurre che il 2-Meox non influenzi in alcun modo la produzione di metano.

I risultati ottenuti dai test effettuati con cirene risultano essere promettenti, in quanto la II fase del test mostra una minore variabilità dei risultati (segno che il processo non è stato fortemente disturbato) e

una maggiore produzione di metano rispetto alla fase I, inoltre un S/(S + C) pari al 30% ha evidenziato produzioni di metano superiori alla sola cellulosa, pertanto è probabile che i batteri adattati siano in grado di impiegare il cirene come substrato.

In generale, i batteri mostrano capacità di adattamento a diversi solventi, con una maggiore tolleranza per 2-Meox, cirene ed esano; nonostante la significativa capacità di adattamento al d-Limonene, esso comunque non risulta essere un solvente ottimale per la valorizzazione mediante digestione anaerobica. Il 2-Meox tuttavia, risulta essere il più promettente tra tutti i solventi testati, specialmente se vengono prese in esame le barre di errore e la variabilità dei dati; infatti, dai risultati ottenuti tutti i solventi disturbano significativamente il processo, ad esclusione del 2-Meox, in seguito ad una fase di adattamento alla presenza del solvente.

5.1.3 Analisi del digestato

Nel presente paragrafo sono riportati i valori di VFA e FOS/TAC per ogni ciclo e ogni fase degli esperimenti, misurati al termine dell'esperimento sul digestato finale. Tali valori non hanno significativa rilevanza se osservati in maniera assoluta, ma acquisiscono interesse se messi in relazione fra loro all'interno dello stesso ciclo di test.

Dal ciclo di esperimenti condotto impiegando d-Limonene come solvente si osserva una tendenza all'accumulo di VFA in relazione all'incremento del rapporto S/(S+C), sia nella prima che nella seconda fase del test. Meno evidente, ma comunque presente, la stessa tendenza per il rapporto FOS/TAC (Figura 52). Tali valori supportano quanto

commentato per le curve di produzione cumulata di metano, e possono indicare una particolare sofferenza dei batteri metanigeni causata dalla presenza di alte concentrazioni di solvente.

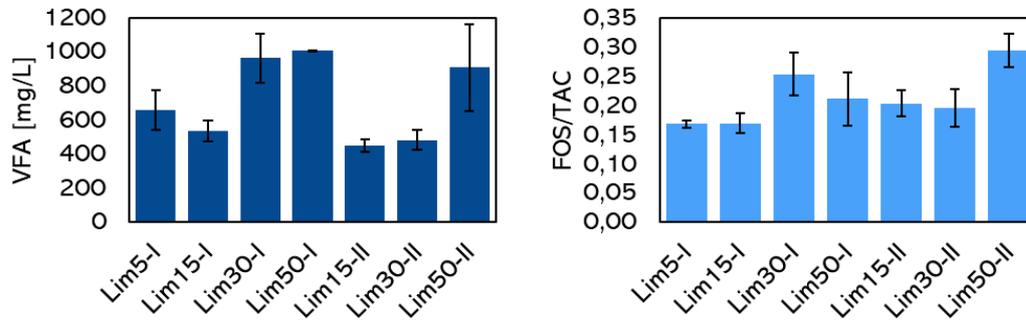


Figura 52 Test con d-Limonene: analisi del digestato

L'interessante andamento degli acidi grassi volatili e del parametro FOS/TAC nei reattori alimentati con cellulosa impregnata di etanolo mostra che questi parametri si mantengono contenuti per tutte le concentrazioni di entrambe le fasi, fatta eccezione per EtOH50-II. Il basso valore di FOS/TAC è indice di una completa degradazione del substrato presente. Pertanto, è possibile affermare che nei reattori con 50% di etanolo impregnato si sia verificato un accumulo di acidi grassi, contrariamente a tutti gli altri test, seppure non raggiungendo valori allarmanti. Tale fenomeno è coerente con le produzioni di metano, che sono risultate ridotte sia rispetto alla prima fase (EtOH50-I) che ai test con 15% e 30% di solvente nella seconda fase.

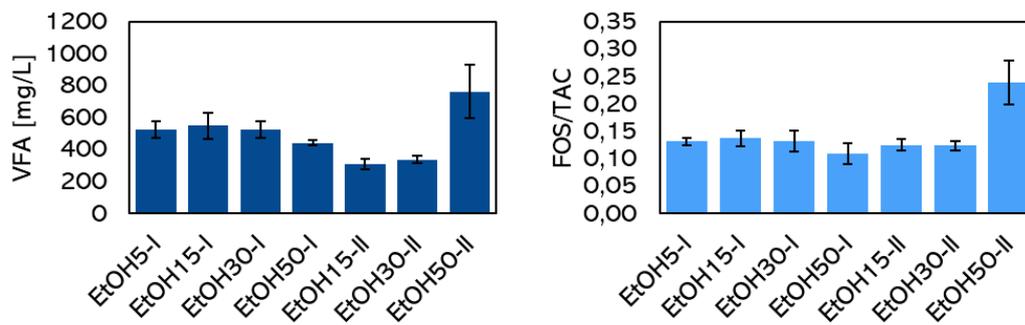


Figura 53 Test con etanolo: analisi del digestato

Le analisi di caratterizzazione sul digestato proveniente dai test con n-esano, riportate in Figura 54, mostrano che tra la prima e la seconda fase la concentrazione residua di acidi grassi volatili si è ridotta; come osservato dalle produzioni cumulate di metano, è possibile affermare che ci sia stato un adattamento dei batteri alla presenza del solvente. Lo studio di Yun et al. [214] sulla tossicità anaerobica dell'esano in test su biomasse microalgali ha evidenziato un accumulo di acidi grassi volatili, causato dall'incremento della concentrazione di solvente, non riscontrato nel presente esperimento. Tale differenza potrebbe essere attribuita alla differente tipologia di substrato e all'interazione del solvente con esso. Il presente studio vuole presentare una panoramica generale sui solventi testati, tuttavia, le interazioni tra solvente e specifico substrato devono essere verificate caso per caso.

Il parametro FOS/TAC si è invece mantenuto al di sotto di 0,15 per tutti i reattori e in tutte le fasi, a conferma del fatto che sia avvenuta la corretta degradazione del substrato.

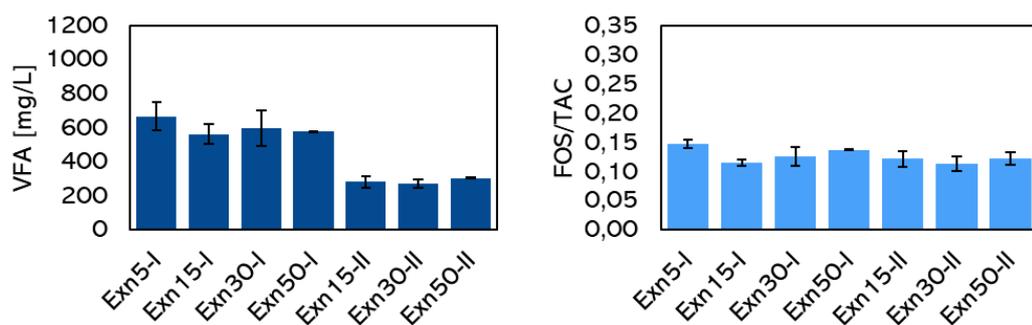


Figura 54 Test con n-esano: analisi del digestato

In Figura 55 sono riportati i valori di VFA e FOS/TAC del ciclo di BMP in cui è stato testato il 2-Meox. Tali valori risultano significativamente contenuti in entrambe le fasi, pertanto è da escludere l'inibizione dei batteri metanigeni; alla luce di ciò è plausibile che la produzione di

metano relativamente bassa sia legata ad una sofferenza di tutto l'ecosistema microbico.

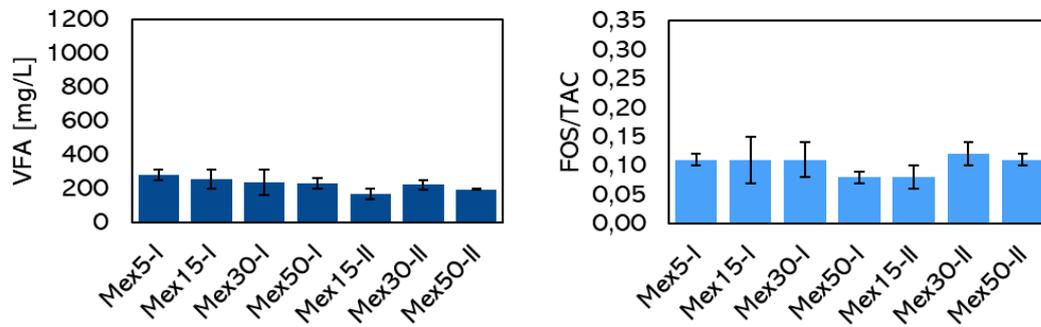


Figura 55 Test con 2-Meox: analisi del digestato

I valori di VFA e FOS/TAC dei reattori alimentati con cellulosa impregnata di cirene sono contenuti per tutti i test effettuati. Si evidenzia solo un leggero incremento per Cyr50-II di entrambi i parametri, che tuttavia non sembra influire significativamente sulla produzione di metano.

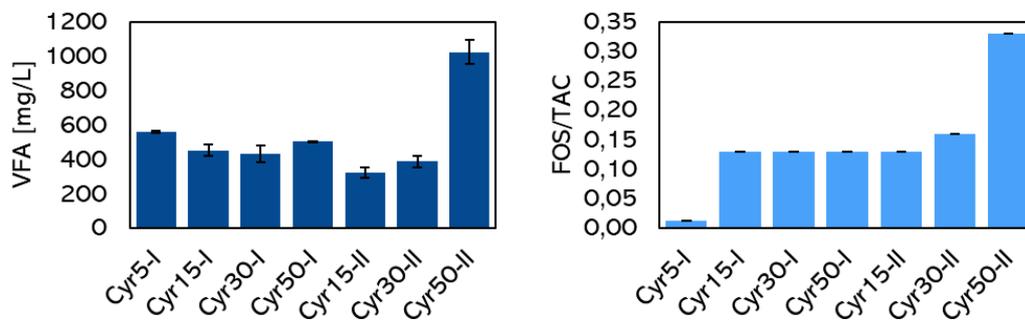


Figura 56 Test con cirene: analisi del digestato

5.1.4 Parametri cinetici

Come descritto nel paragrafo 3.3.7, sono stati utilizzati due modelli cinetici per valutare i parametri cinetici dei processi di digestione anaerobica. Nella Tabella 22 sono riportati i parametri cinetici calcolati sulla media di ogni test di controllo effettuato. I parametri cinetici dei

successivi test sono messi a confronto con quelli calcolati sulla media dei test della cellulosa non impregnata.

Tabella 22 Parametri cinetici della cellulosa non impregnata

Test	I ordine			Gompertz			
	B_0 [NL/gvs]	k [1/d]	r^2 [%]	P [NL/gvs]	λ [d]	R_m [NL/(gvs*d)]	r^2 [%]
Cellulosa	0,40	0,17	98	0,36	1,20	0,089	100

In generale, è evidente che il modello del primo ordine non si adatti in modo ottimale a curve con andamenti caratterizzati da fenomeni inibitori; confrontando i risultati di questo modello con quelli del modello di Gompertz, si osserva che all'aumentare del parametro λ di Gompertz, la correlazione con i dati del modello di primo ordine diminuisce. Questo è dovuto al fatto che il modello del primo ordine non si adatta bene a substrati che presentano una fase di lag significativa. Inoltre, il potenziale massimo di metano stimato dal modello del primo ordine (B_0) tende a essere leggermente sovrastimato rispetto a quello calcolato con il modello di Gompertz (P) e rispetto ai valori effettivi di BMP. Pertanto, per alcuni dati, il valore del parametro r^2 risulta piuttosto basso.

Osservando caso per caso l'effetto di ogni solvente si evince che l'incremento della percentuale di d-Limonene non solo riduca la produzione di metano (fino ad una totale inibizione per Lim50-I) ma causi anche un rallentamento proporzionale della velocità di idrolisi (k) (Tabella 23); B_0 e P sono sempre inferiori ai corrispettivi parametri della cellulosa non impregnata. Il parametro λ si riduce all'aumentare della concentrazione di d-Limonene specialmente durante la prima fase, ulteriore testimonianza del disturbo causato dal solvente. Durante la II fase del test tutti i parametri hanno subito un miglioramento, la

produzione massima di metano per Lim50 passa da 0 a 0,18 NL_{CH₄}/g_{VS} per entrambi i modelli; tuttavia, la fase di lag per un S/(S+C) è di quasi 20 giorni.

Tabella 23 Test con d-Limonene: parametri cinetici

Test	I ordine			Gompertz			
	B_0 [NL/g _{VS}]	k [1/d]	r ² [%]	P [NL/g _{VS}]	λ [d]	R _m [NL/(g _{VS} *d)]	r ² [%]
Lim5-I	0,33	0,14	98	0,30	2,4	0,066	100
Lim15-I	0,30	0,08	94	0,31	5,8	0,038	100
Lim30-I	0,22	0,03	78	0,20	15,0	0,061	100
Lim50-I	0,00	0,00	0	0,00	0,0	0,000	0
Lim15-II	0,33	0,13	96	0,31	3,1	0,050	99
Lim30-II	0,40	0,06	97	0,33	2,5	0,022	99
Lim50-II	0,18	0,00	73	0,18	19,3	0,006	87

L'impiego di etanolo nel processo di digestione anaerobica ha causato un incremento del parametro k in quasi tutti i test (ad esclusione di EtOH50-II), ed inoltre la fase di ritardo si è ridotta durante la I fase del test, in maniera proporzionale all'incremento della concentrazione. La riduzione del parametro λ (Tabella 24) all'aumentare della concentrazione di etanolo durante la prima fase può indicare che la presenza di etanolo riduca la fase di lag durante la degradazione della cellulosa. Tale effetto è riportato in studi di letteratura che valutano l'effetto della pre-fermentazione con etanolo sulla resa di metano da rifiuti alimentari [63]; esso ha efficacemente alleviato l'inibizione dovuta all'acidificazione, ha ridotto notevolmente la durata della fase di latenza e ha notevolmente stimolato la crescita di metanigeni, con rese di metano superiori del 50% rispetto a quella del gruppo di controllo.

Tuttavia, il parametro λ nella seconda fase dell'esperimento ha assunto valori anche superiori a quello della cellulosa non impregnata, pertanto tale effetto potrebbe indicare che l'etanolo favorisca la digestione

anaerobica solo nel breve termine o che il processo risenta di un potenziale accumulato.

Si evidenzia per il modello per I ordine un r^2 basso (92%) per EtOH50-II probabilmente causato dalla lunga fase di ritardo (dal 5° al 20° giorno).

Tabella 24 Test con Etanolo: parametri cinetici

Test	I ordine			Gompertz			
	B_0 [NL/gvs]	k [1/d]	r^2 [%]	P [NL/gvs]	λ [d]	R_m [NL/(gvs*d)]	r^2 [%]
EtOH5-I	0,43	0,18	98	0,41	1,6	0,078	99
EtOH15-I	0,47	0,20	98	0,46	0,9	0,068	99
EtOH30-I	0,56	0,21	98	0,54	1,1	0,076	99
EtOH50-I	0,77	0,10	98	0,72	0,0	0,028	98
EtOH15-II	0,50	0,09	98	0,42	2,9	0,062	100
EtOH30-II	0,76	0,10	98	0,65	2,4	0,057	100
EtOH50-II	0,37	0,19	92	0,35	2,4	0,163	97

La discrepanza tra B_0 e P è particolarmente evidente nei test effettuati con esano (Tabella 25), soprattutto per Hexn50-II. Il parametro k decresce all'aumentare del rapporto $S/(S+C)$ mentre λ aumenta, fatta eccezione per Hexn50-I, in cui la lag phase risulta pari a 0, tuttavia, il basso tasso massimo di produzione di metano ($R_m=0,017$ NL/(gvs*d)) indica una produzione di metano disturbata, in quanto molto diluita nel tempo, la curva risulta schiacciata e pertanto il modello non è in grado di approssimare le fasi di ritardo.

Tabella 25 Test con n-Esano: parametri cinetici

Test	I ordine			Gompertz			
	B_0 [NL/gvs]	k [1/d]	r^2 [%]	P [NL/gvs]	λ [d]	R_m [NL/(gvs*d)]	r^2 [%]
Hexn5-I	0,39	0,21	98	0,39	0,5	0,046	99
Hexn15-I	0,37	0,14	99	0,35	0,8	0,042	99
Hexn30-I	0,36	0,07	96	0,31	4,5	0,048	99
Hexn50-I	0,53	0,03	99	0,35	0,0	0,017	99
Hexn15-II	0,41	0,10	97	0,36	2,7	0,071	98
Hexn30-II	0,61	0,07	98	0,41	2,1	0,060	99
Hexn50-II	0,85	0,04	100	0,47	0,3	0,032	100

I valori di B_0 e P nella prima fase dei test con 2-Meox (Tabella 26) risultano in generale più alti rispetto ai parametri della cellulosa non impregnata, per poi tuttavia ridursi durante la seconda fase; il parametro k è compreso tra 0,14 e 0,20 d^{-1} per tutti i reattori durante la prima fase e λ mostra una leggera tendenza crescente con l'incremento della percentuale di solvente. Meox50-II ha un basso k ($4 \cdot 10^{-5} d^{-1}$) sintomo di una forte inibizione batterica; inoltre, nella seconda fase c'è una generale riduzione di R_m e incremento di fase di lag, a testimonianza del fatto che i batteri non si siano perfettamente adattati alla presenza del solvente durante la II fase del test.

Tabella 26 Test con 2-Meox: parametri cinetici

Test	I ordine			Gompertz			
	B_0 [NL/gvs]	k [1/d]	r^2 [%]	P [NL/gvs]	λ [d]	R_m [NL/(gvs*d)]	r^2 [%]
Meox5-I	0,51	0,15	98	0,45	1,6	0,081	100
Meox15-I	0,41	0,20	97	0,36	2,2	0,176	99
Meox30-I	0,44	0,14	98	0,38	1,9	0,087	100
Meox50-I	0,46	0,15	92	0,39	3,1	0,189	100
Meox15-II	0,29	0,10	95	0,23	3,7	0,054	100
Meox30-II	0,42	0,10	96	0,34	3,3	0,062	99
Meox50-II	0,23	0,00	91	0,23	4,2	0,074	99

I risultati ottenuti dai test effettuati con il cirene (Tabella 27) mostrano produzioni ultime di metano paragonabili a quelle della cellulosa durante la I fase, nonostante un R_m ridotto per tutte le concentrazioni; durante la seconda fase si è verificato un incremento delle produzioni ultime di metano, accoppiato però ad una riduzione della velocità di idrolisi, i batteri potrebbero essere in grado di impiegare questo solvente come substrato, una volta adattati alla sua presenza.

Tabella 27 Test con Cirene: parametri cinetici

Test	I ordine			Gompertz			
	B_0 [NL/gvs]	k [1/d]	r^2 [%]	P [NL/gvs]	λ [d]	R_m [NL/(gvs*d)]	r^2 [%]
Cyr5-I	0,38	0,15	99	0,36	0,5	0,025	100
Cyr15-I	0,33	0,15	100	0,32	0,0	0,023	99
Cyr30-I	0,39	0,08	99	0,33	1,5	0,018	100
Cyr50-I	0,41	0,12	97	0,36	2,6	0,035	100
Cyr15-II	0,58	0,05	98	0,31	2,9	0,040	100
Cyr30-II	0,85	0,04	99	0,46	0,5	0,030	99
Cyr50-II	0,45	0,11	98	0,45	2,2	0,028	100

5.2 Risultati delle estrazioni di olio di pesce

Sono stati effettuati dieci cicli di estrazione, tre con d-Limonene, uno con olio essenziale, tre con etanolo e tre con 2-Meox. Come si osserva in Figura 57, i prodotti delle estrazioni variano significativamente in termini di colore, densità e quantità. Inoltre, diversi campioni contenevano parti solide a temperatura ambiente, probabilmente composte da grassi e lipidi provenienti dagli scarti del pesce.

In generale, i prodotti dell'estrazione dall'aspetto più simile a quello atteso sono i campioni estratti con d-Limonene. Il colore più chiaro e brillante dei campioni LIM-I-II e LIM-T rispetto a quello di LIM-I-I potrebbe essere attribuito alla differente temperatura operativa,

nonostante il processo di Ciriminna et al. utilizzasse temperature ben superiori e pressioni più elevate (90°C - 40 mbar) [114]. I campioni ottenuti dall'estrazione con etanolo risultano molto eterogenei e non analizzabili, dall'ispezione visiva, il campione non presentava evidenti tracce di olio di pesce, mostrando invece una prevalenza di residui, quali sangue e liquidi a densità maggiore.

Tutte le estrazioni si attestano attorno al 1-4% del peso iniziale di fase liquida, fatta eccezione per LIM-T e Olio.ess-T, i quali rappresentano rispettivamente il 13 e il 22% del peso iniziale (Tabella 28). Nel caso specifico dell'uso di olio essenziale, durante la separazione per mezzo del rotavapor, si è evidenziato che la parte recuperata del solvente fosse composta quasi interamente da d-Limonene (terpene maggiormente presente nell'olio essenziale d'arancia). Pertanto, tutti i componenti più pesanti sono rimasti nel pallone rotante, assieme all'olio di pesce, compromettendone irrimediabilmente la purezza. Tale osservazione rende inopportuno l'impiego dell'olio essenziale per tale procedura. Anche l'ispezione visiva conferma quanto riportato, in quanto il colore particolarmente intenso del campione Olio.ess-T è dovuto alla concentrazione dei composti presenti nell'olio essenziale, una volta estratto il d-Limonene.

Le estrazioni effettuate impiegando il 2-Meox come solvente mostrano risultati particolarmente differenti al variare del substrato. Dalla Figura 57 si osserva che l'olio di pesce estratto a partire dalle interiora del tonno risulta ricco di parti solide, grassi e lipidi, mentre l'estrazione effettuata dalle parti molli delle teste è più omogenea e meno densa, seppure l'aspetto sia più torbido se confrontato con l'olio estratto con d-Limonene. Probabilmente, i grassi del tonno presenti nelle interiora compromettono il processo estrattivo, solubilizzandosi durante la fase

di estrazione e tornando in fase solida a temperatura ambiente. Il campione MEOX-I-I è risultato essere totalmente solidificato al termine del processo di rimozione del solvente.

Dall'ispezione visiva si è scelto di effettuare l'analisi GC-MS solo sui campioni LIM-I-I, LIM-I-II, LIM-T, e MEOX-T.

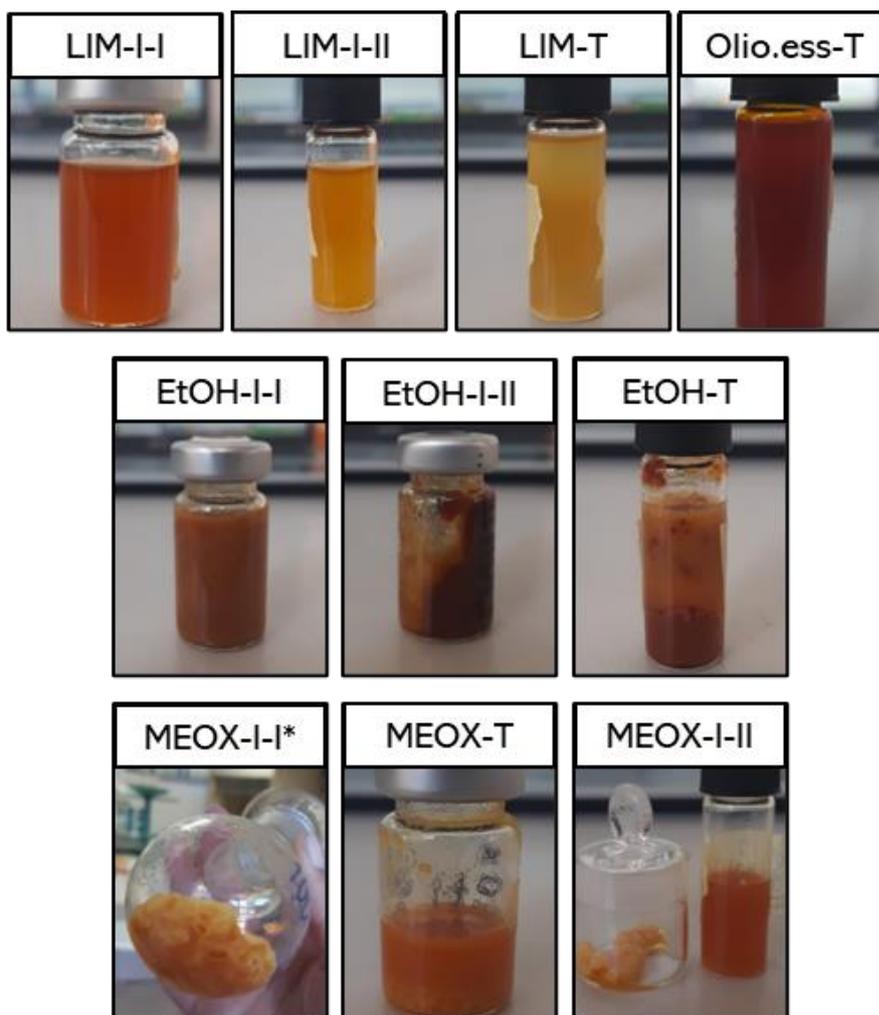


Figura 57 Prodotti delle estrazioni di olio di pesce

*campione totalmente solidificato

Tabella 28 Risultati delle estrazioni di olio di pesce (peso e percentuale)

CODICE	Solvente	Substrato	Pressione [mbar]	Temperatura [°C]	Estratto [g]	Estratto [%]
LIM-I-I	Limonene	Interiora	10	50	6,0	2%
LIM-I-II	Limonene	Interiora	10	45	3,7	1%
LIM-T	Limonene	Teste	10	45	36,2	13%
EtOH-I-I	Etanolo	Interiora	600	70	62,3	22%
EtOH-I-II	Etanolo	Interiora	600	70	9,3	3%
EtOH-T	Etanolo	Teste	600	70	13,4	4%
MEOX-I-I	2-Meox	Interiora	600	70	7,1	3%
MEOX-T	2-Meox	Teste	600	50	6,9	3%
MEOX-I-II	2-Meox	Interiora	600	50	5,2	2%
Olio.Ess-T	Olio essenziale	Teste	10	45	5,0	2%

In Tabella 29 sono riassunti i risultati delle analisi degli acidi grassi GC-MS per i quattro oli di pesce esaminati. In generale, nei cromatogrammi dei quattro campioni era presente un significativo rumore di fondo, particolarmente accentuato nel caso del MEOX-T, l'impurezza del campione è probabilmente causata dall'incapacità tecnica di ripulire ed asciugare perfettamente i resti di pesci di grande taglia, in quanto sangue e altri liquidi rimangono nei tessuti anche dopo la fase di pulitura. Pertanto, si può in primo luogo affermare che i pesci di piccola taglia siano più gestibili e adatti all'estrazione. Tuttavia, in tutti i campioni esaminati sono presenti composti di interesse.

Tabella 29 Profilo lipidico

Composto	LIM-I-I	LIM-II-I	LIM-T	Meox-T
Acido miristico	15%	26%	3%	2%
Acido laurico	1%	1%	1%	1%
Acido palmitico	0%	0%	18%	0%
Acido palmitoleico	3%	3%	4%	6%
Acido stearico	17%	13%	9%	26%
Acido oleico	11%	12%	13%	14%
Acido trans-vaccenico	3%	3%	3%	5%
Acido nonadecanoico	6%	0%	0%	0%
Acido linoleico	0%	1%	1%	0%
Acido cis-11-eicosenoico	5%	0%	2%	4%
Acido linolenico	6%	0%	0%	0%
Acido 9,12-esadecadienoico	0%	0%	1%	1%
Acido arachidonico	7%	9%	3%	9%
Acido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, (all-Z)-(EPA)	6%	7%	6%	4%
Acido 15-tetracosenoico, (Z)-nervonico	2%	0%	1%	2%
Metil 4,7,10,13,16-docosapentaenoato	2%	2%	3%	3%
Metil 7,10,13,16,19-docosapentaenoato (DPA)	0%	0%	3%	0%
Acido 4,7,10,13,16,19-docosaesaenoico, (all-Z)- (DHA)	17%	22%	28%	23%

LIM-I-I e LIM-II-I mostrano una predominanza di acidi grassi saturi come l'acido miristico e stearico, e acidi grassi polinsaturi come DHA. Tuttavia, LIM-II-I ha una percentuale più alta di acido miristico e DHA rispetto a LIM-I-I, ma una percentuale inferiore di EPA. Gli acidi EPA e DHA sono particolarmente presenti in tutti i campioni; in particolare l'EPA con concentrazioni relativamente stabili tra il 4% e il 7%. Questo acido grasso essenziale è estratto in modo efficace sia dalle interiora che dalle teste, con entrambi i solventi. Il DHA, con percentuali che variano tra il 17% e il 28%, è particolarmente abbondante nei campioni estratti dalle teste (LIM-T, 28%). Questo suggerisce che le teste siano un substrato molto ricco di DHA, specialmente quando si utilizza d-Limonene come solvente. L'olio di pesce ottenuto dalle teste del tonno ed estratto con d-Limonene contiene quantità significative di acido palmitico (18%).

In tutti i campioni è stata rilevata una concentrazione di acido oleico compresa tra 11 e 14%; inoltre, concentrazioni di acido vaccenico e palmitoleico sono presenti in tutti i campioni tra il 3 e il 5% e il 3 e 6%, rispettivamente. Questi due acidi grassi monoinsaturi, come l'acido oleico, forniscono sostanziali benefici per la salute. L'acido oleico regola le cause sottostanti della resistenza all'insulina e del diabete mellito di tipo 2. L'acido palmitoleico abbassa i lipidi nel sangue, aumenta la sensibilità del corpo all'insulina, riduce i disturbi immunometabolici e promuove la sintesi del collagene. L'acido vaccenico, è *un isomero trans* posizionale e geometrico dell'acido oleico, è epidemiologicamente associato a una minore adiposità, rischio di diabete e infiammazione sistemica [215].

In generale, i campioni estratti dalle teste di tonno mostrano una maggiore concentrazione di alcuni acidi grassi come il DHA e acido

palmitico (18%) in LIM-T. Questo campione mostra inoltre un profilo lipidico più completo rispetto ai campioni estratti dalle interiora, indicando una differenza significativa nella composizione lipidica tra le diverse parti del pesce. I campioni estratti dalle interiora, sebbene mostrino buone rese di acidi grassi come miristico e oleico, hanno una composizione lipidica meno varia rispetto ai campioni estratti dalle teste.

Il 2-Meox mostra un profilo di estrazione leggermente diverso, dal d-Limonene, che si conferma essere efficace nell'estrazione di DHA sia dalle interiora che dalle teste, con rese particolarmente elevate dai campioni estratti dalle teste.

I risultati suggeriscono che le teste del pesce siano un substrato ricco e vario per l'estrazione di acidi grassi, con il d-Limonene che offre un'ottima resa, soprattutto per DHA. Le interiora, pur essendo ricche di alcuni acidi grassi specifici, come l'acido arachidonico, mostrano una composizione lipidica meno diversificata. La scelta del solvente e del substrato di partenza (teste o interiora) può influenzare significativamente il profilo di estrazione dell'olio di pesce.

5.3 Test in semi-continuo

Il residuo solido ottenuto dalle estrazioni di olio di pesce è stato collezionato, caratterizzato e impiegato come substrato in test di co-digestione anaerobica. Sono stati predisposti sei reattori in semi-continuo, il primo (reattore A) è stato alimentato esclusivamente con code di cipolla, al fine di confrontare la mono-digestione di questo substrato con la co-digestione assieme agli scarti del tonno. Il secondo (reattore B) è stato alimentato con 70%_{vs} di code di cipolla e 30%_{vs} di

scarti del tonno tal quali, non sottoposti al processo di estrazione dell'olio di pesce; questo reattore è stato utilizzato come controllo per verificare se e in che modo i solventi residui negli scarti del pesce influenzano il processo di digestione anaerobica. I quattro reattori rimanenti sono stati alimentanti con code di cipolla e scarti provenienti dal processo di estrazione effettuato con d-Limonene, 2-Meox, etanolo e olio essenziale, rispettivamente per i reattori C, D, E ed F. nella Tabella 16 del paragrafo 4.5 sono riassunte le principali condizioni operative dei reattori.

L'esperienza ha avuto durata complessiva di 51 giorni, sette settimane in totale. L'OLR è rimasto invariato per tutto il test e pari a $1 \text{ g}_{\text{VS}}/(\text{L}\cdot\text{d})$, mentre l'HRT è stato posto pari a 14 giorni per le prime quattro settimane e poi variato a 21 giorni per le ultime tre settimane dell'esperienza.

I risultati in termini di produzione di metano e le analisi settimanali effettuate sono di seguito discussi.

5.3.1 Produzione di metano

Nella Figura 58 è riportata la produzione specifica cumulata di metano in mL/g_{VS} cumulati.

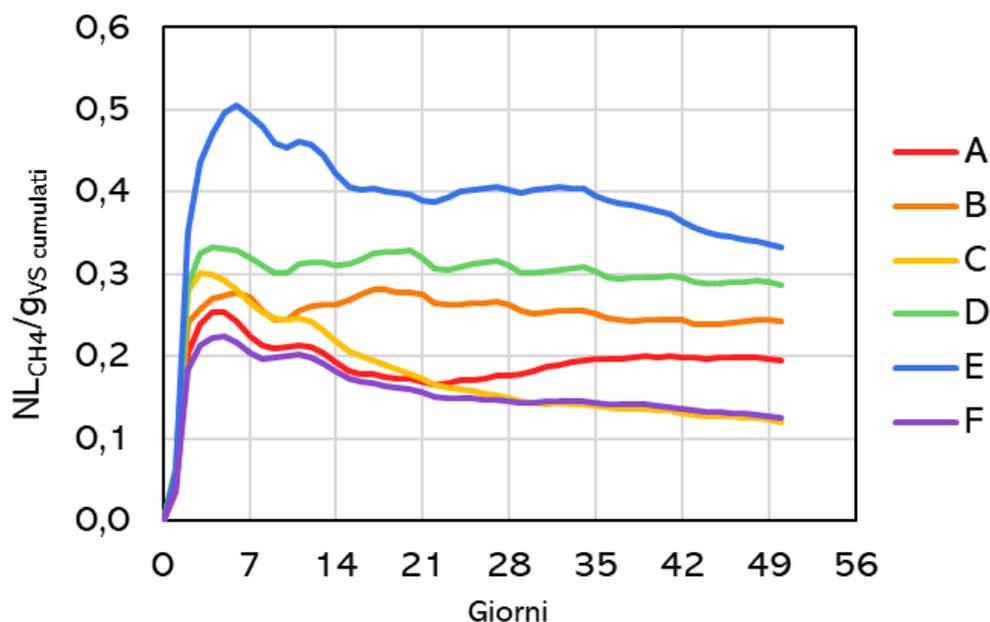


Figura 58 Produzione specifica cumulata di metano

Inizialmente, tutti i reattori, eccezion fatta per il reattore F, hanno mostrato produzioni di metano superiori a quelle ottenute con la monodigestione delle code di cipolla. Si può pertanto affermare che la monodigestione di questo substrato non sia raccomandabile. Ciò potrebbe essere attribuito al rapporto C/N sbilanciato; secondo lo studio del Cornell Waste Management Institute [216], i valori tipici del rapporto C/N per le foglie è compreso tra 40 e 80 mentre gli scarti del pesce sono caratterizzati da rapporti C/N molto bassi, compresi tra 2,6 e 5. Se il rapporto C/N è troppo alto (eccesso di carbonio), come spesso accade con gli scarti vegetali, la digestione è limitata dalla mancanza di azoto disponibile, rallentando il processo e riducendo la produzione di metano.

Inoltre, la composizione chimica e strutturale degli scarti delle cipolle può comportare una serie di problematiche come il basso contenuto di grassi e l'elevato contenuto di fibre, come cellulosa e emicellulosa, che sono più difficili da degradare per i batteri anaerobici rispetto ai carboidrati semplici o alle proteine, e l'alto contenuto di zolfo, infatti le cipolle contengono composti solforati, come l'acido solforico, che possono inibire l'attività dei microrganismi metanigeni [217]. Questi composti possono interferire con la fase metanogenica della digestione, riducendo l'efficienza della produzione di metano. Per migliorare la produzione di metano, è spesso consigliabile co-digerire gli scarti di cipolla con altri substrati più ricchi di proteine in modo da bilanciare il rapporto C/N ed integrare substrati che hanno produzioni specifiche di metano più elevate. Come si evince da questo studio la co-digestione di questi substrati risulta essere una scelta vincente rispetto alla monodigestione. Il reattore B, infatti, mostra un incremento della produzione cumulata specifica al termine dell'esperimento di quasi il 25% rispetto al reattore A.

Durante il primo HRT tutti i reattori mostrano un picco di produzione più o meno accentuato a seconda del caso. Successivamente, i reattori C, E ed F (d-Limonene, etanolo e olio essenziale) hanno subito una lenta riduzione della produzione di metano, attribuibile tuttavia a fattori differenti. Il reattore E mostra la produzione di metano più elevata per tutto l'arco dell'esperimento, con un picco a 0,51 NL/g_{VS} durante la prima settimana, seguito da una lenta decrescita, accentuata durante l'ultimo HRT. Tale fenomeno è compatibile con quanto riscontrato nei test di biometanazione preliminari, dai quali si è dedotto che l'etanolo in fase iniziale ha un doppio benefico effetto, viene prontamente impiegato come substrato da parte dei batteri concorrendo all'incremento della

produzione di metano, e favorisce lo scambio diretto di elettroni. Tuttavia, tale fenomeno non si dimostra essere costante nel tempo, al contrario, l'accumulo di etanolo nei reattori disturba il processo e riduce la produzione di metano.

I reattori C ed F mostrano un andamento piuttosto simile, fino al 28° giorno la curva del reattore C si è mantenuta al di sopra di quella di reattore F, con un picco di produzione di metano di 0,30 NL/g_{vs} rispetto a 0,22 NL/g_{vs} del reattore F. Tuttavia, per tutta la durata del terzo HRT (21 giorni) le due curve si sovrappongono. Da ciò si può dedurre che il d-Limonene, puro nel caso del reattore C, mentre nel reattore F è presente come parte preponderante dell'olio essenziale di arancia, causi gli stessi effetti all'interno dei due reattori. Plausibilmente, gli altri composti presenti nell'olio essenziale sono anch'essi inibenti e compromettono la produzione di metano fin da dall'inizio del test. Al contrario il d-Limonene puro viene inizialmente tollerato, appare un lieve capacità di adattamento che tuttavia viene contrastata dall'accumulo del terpene, causando una riduzione della produzione specifica cumulata del 50% rispetto al reattore B (controllo). Il reattore D mostra invece un andamento particolarmente stazionario, mantenendo per tutto l'arco dell'esperimento una produzione cumulata specifica di $0,30 \pm 0,01$ NL/g_{vs}, circa il 20% maggiore rispetto a quella del reattore B.

Alcune ulteriori considerazioni possono essere dedotte osservando i grafici in Figura 59 e Figura 60 che riportano gli andamenti delle produzioni specifiche e delle produzioni cumulate, rispettivamente.

L'andamento fluttuante delle curve di produzione specifica è giustificato dalle modalità di alimentazione. Essa avveniva cinque giorni a settimana,

nell'arco dei quali veniva somministrato substrato in modo tale da fornire per tutta la settimana l'equivalente di 1 gvs/(L·d). Tuttavia, durante i giorni in cui l'alimentazione veniva interrotta (sabato e domenica) si evidenzia nelle curve un abbassamento della produzione specifica di metano. Da tale grafico si osserva in maniera ancora più evidente che la produzione del reattore E, inizialmente molto alta e con fluttuazioni significative, è andata via via riducendosi nel tempo, fino a mantenersi al di sotto delle curve del reattore D (meox) e B (controllo). Nel grafico della produzione cumulata di metano, tale effetto corrisponde ad una riduzione del coefficiente angolare delle rette tangenti alla curva blu dal 35° giorno in poi (Figura 60).

Entrambi i grafici confermano che i reattori C ed F hanno avuto andamenti pressoché sovrapponibili, a riprova del fatto che l'olio essenziale e il d-Limonene causano lo stesso effetto sulle popolazioni batteriche.

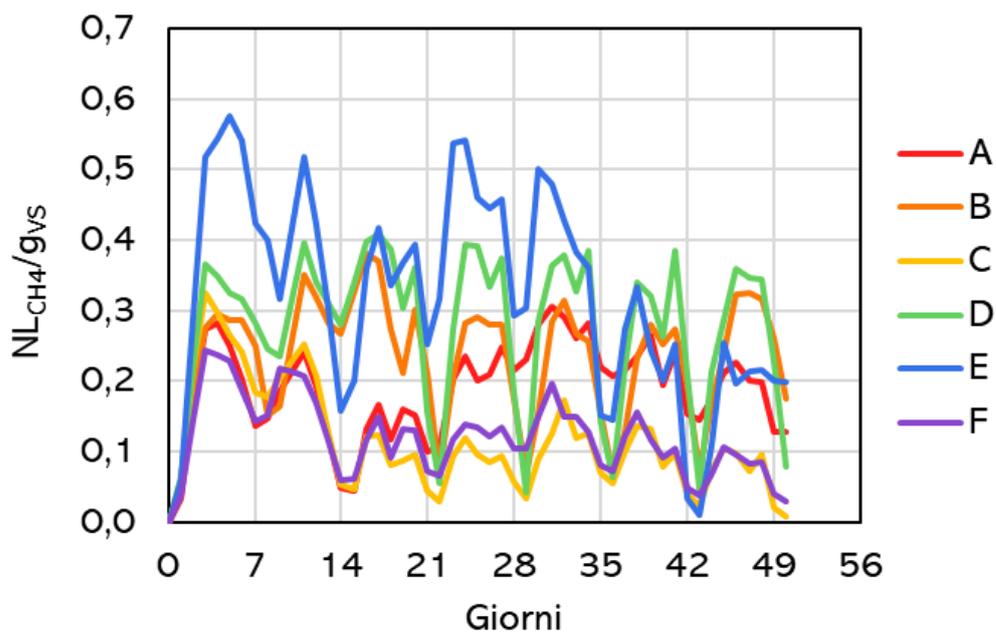


Figura 59 Produzione specifica di metano

È interessante osservare che il reattore A è quello la cui produzione risentiva di meno dell'interruzione settimanale. Ciò, unito ad un innalzamento della pendenza della curva in Figura 60 e ad una stabilizzazione della produzione in Figura 58, dal 28° giorno in poi, sono indice del fatto che la modifica dell'HRT da 14 a 21 giorni ha giovato al benessere del reattore. Infatti, è opportuno pensare che un HRT più lungo, nel caso di un substrato ostico come le code di cipolla, abbia favorito una maggiore conversione del substrato, fornendo più tempo ai microrganismi per degradarlo, riducendo al contempo il rischio di accumulo di intermedi come gli acidi grassi volatili, e comportando quindi una maggiore produzione di metano.

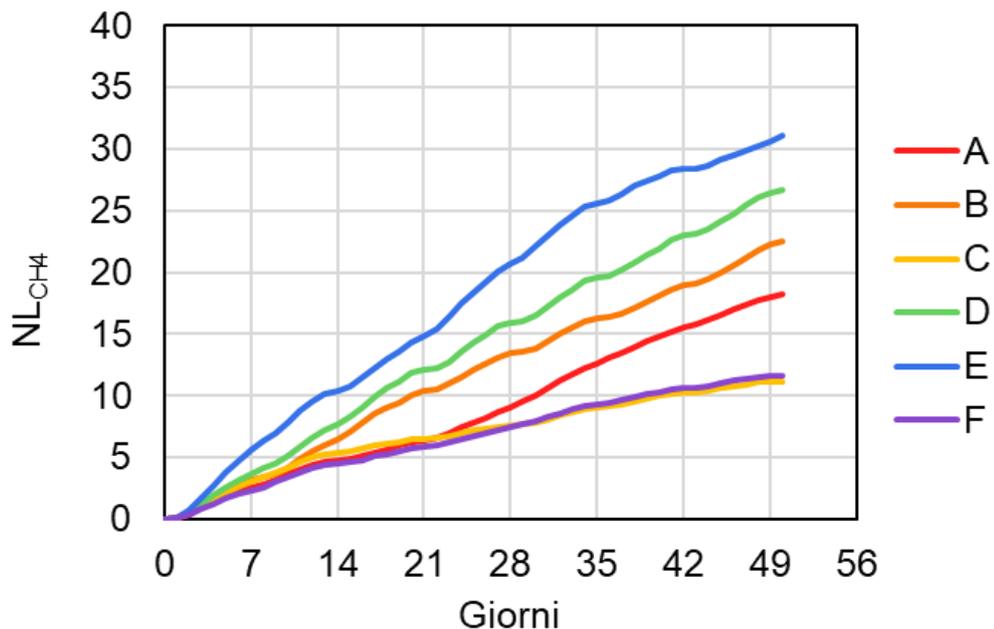


Figura 60 Produzione cumulata di metano

5.3.2 Analisi settimanali

Durante l'intero arco dell'esperimento, il pH del digestato è stato misurato giornalmente, mentre la concentrazione di acidi grassi volatili

e il rapporto FOS/TAC sono stati misurati mediante la procedura riportata nel paragrafo 3.2.3, sul digestato composito settimanale.

L'andamento del pH è stato altalenante per tutti i reattori (Figura 61), tuttavia, i reattori B e D si sono mantenuti quasi sempre al di sopra di 6,7, in particolare il reattore con 2-Meox è l'unico a non aver mai necessitato di un intervento di correzione del pH. Infatti, per scongiurare l'acidificazione del reattore, ogni qualvolta il pH scendeva sotto 6,6 (valore critico) sono stati additivati 2 g/L di bicarbonato di sodio per fornire capacità tampone aggiuntiva alla miscela.

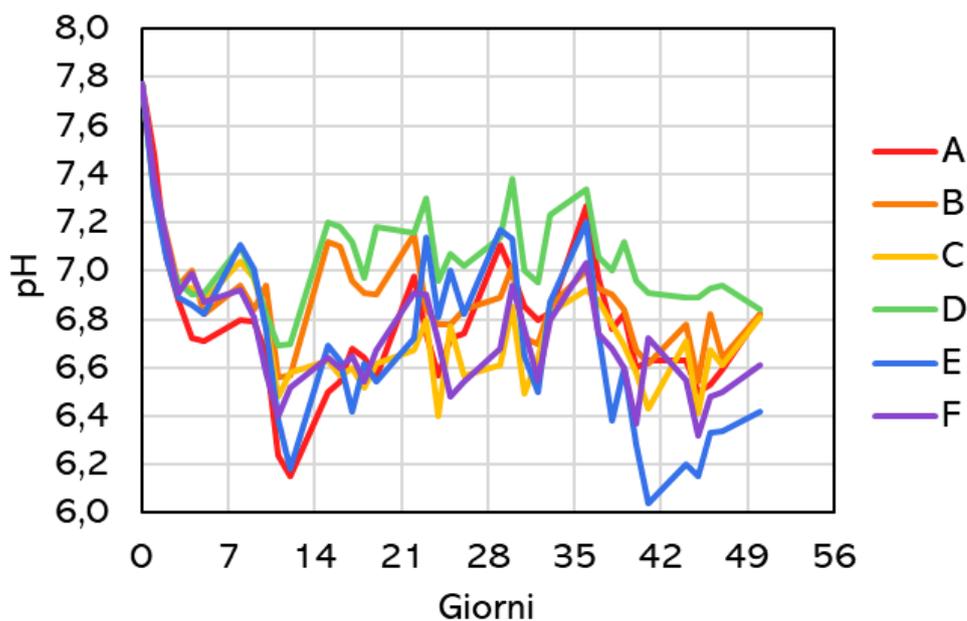


Figura 61 pH - andamento giornaliero

Inizialmente, i reattori che hanno necessitato più volte dell'aggiunta di bicarbonato di sodio sono stati C, E ed F. Il reattore E, nello specifico, durante l'ultimo HRT ha subito riduzioni repentine del pH, causato dall'accumulo di VFA (Figura 63). Il reattore A, dopo un crollo repentino verso la fine del primo HRT, non ha sofferto di particolari problematiche.

I reattori B e D hanno mostrato un andamento molto simile e particolarmente stabile in termini di VFA (<1000 mg/L) e FOS/TAC (<0,25) per quasi l'intera durata dell'esperimento. Parrebbe infatti che la co-digestione di code di cipolla e scarti del tonno favorisca particolarmente la stabilità del processo. Inoltre, la presenza del 2-Meox non ha influenzato negativamente i parametri presi in esame. Questo risultato è perfettamente concorde con quanto affermato riguardo le produzioni di metano.

Il reattore alimentato esclusivamente con code di cipolla mostra un andamento peculiare; per le prime quattro settimane, quanto l'OLR era fissato pari a 14 giorni, i VFA si sono costantemente accumulati nel reattore, raggiungendo la soglia di 4000 mg/L. Anche il parametro FOS/TAC ha avuto un'ascesa repentina, raggiungendo alla seconda settimana il valore di 1,06, per poi decrescere dapprima lentamente, ed in maniera estremamente rapida dopo la quarta settimana, quando l'HRT è stato variato a 21 giorni. Dall'andamento dei VFA e del rapporto FOS/TAC si deduce che il reattore A abbia beneficiato quasi istantaneamente del cambio di HRT.

Similmente, i reattori C ed F hanno raggiunto fin da subito valori critici di VFA e FOS/TAC; tuttavia, dalla quarta settimana in poi, anche in questo caso c'è stato un arresto dell'incremento di tali parametri, seppur non mostrando una netta riduzione come nel caso del reattore A. La variazione dell'HRT ha senza dubbio giovato ai reattori con d-Limonene e olio essenziale, anche se non in modo tale da raggiungere i parametri operativi ottimali.

Il reattore E è l'unico a non aver giovato del cambio di HRT. Probabilmente, alla quarta settimana il processo era già troppo

compromesso; in particolare sono stati raggiunti valori di VFA pari a 8887 mg/L associati ad un FOS/TAC di 2,56, sproporzionatamente elevato rispetto ai valori consigliati. È interessante notare che, nonostante la produzione cumulata specifica di metano di questo reattore sia stata maggiore rispetto alle altre, il processo fosse in forte sofferenza. Matematicamente ciò può essere spiegato in quanto la curva è stata ricavata rapportando la produzione effettiva ai solidi volatili immessi nel reattore giornalmente; pertanto, nel calcolo non è stato considerato l'etanolo come substrato presente. Perciò l'intera produzione di metano è stata attribuita esclusivamente alla sostanza organica dei residui di pesce, per tale ragione risulta essere la maggiore. Tuttavia, l'etanolo presente nel substrato ha senza dubbio compromesso il processo; confrontando i grafici riportati della produzione di metano con i risultati ottenuti dalle analisi settimanali è evidente che la curva della produzione specifica cumulata di metano (Figura 58) a partire dalla quinta settimana abbia subito una variazione della pendenza; in particolare, una riduzione della produzione di metano può essere associata all'incremento del parametro FOS/TAC (Figura 62) e della concentrazione di VFA (Figura 63), un'elevata produzione di VFA non adeguatamente smaltita durante le diverse fasi della digestione anaerobica può comportare l'inibizione della fase di metanogenesi. Pertanto, è necessario effettuare ulteriori valutazioni riguardo l'impiego di substrati impregnati di etanolo in digestione anaerobica.

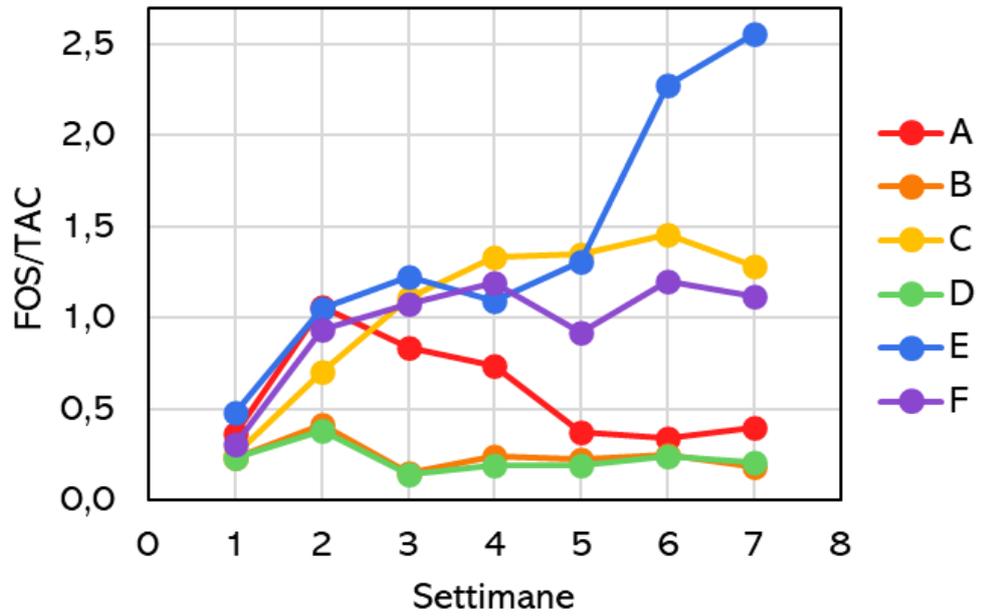


Figura 62 rapporto FOS/TAC - andamento settimanale

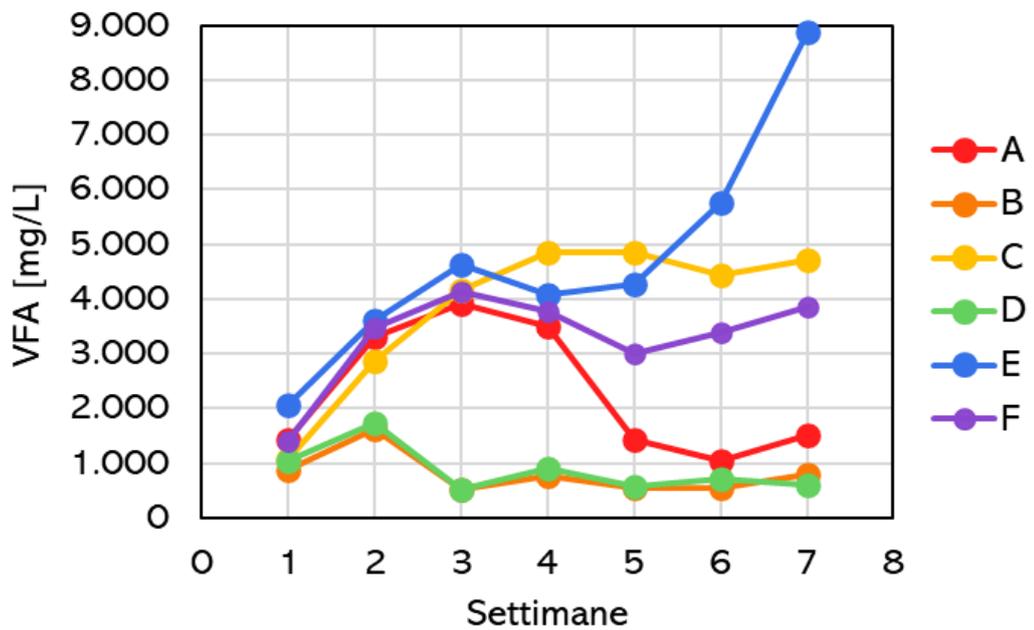


Figura 63 VFA - andamento settimanale

5.3.3 Confronto tra i risultati dei test BMP e in semi-continuo

Le concentrazioni di solvente residuo contenuto nei substrati provenienti dalle estrazioni di olio di pesce effettuate con d-Limonene, 2-Meox ed etanolo sono riportate nel paragrafo 4.5.1 in Tabella 15. Tale valore è stato impiegato per calcolare la concentrazione attesa nei test in semicontinuo per gli HRT di 14 e 21 giorni espressa in g/L. I risultati sono stati comparati con quelli ottenuti dai test BMP riportati nel paragrafo 5.1 e con le concentrazioni riportate in Tabella 11 e Tabella 12.

Per quanto riguarda i test effettuati con d-Limonene, nell'esperimento in semi-continuo la concentrazione attesa di solvente all'interno del reattore era pari a 1,57 g/L a regime per HRT di 14 giorni e 2,36 g/L a regime per HRT di 21 giorni; la presenza del solvente ha compromesso la produzione di metano, la quale si è ridotta del 50% rispetto al reattore di controllo. Tale effetto è stato riscontrato anche nei test BMP; infatti, i reattori denominati Lim30-I, i quali avevano una concentrazione di solvente nella miscela pari a 2,35 g/L, hanno subito una riduzione della produzione di metano del 40%. Pertanto, i risultati del test in semi-continuo risultano essere coerenti con quanto osservato nei test BMP e con quanto riportato in letteratura [50], [57], [218], nonostante la differente natura degli esperimenti e le diverse caratteristiche del substrato.

Nel caso del 2-Meox, la concentrazione a regime per HRT di 14 giorni è stata di circa 0,36 g/L, raggiungendo 0,54 g/L per HRT di 21 giorni, valori simili a quelli osservati nei test BMP Meox5-I e Meox15-I. Nel test semicontinuo, la produzione di metano è aumentata del 24% rispetto al controllo, mentre nei BMP si è registrato un aumento del 10% con un

rapporto solvente/(solvente + controllo) del 5%. Questa differenza potrebbe dipendere da un miglior adattamento della popolazione microbica al solvente rispetto ai test BMP.

Infine, il substrato con etanolo è risultato essere quello con la concentrazione di solvente più alta (301 mg EtOH/g di pesce). Con un HRT di 14 giorni la concentrazione attesa era di 5,8 g/L, e con uno di 21 è salita a 7,8 g/L. Alla fine delle prime quattro settimane, la produzione di metano è risultata superiore del 50% rispetto al controllo, mentre al termine dell'esperimento si è rilevato un aumento complessivo del 37%. Nei BMP con etanolo, l'aumento della produzione di metano è stato del 74% con una concentrazione nel reattore batch di circa 6 g/L. Tuttavia, nel semi-continuo, la presenza di etanolo ha disturbato maggiormente il processo, con una produzione di metano sì superiore al controllo, ma con segnali di interferenza alle alte concentrazioni, come evidenziato dalla riduzione della pendenza della curva di produzione di metano e dagli aumentati valori di VFA e del rapporto FOS/TAC.

5.3.4 Considerazioni conclusive sui test in semi-continuo

La co-digestione anaerobica dei rifiuti di pesce con altri rifiuti organici, specialmente di origine agricola, è emersa come un metodo promettente per la produzione di metano. Tale pratica ha guadagnato maggiore attenzione nel corso degli anni, con diversi studi che hanno esplorato la digestione anaerobica dei rifiuti di pesce in combinazione con materiali come residui di fragole, polpa di sisal, residui di bambù e la frazione vegetale dei rifiuti solidi dei mercati [129]. Tra le strategie proposte, dalla co-digestione con la frazione liquida della carbonizzazione

idrotermale dei residui di bambù si è osservato un incremento della produzione di metano rispetto alla sola frazione liquida, nello specifico sono stati prodotti 133 mL/g_{vs} grazie all'aggiunta del 25% di scarti del pesce [134]. Inoltre, la combinazione di rifiuti di pesce con scarti di fragole ha portato ad una produzione di metano di circa 120 mL/g_{vs}. Inoltre, il digestato risultante era ricco di sostanze nutritive, rendendolo potenzialmente utilizzabile come ammendante organico in agricoltura [135].

La digestione anaerobica dei rifiuti di pesce da sola non è consigliabile a causa di un rapporto inadeguato tra i macronutrienti necessari ai microorganismi. Tuttavia, la co-digestione di rifiuti di pesce sembra essere una strategia vincente, soprattutto se associata a substrati fortemente carboniosi. Nel presente lavoro di ricerca sono stati impiegati diversi residui di estrazione di olio di pesce e scarti di tonno tal quali in co-digestione con code di cipolla. È stato evidenziato che l'aggiunta del 30%_{vs} di scarti di pesce tal quali ha aumentato la resa di metano del 25% rispetto alla mono-digestione delle code di cipolla; gli scarti impregnati di 2-Meox ed etanolo hanno comportato un incremento della resa di metano del 46% e 58%, rispettivamente. Tuttavia, nei processi effettuati con scarto tal quale ed impregnato con 2-Meox non sono stati riscontrati effetti negativi in termini di stabilità del processo, al contrario del processo che includeva l'etanolo, che ha mostrato un grave accumulo di VFA. La presenza di d-Limonene, puro o contenuto nell'olio essenziale, tuttavia, si riconferma una forte condizione inibente per il metabolismo batterico.

5.4 Risultati dei test di fitotossicità

Sono stati effettuati test di fitotossicità per valutare l'effetto del digestato settimanale proveniente dai reattori B, C, D ed E su piante di peperoncino Diavolicchio.

I parametri agronomici rilevati a fine esperimento sono stati studiati attraverso due metodi statistici ampiamente utilizzati per confrontare le medie di più gruppi e verificare se esistono differenze significative tra di essi. Nello specifico è stata effettuata l'analisi della varianza (Analysis of Variance - ANOVA) e il test di Kruskal-Wallis.

L'ANOVA è un test parametrico che presuppone che i dati seguano una distribuzione normale e che la varianza tra i gruppi sia omogenea. Questo metodo è particolarmente potente quando tali presupposti sono rispettati, e consente di confrontare le medie di tre o più gruppi per determinare se almeno uno di essi differisce significativamente dagli altri. Quando i dati non soddisfano i presupposti di normalità o di omogeneità delle varianze, si ricorre a test non parametrici, come il test di Kruskal-Wallis. Questo test è l'alternativa non parametrica all'ANOVA e non richiede che i dati siano distribuiti normalmente. Il test di Kruskal-Wallis, basato sul rango dei dati anziché sui valori assoluti, è ideale per analizzare campioni che non soddisfano i presupposti di parametricità o che presentano varianze ineguali tra i gruppi. Esso confronta le medie dei ranghi tra i gruppi per determinare se esistono differenze significative. Entrambe le analisi sono state applicate sui parametri analizzati (peso totale, lunghezza totale, diametro del fusto e numero di foglie).

Nell'analisi ANOVA la significatività statistica delle differenze nelle variabili di risposta è stata valutata tramite confronti a coppie utilizzando il test di Tukey (a $p < 0,05$).

Tutti i test statistici sono stati eseguiti utilizzando il software XLSTAT rel. 2019.1 (Addinsoft, Parigi, Francia).

Tabella 30 Parametri agronomici

Tesi	Solvente residuo	$P_{tot, 50^{\circ}C}$ [g]	L_{tot} [cm]	Φ_{fusto} [mm]	N_{foglie} [-]
BIANCO	-	0,20	27,4	2,86	25
		0,30	30,9	2,58	46
		0,39	35,7	3,54	22
B	-	0,73	40,0	3,94	67
		0,25	35,5	3,60	34
		0,20	21,3	3,82	30
C	d-Limonene	0,33	29,5	2,96	50
		0,39	28,6	3,54	35
		0,52	36,6	3,74	50
D	Meox	0,22	29,9	3,44	14
		0,26	31,9	3,40	25
		0,18	20,0	2,30	6
E	EtOH	0,33	34,4	3,24	33
		0,30	28,8	3,48	33
		0,27	29,5	3,34	26

Nella Tabella 30 sono riportati i parametri agronomici di ogni pianta al termine dell'esperimento.

L'analisi ANOVA dei parametri agronomici delle piantine irrigate con una miscela composta dal 50% di acqua e 50% da digestati provenienti dai test di digestione anaerobica in semi-continuo indica che, al livello di significatività del 5%, non ci sono differenze statisticamente significative tra i diversi trattamenti applicati alle piantine per quanto riguarda i parametri P_{tot} (contenuto di fosforo totale), L_{tot} (lunghezza totale della

pianta), Φ_{fusto} (diametro del fusto) e N_{foglie} (numero di foglie). In particolare:

- Peso totale: il valore di F è 0,8768 con un valore di p di 0,5118. Ciò indica che le differenze del peso totale delle diverse piante non sono significative al livello di significatività del 5%.
- Lunghezza totale: il valore di F è 0,31835 con un valore di p di 0,85937, indicando anch'esso una mancanza di significatività.
- Diametro del fusto: il valore di F è 1,76164 con un p di 0,21306, suggerendo che anche in questo caso non vi sono differenze significative.
- Numero di foglie: il valore di F è 2,89552 con un p di 0,07866; sebbene questo valore p sia più vicino al limite di significatività del 5%, non raggiunge la soglia per considerare la differenza significativa.

Il test di Kruskal-Wallis, che è un'alternativa non parametrica all'ANOVA, conferma i risultati ottenuti dall'ANOVA parametrico, ossia che non ci sono differenze significative tra i trattamenti. I risultati dettagliati sono i seguenti:

- Peso totale: Chi-Square di 5,78297 con un valore p di 0,21595, indicando nessuna differenza significativa.
- Lunghezza totale: Chi-Square di 0,89326 con un valore p di 0,92553, suggerendo uniformità tra i gruppi.
- Diametro del fusto: Chi-Square di 7,57185 con un valore p di 0,10858, che, pur essendo vicino alla significatività, rimane non significativo.
- Numero di foglie: Chi-Square di 9,27469 con un p di 0,05459, molto vicino alla soglia di significatività del 5%, ma comunque non significativo.

In sintesi, entrambi i test indicano che i solventi residui nei digestati provenienti da reattori alimentati con code di cipolla e residuo dell'estrazione dell'olio di pesce non hanno prodotto differenze statisticamente significative nei parametri agronomici analizzati delle piantine esaminate.

5.5 Risultati test per la produzione di struvite

I digestati dei reattori in semicontinuo alimentati con code di cipolla e scarti di tonno tal quali (reattore B) e code di cipolla e scarti di tonno imbevuti di d-Limonene (reattore C) sono stati impiegati in test di precipitazione della struvite.

Affinché si abbia la formazione della struvite, è necessario che la combinazione delle concentrazioni di NH_4^+ , Mg^{2+} e PO_4^{3-} sia in eccesso rispetto al prodotto di solubilità. Stechiometricamente tali elementi devono, comunque, essere presenti in quantità tali da garantire un rapporto molare N/P/Mg unitario.

Nei comuni digestati, le concentrazioni di PO_4^{3-} e Mg^{2+} sono in difetto rispetto a quelle dell'azoto ammoniacale, è stato necessario impiegare reattivi esterni a base di fosforo e magnesio.

Al fine di valorizzare ogni scarto della lavorazione del tonno sono stati impiegati come fonte di fosforo i residui della calcinazione delle ossa del pesce (paragrafo 4.3 Preparazione dei materiali per il processo di bioraffinazione degli scarti della filiera ittica).

Per quanto riguarda la rimozione dell'azoto ammoniacale nel digestato del reattore B, si evidenzia una netta tendenza di aumento della rimozione all'aumentare del dosaggio di reattivi a base di fosforo e

magnesio. Inoltre, i risultati delle prove condotte a pH 9 risultano maggiormente efficienti rispetto ai risultati dei test condotti a pH 10. Nello specifico con un rapporto R 1/1/1 si osservano delle rese di rimozione dell'ammoniaca pari al 65% in condizioni di pH 9 e del 35% operando a pH 10 (Figura 64). La differenza di performance di rimozione si mantiene pressoché costante anche all'aumentare del rapporto R.

Rese di rimozione dell'ammoniaca superiori al 86% si registrano in condizioni di pH 9 con un rapporto R 1/1.3/1.3, mentre rese maggiori del 93% si osservano con un R 1/1.5/1.5.

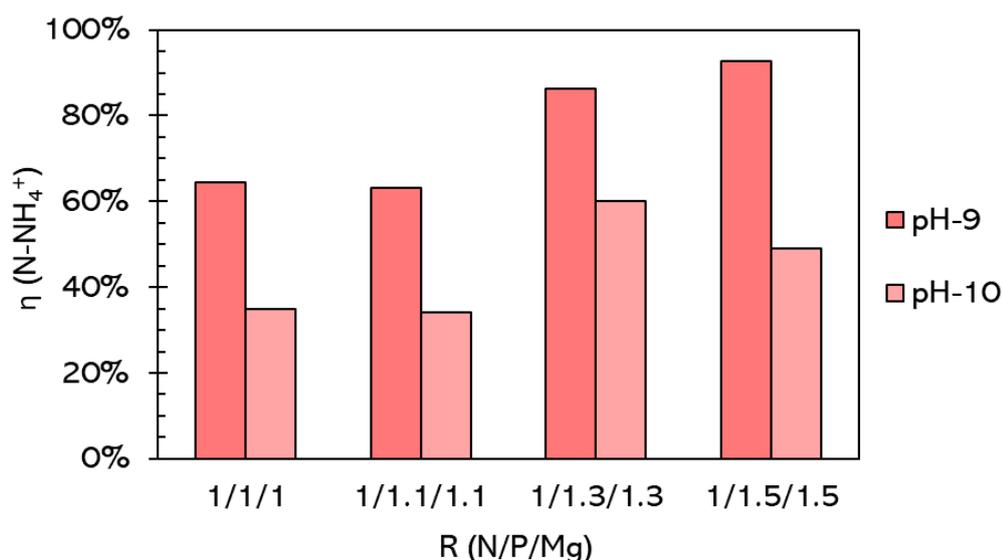


Figura 64 Rendimento di rimozione di $N-NH_4^+$ - digestato B

Per quel che concerne il fosforo (Figura 65), si registrano rendimenti sempre superiori rispetto a quelli riscontrati per l'azoto ammoniacale. Ciò è imputabile alla formazione, oltre che della struvite, di aliquote di altri composti insolubili di fosforo, quali i fosfati di calcio e magnesio.

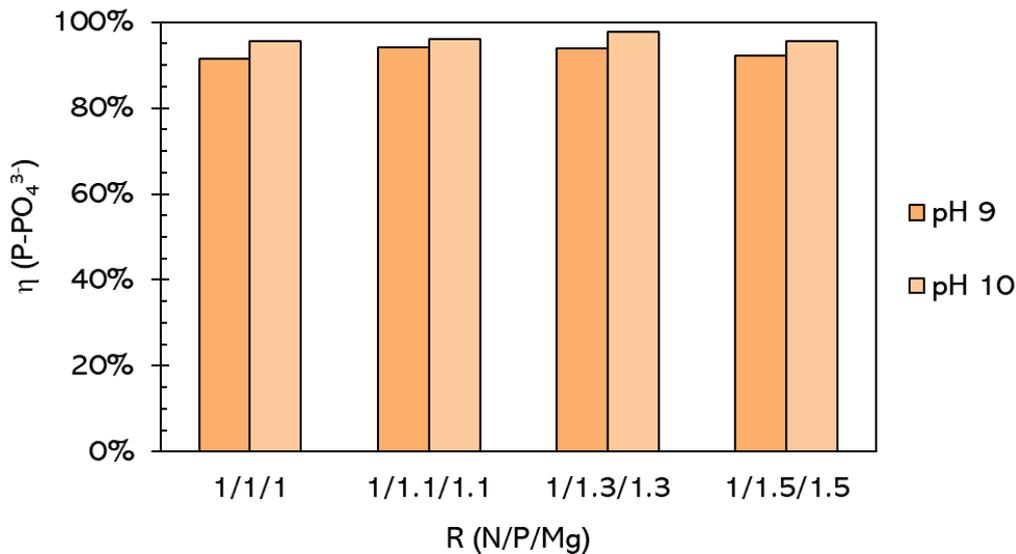


Figura 65 Rendimento di rimozione di $P-PO_4^{3-}$ - digestato B

Le medesime considerazioni possono essere effettuate per i test condotti sul digestato proveniente dal reattore C. In generale, le prestazioni migliori in termini di rimozione dell'azoto ammoniacale sono state ottenute a pH 9; il rapporto R 1/1.5/1.5 ha comportato un rendimento di rimozione dell'azoto del 90%, rispetto al 64% ottenuto operando con un rapporto R 1/1/1 (Figura 66).

Contrariamente, in condizioni operative di pH 10 il rendimento di rimozione del fosforo è risultato essere maggiore del 99% per ciascun rapporto R testato. Anche in questo caso è tuttavia possibile affermare che parte del fosforo sia precipitato sotto forma di fosfati di calcio e magnesio. Le rese di rimozione a pH 9 sono anch'esse promettenti, in quanto si attestano attorno a valori del 95% per i rapporti R più elevati (1/1.3/1.3 e 1/1.5/1.5) e 98% per un rapporto R 1/1.1/1.1 (Figura 67).

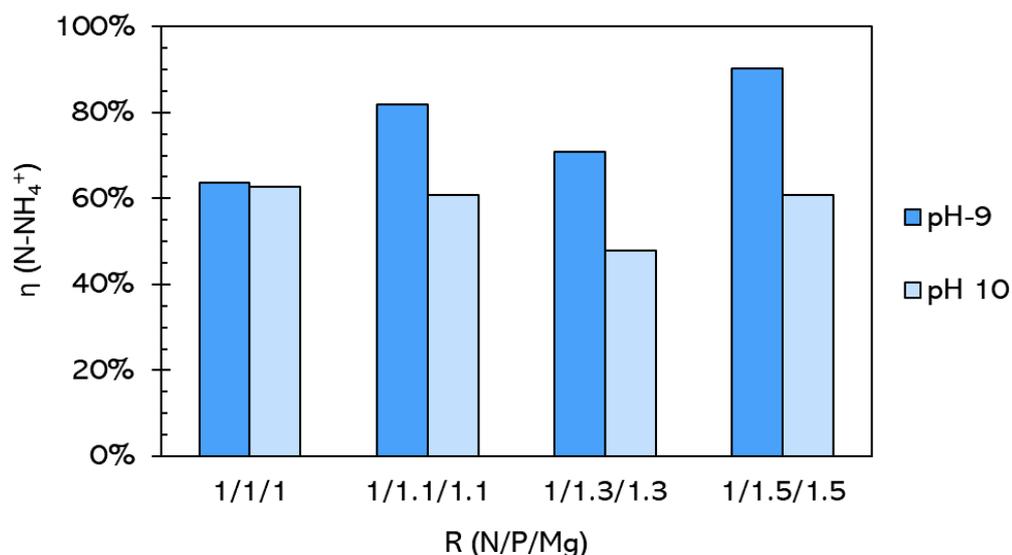


Figura 66 Rendimento di rimozione di N-NH₄⁺ - digestato C

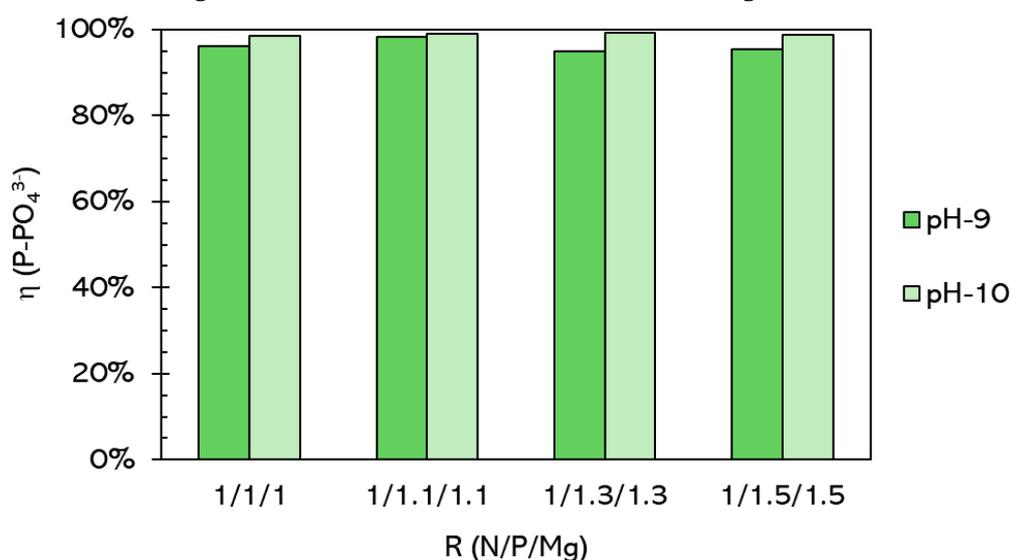


Figura 67 Rendimento di rimozione di P-PO₄³⁻ - digestato C

in generale, è possibile affermare che la precipitazione di struvite sia un valido metodo di valorizzazione degli scarti all'interno della proposta di bioraffinazione del presente elaborato. I residui calcinati delle ossa di pesce risultano un'interessante fonte di fosforo per la produzione di struvite. Non sono state evidenziate differenze significative dall'impiego dei due differenti digestati; pertanto, è possibile affermare che la presenza residua del solvente nel digestato non influisca in alcun modo sulla precipitazione della struvite.

Conclusioni e prospettive

La necessità di sviluppare processi di bioraffinazione efficienti, poco energivori e sostenibili si fonda su diversi fattori critici per il futuro della nostra società e del pianeta. Innanzitutto, la crescente domanda di risorse e di energia, alimentata dall'aumento della popolazione mondiale e dall'industrializzazione, richiede metodi di produzione che riducano l'impatto ambientale. La bioraffinazione, in questo contesto, rappresenta una soluzione promettente poiché consente di convertire biomasse rinnovabili in una vasta gamma di prodotti, sostituendo così i processi tradizionali basati su fonti fossili. L'importanza di sviluppare processi di bioraffinazione efficienti e poco energivori risiede nella necessità di minimizzare il consumo energetico e, di conseguenza, le emissioni di gas serra associate.

Un approccio sostenibile implica l'uso efficiente delle biomasse, la riduzione degli scarti e l'integrazione di tecnologie che consentano il recupero e il riutilizzo dei sottoprodotti. Questo non solo riduce l'impatto ambientale, ma può anche creare nuove opportunità economiche, ad esempio attraverso la produzione di fertilizzanti organici o l'estrazione di composti ad alto valore aggiunto dai residui di lavorazione.

Lo sviluppo di processi di bioraffinazione è strettamente legato agli obiettivi globali di sviluppo sostenibile e alla necessità di affrontare le sfide del cambiamento climatico, della sicurezza alimentare e della gestione delle risorse. La bioraffinazione sostenibile può contribuire a creare un sistema industriale più circolare e resiliente, capace di

soddisfare le esigenze della società moderna senza compromettere la capacità delle future generazioni di soddisfare le proprie.

Investire nella ricerca e nello sviluppo di processi di bioraffinazione efficienti, poco energivori e sostenibili non è solo un imperativo etico e ambientale, ma rappresenta anche una strategia cruciale per costruire un futuro prospero e sostenibile per tutti.

Il processo proposto in questo elaborato rappresenta una vera e propria linea di bioraffinazione per la valorizzazione degli scarti della filiera ittica. Gli scarti del tonno sono stati forniti dalla ditta Callipo s.r.l. e si componevano di teste di tonno e interiora. Sono stati condotti esperimenti di estrazioni di olio di pesce su entrambi questi substrati. Nello specifico, le interiora sono state impiegate tal quali, ripulite dal sangue e dai fluidi presenti; le teste sono state invece lavorate per dividere le ossa dalle parti molli, queste ultime sono state impiegate come matrice per estrarre l'olio di tonno. Gli esperimenti di estrazione sono stati condotti applicando una metodologia estrattiva a freddo, mediante l'impiego di solventi; sono stati effettuati test con d-Limonene, 2-Meox, etanolo e olio essenziale di arancia. Tuttavia, gli unici campioni analizzabili per valutare la qualità dell'olio provenivano da estrazioni con d-Limonene e 2-Meox. L'analisi dei residui di estrazione di olio di pesce ha mostrato che i campioni estratti dalle teste del tonno contengono acidi grassi essenziali, come il DHA, con il d-Limonene che si è dimostrato il solvente più efficace per l'estrazione di questi composti, seppure anche il 2-Meox abbia mostrato una certa capacità estrattiva. Tuttavia, è possibile affermare che i pesci di media e grande taglia come i tonni non siano adatti per estrarre olio di pesce con questa metodologia. Infatti, l'impossibilità di rimuovere efficacemente le

impurità dai tessuti produce campioni particolarmente torbidi e ricchi di impurezze.

La scelta dei solventi da testare nel processo di estrazione e successivamente quindi come residui nello scarto solido è stata effettuata sulla base di test preliminari di digestione anaerobica in batch. Tali test hanno presentato una panoramica più chiara dell'effetto che i solventi (d-Limonene, etanolo, 2-Meox, cirene e n-esano) hanno sull'attività dei batteri anaerobici e sulla produzione di metano. Gli esperimenti condotti hanno evidenziato differenze significative nei risultati a seconda del solvente utilizzato e della sua concentrazione.

Il d-Limonene si è confermato un potente inibitore del processo di digestione anaerobica, con una riduzione della produzione di metano proporzionale all'aumento della sua concentrazione. A concentrazioni elevate (50% sul peso totale del substrato imbevuto), l'attività microbica è stata totalmente compromessa, portando all'inibizione completa del reattore. Tuttavia, i batteri hanno mostrato una certa capacità di adattamento, come dimostrato nella seconda fase dei test, dove le riduzioni percentuali della produzione di metano erano minori rispetto alla prima fase.

Al contrario del d-Limonene, l'etanolo ha mostrato un effetto stimolante sul processo di digestione anaerobica, con un incremento significativo della produzione di metano all'aumentare della concentrazione di solvente. Tuttavia, l'accumulo di etanolo nel reattore durante la seconda fase ha comportato una variabilità elevata dei risultati e una riduzione della stabilità del processo, suggerendo che il solvente può disturbare la digestione anaerobica nel lungo termine. Tale osservazione è stata avvalorata dai risultati dei test in semi-continuo.

Il n-Esano ha mostrato un comportamento intermedio, con un effetto inibitorio a concentrazioni elevate (50%) e una certa capacità dei batteri di adattarsi alla presenza del solvente nella seconda fase del test. Il reattore con 50% di esano nella seconda fase ha mostrato un incremento del 35% nella produzione di metano rispetto alla fase precedente, indicando capacità di adattamento e una parziale biodegradazione del solvente. Tuttavia, le caratteristiche di pericolosità di questo solvente non lo rendono idoneo per l'impiego nel processo di bioraffinazione proposto nel presente elaborato.

Il 2-Meox ha mostrato un effetto promettente, con una produzione di metano simile a quella della cellulosa non impregnata ed un'elevata capacità di adattamento alla presenza del solvente da parte dei microrganismi. Questo suggerisce che tale solvente possa rappresentare una valida risorsa in linee di bioraffinazione che impiegano solventi e prevedono come fase di valorizzazione la digestione anaerobica. I test in semi-continuo hanno confermato tali risultati, infatti le produzioni di metano sono state più elevate rispetto a quelle del reattore di controllo e i parametri di processo si sono mantenuti in un range accettabile.

Il cirene si è rivelato un solvente promettente, con una produzione di metano in linea con quella teorica e una riduzione della variabilità tra i risultati nella seconda fase del test, suggerendo che i batteri siano in grado di adattarsi e degradare parzialmente il solvente.

Dai cicli di estrazione effettuati è stato prodotto un residuo solido la cui valorizzazione è effettuata mediante il processo di digestione anaerobica. Sono infatti stati effettuati test in semi-continuo per valutare la produzione di metano dalla co-digestione di questi residui con code di cipolla. L'utilizzo del d-Limonene e dell'olio essenziale si è confermato

inibente per il processo di digestione anaerobica, mentre i solventi 2-Meox ed etanolo hanno mostrato risultati più promettenti, con un incremento della produzione di metano rispettivamente del 46% e del 71% rispetto alla mono-digestione delle code di cipolla. Tuttavia, l'etanolo ha mostrato un accumulo di acidi grassi volatili che ha compromesso la stabilità del processo.

Parallelamente ai test di estrazione e di digestione anaerobica, le ossa provenienti dalle teste del tonno sono state trattate per la produzione di struvite, un composto di forte interesse agronomico. Le ossa del pesce sono risultate essere un'interessante fonte di fosforo; pertanto, esse sono state impiegate per la precipitazione dei macronutrienti sotto forma di struvite dal digestato proveniente dai test di digestione anaerobica. I promettenti risultati ottenuti aprono le porte ad ulteriori indagini su tale procedura.

Il digestato è stato contestualmente impiegato in test di fitotossicità, al fine di valutare se il suo impiego tal quale e la presenza dei solventi abbiano effetti sulla crescita delle piante. Sono stati testati i digestati provenienti dai reattori alimentati con teste di cipolla e rifiuti di pesce non trattato, rifiuti di pesce impregnati di d-Limonene, di 2-Meox e di etanolo. Dalle analisi statistiche effettuate sui parametri agronomici rilevati al termine dell'esperimento non è stata evidenziata alcuna differenza statistica tra le piante irrigate con una miscela composta dal 50% di acqua e 50% di digestato e tra le piante di controllo, irrigate esclusivamente con acqua. Per tanto, la presenza dei solventi non sembra inficiare in alcun modo la crescita delle piante.

In conclusione, seppure i risultati della ricerca non forniscano una base sufficientemente solida per sviluppare una filiera di valorizzazione

pronta per l'implementazione immediata, essi forniscono differenti punti di partenza per ulteriori studi. Lo studio preliminare sull'azione dei solventi in digestione anaerobica fornisce una base per valutazioni che trovano applicazione in svariati processi, in quanto i solventi vengono utilizzati per una vastissima gamma di applicazioni. Le analisi dell'olio di pesce estratto con d-Limonene e 2-Meox hanno evidenziato che i pesci di grande taglia non sono ideali per questo metodo estrattivo. Le principali criticità sono state riscontrate nella rimozione delle impurità dagli scarti del pesce; pertanto, sarebbe interessante proseguire la ricerca testando differenti trattamenti per la pulizia e la rimozione delle impurità. Inoltre, ulteriori studi su pesci di piccola taglia potrebbero evidenziare che l'impiego di 2-Meox come solvente permetta un'adeguata estrazione degli acidi di interesse per la produzione di Omega-3 ed al contempo non comprometta il processo di digestione anaerobica successivo.

Un interessante aspetto da investigare ulteriormente sarebbe infatti la fattibilità economica del processo, sebbene il d-Limonene sia risultato essere il miglior solvente in termini di estrazione di olio di pesce, esso compromette significativamente il processo di digestione anaerobica; pertanto, uno studio che metta a confronto l'impiego di 2-Meox ed-Limonene nella linea di valorizzazione proposta nel presente lavoro di tesi contribuirebbe a validare la scelta dell'uno o dell'altro solvente.

Infine, le ossa di pesce sono risultate essere un interessante fonte di fosforo per la precipitazione della struvite, ulteriori studi potrebbero favorire l'impiego di questo sottoprodotto nell'industria agricola.

Bibliografia

- [1] 'European Parliament', European Parliament. Accessed: May 13, 2024. [Online]. Available: <https://www.europarl.europa.eu/portal>
- [2] E. MacArthur, *Towards the circular economy*. Journal of Industrial Ecology.
- [3] 'Commission adopts ambitious new Circular Economy Package', European Commission - European Commission. Accessed: May 10, 2024. [Online]. Available: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_15_6203
- [4] *Directive (EU) 2018/851 of the European Parliament and of the Council of 30 May 2018 amending Directive 2008/98/EC on waste (Text with EEA relevance)*, vol. 150. 2018. Accessed: May 10, 2024. [Online]. Available: <http://data.europa.eu/eli/dir/2018/851/oj/eng>
- [5] 'The European Green Deal - European Commission'. Accessed: May 13, 2024. [Online]. Available: https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal_en
- [6] 'Council approves conclusions on making the recovery circular and green'. Accessed: May 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.consilium.europa.eu/en/press/press-releases/2020/12/17/council-approves-conclusions-on-making-the-recovery-circular-and-green/>
- [7] 'Farm to Fork Strategy - European Commission'. Accessed: May 13, 2024. [Online]. Available: https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en
- [8] *Regolamento (UE) 2020/741 del Parlamento europeo e del Consiglio del 25 maggio 2020 recante prescrizioni minime per il riutilizzo dell'acqua (Testo rilevante ai fini del SEE)*, vol. 177. 2020. Accessed: Oct. 31, 2024. [Online]. Available: <http://data.europa.eu/eli/reg/2020/741/oj/ita>
- [9] 'Horizon Europe - European Commission'. Accessed: May 13, 2024. [Online]. Available: <https://research-and-innovation.ec.europa.eu/funding/funding->

opportunities/funding-programmes-and-open-calls/horizon-europe_en

- [10] 'Circular economy in cities - European Commission'. Accessed: May 13, 2024. [Online]. Available: https://commission.europa.eu/eu-regional-and-urban-development/topics/cities-and-urban-development/priority-themes-eu-cities/circular-economy-cities_en
- [11] 'Waste Framework Directive - European Commission'. Accessed: May 20, 2024. [Online]. Available: https://environment.ec.europa.eu/topics/waste-and-recycling/waste-framework-directive_en
- [12] M. Chen, L. Xia, and P. Xue, 'Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate', *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 59, no. 2, pp. 85–89, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.ibiod.2006.07.011.
- [13] X. Zhao, K. Cornish, and Y. Vodovotz, 'Narrowing the Gap for Bioplastic Use in Food Packaging: An Update', *Environ. Sci. Technol.*, vol. 54, no. 8, pp. 4712–4732, Apr. 2020, doi: 10.1021/acs.est.9b03755.
- [14] P. R. Yaashikaa, P. Senthil Kumar, and S. Varjani, 'Valorization of agro-industrial wastes for biorefinery process and circular bioeconomy: A critical review', *Bioresour. Technol.*, vol. 343, p. 126126, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.biortech.2021.126126.
- [15] S. Gupta, P. Mondal, V. B. Borugadda, and A. K. Dalai, 'Advances in upgradation of pyrolysis bio-oil and biochar towards improvement in bio-refinery economics: A comprehensive review', *Environ. Technol. Innov.*, vol. 21, p. 101276, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.eti.2020.101276.
- [16] J. C. Solarte-Toro and C. A. Cardona Alzate, 'Biorefineries as the base for accomplishing the sustainable development goals (SDGs) and the transition to bioeconomy: Technical aspects, challenges and perspectives', *Bioresour. Technol.*, vol. 340, p. 125626, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2021.125626.
- [17] K. Azim, B. Soudi, S. Boukhari, C. Perissol, S. Roussos, and I. Thami Alami, 'Composting parameters and compost quality: a literature review', *Org. Agric.*, vol. 8, no. 2, pp. 141–158, Jun. 2018, doi: 10.1007/s13165-017-0180-z.
- [18] F. Rizzioli, D. Bertasini, D. Bolzonella, N. Frison, and F. Battista, 'A critical review on the techno-economic feasibility of nutrients recovery from anaerobic digestate in the agricultural sector', *Sep.*

- Purif. Technol.*, vol. 306, p. 122690, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.seppur.2022.122690.
- [19] 'Phosphorus Recovery from Wastewater by Struvite Crystallization: A Review: Critical Reviews in Environmental Science and Technology: Vol 39, No 6'. Accessed: Aug. 04, 2024. [Online]. Available: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643380701640573>
- [20] Q. Guan *et al.*, 'A review of struvite crystallization for nutrient source recovery from wastewater', *J. Environ. Manage.*, vol. 344, p. 118383, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.jenvman.2023.118383.
- [21] A. Nagarajan, B. Goyette, V. Raghavan, A. Bhaskar, and R. Rajagopal, 'Nutrient recovery via struvite production from livestock manure-digestate streams: Towards closed loop bio-economy', *Process Saf. Environ. Prot.*, vol. 171, pp. 273–288, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.psep.2023.01.006.
- [22] A. Nagarajan, Y. Chen, V. Raghavan, B. Goyette, and R. Rajagopal, 'Sustainable nutrient recovery through struvite precipitation from poultry and multi-substrate agricultural waste digestates', *Bioresour. Technol. Rep.*, vol. 27, p. 101924, Sep. 2024, doi: 10.1016/j.biteb.2024.101924.
- [23] P. Wadchasit *et al.*, 'Improvement of biogas production and quality by addition of struvite precipitates derived from liquid anaerobic digestion effluents of palm oil wastes', *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 11, no. 1, p. 109081, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.jece.2022.109081.
- [24] T. Zhang, L. Ding, and H. Ren, 'Pretreatment of ammonium removal from landfill leachate by chemical precipitation', *J. Hazard. Mater.*, vol. 166, no. 2, pp. 911–915, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.11.101.
- [25] A. Adnan, F. A. Koch, and D. S. Mavnic, 'Pilot-scale study of phosphorus recovery through struvite crystallization – II: Applying in-reactor supersaturation ratio as a process control parameter', *J. Environ. Eng. Sci.*, vol. 2, no. 6, pp. 473–483, Nov. 2003, doi: 10.1139/s03-048.
- [26] M. I. H. Bhuiyan, D. S. Mavnic, and R. D. Beckie, 'A Solubility and Thermodynamic Study of Struvite', *Environ. Technol.*, vol. 28, no. 9, pp. 1015–1026, Sep. 2007, doi: 10.1080/09593332808618857.
- [27] N. C. Bouropoulos and P. G. Koutsoukos, 'Spontaneous precipitation of struvite from aqueous solutions', *J. Cryst. Growth*,

- vol. 213, no. 3, pp. 381–388, Jun. 2000, doi: 10.1016/S0022-0248(00)00351-1.
- [28] Md. M. Rahman, M. A. Mohd. Salleh, U. Rashid, A. Ahsan, M. M. Hossain, and C. S. Ra, 'Production of slow release crystal fertilizer from wastewaters through struvite crystallization – A review', *Arab. J. Chem.*, vol. 7, no. 1, pp. 139–155, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.arabjc.2013.10.007.
- [29] D. Zhang, Y. Chen, G. Jilani, W. Wu, W. Liu, and Z. Han, 'Optimization of struvite crystallization protocol for pretreating the swine wastewater and its impact on subsequent anaerobic biodegradation of pollutants', *Bioresour. Technol.*, vol. 116, pp. 386–395, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.107.
- [30] S. Daneshgar, A. Callegari, A. G. Capodaglio, and D. Vaccari, 'The Potential Phosphorus Crisis: Resource Conservation and Possible Escape Technologies: A Review', *Resources*, vol. 7, no. 2, Art. no. 2, Jun. 2018, doi: 10.3390/resources7020037.
- [31] J. B. Zimmerman, P. T. Anastas, H. C. Erythropel, and W. Leitner, 'Designing for a green chemistry future', *Science*, vol. 367, no. 6476, pp. 397–400, Jan. 2020, doi: 10.1126/science.aay3060.
- [32] P. J. Dunn, 'The importance of Green Chemistry in Process Research and Development', *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 4, pp. 1452–1461, Jan. 2012, doi: 10.1039/C1CS15041C.
- [33] Y. Chen, J. J. Cheng, and K. S. Creamer, 'Inhibition of anaerobic digestion process: A review', *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 10, pp. 4044–4064, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.biortech.2007.01.057.
- [34] W. J. Krasavage, J. L. O'Donoghue, G. D. DiVincenzo, and C. J. Terhaar, 'The relative neurotoxicity of methyl-n-butyl ketone, n-hexane and their metabolites', *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 52, no. 3, pp. 433–441, Mar. 1980, doi: 10.1016/0041-008X(80)90338-5.
- [35] A. Mutti *et al.*, 'n-Hexane metabolism in occupationally exposed workers.', *Occup. Environ. Med.*, vol. 41, no. 4, pp. 533–538, Nov. 1984, doi: 10.1136/oem.41.4.533.
- [36] V. Pace, P. Hoyos, L. Castoldi, P. Domínguez de María, and A. R. Alcántara, '2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF): A Biomass-Derived Solvent with Broad Application in Organic Chemistry', *ChemSusChem*, vol. 5, no. 8, pp. 1369–1379, 2012, doi: 10.1002/cssc.201100780.

- [37] H. H. Khoo, L. L. Wong, J. Tan, V. Isoni, and P. Sharratt, 'Synthesis of 2-methyl tetrahydrofuran from various lignocellulosic feedstocks: Sustainability assessment via LCA', *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 95, pp. 174–182, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.resconrec.2014.12.013.
- [38] V. Rapinel *et al.*, '2-Methyloxolane (2-MeOx) as Sustainable Lipophilic Solvent to Substitute Hexane for Green Extraction of Natural Products. Properties, Applications, and Perspectives', *Molecules*, vol. 25, p. 3417, Jul. 2020, doi: 10.3390/molecules25153417.
- [39] O. Claux *et al.*, 'Dry and Aqueous 2-Methyloxolane as Green Solvents for Simultaneous Production of Soybean Oil and Defatted Meal', *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 9, no. 21, pp. 7211–7223, May 2021, doi: 10.1021/acssuschemeng.0c09252.
- [40] F. Gao, R. Bai, F. Ferlin, L. Vaccaro, M. Li, and Y. Gu, 'Replacement strategies for non-green dipolar aprotic solvents', *Green Chem.*, vol. 22, no. 19, pp. 6240–6257, Oct. 2020, doi: 10.1039/D0GC02149K.
- [41] N. A. Stini, P. L. Gkizis, and C. G. Kokotos, 'Cyrene: a bio-based solvent for the Mizoroki–Heck reaction of aryl iodides', *Org. Biomol. Chem.*, vol. 21, no. 2, pp. 351–358, 2023, doi: 10.1039/D2OB02012B.
- [42] J. Sherwood, T. J. Farmer, and J. H. Clark, 'Catalyst: Possible Consequences of the N-Methyl Pyrrolidone REACH Restriction', *Chem*, vol. 4, no. 9, pp. 2010–2012, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.chempr.2018.08.035.
- [43] T. Brouwer and B. Schuur, 'Dihydrolevoglucosenone (Cyrene), a Biobased Solvent for Liquid–Liquid Extraction Applications', *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 8, no. 39, pp. 14807–14817, Oct. 2020, doi: 10.1021/acssuschemeng.0c04159.
- [44] J. E. Camp, 'Bio-available Solvent Cyrene: Synthesis, Derivatization, and Applications', *ChemSusChem*, vol. 11, no. 18, pp. 3048–3055, 2018, doi: 10.1002/cssc.201801420.
- [45] M. Hans, S. Kumar, A. K. Chandel, and I. Polikarpov, 'A review on bioprocessing of paddy straw to ethanol using simultaneous saccharification and fermentation', *Process Biochem.*, vol. 85, pp. 125–134, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.procbio.2019.06.019.
- [46] T. Raj *et al.*, 'Recent advances in commercial biorefineries for lignocellulosic ethanol production: Current status, challenges and

- future perspectives', *Bioresour. Technol.*, vol. 344, p. 126292, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.biortech.2021.126292.
- [47] S. A. Siddiqui, M. J. Pahmeyer, E. Assadpour, and S. M. Jafari, 'Extraction and purification of d-limonene from orange peel wastes: Recent advances', *Ind. Crops Prod.*, vol. 177, p. 114484, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.indcrop.2021.114484.
- [48] M. Virost, V. Tomao, C. Ginies, F. Visinoni, and F. Chemat, 'Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination: Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation', *J. Chromatogr. A*, vol. 1196–1197, pp. 147–152, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.04.035.
- [49] P. S. Calabrò, E. Paone, and D. Komilis, 'Strategies for the sustainable management of orange peel waste through anaerobic digestion', *J. Environ. Manage.*, vol. 212, pp. 462–468, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.jenvman.2018.02.039.
- [50] B. Ruiz and X. Flotats, 'Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview', *Waste Manag.*, vol. 34, no. 11, pp. 2063–2079, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.wasman.2014.06.026.
- [51] M. C. Gutiérrez, A. Serrano, B. Alonso-Fariñas, J. A. Siles, and M. A. Martín, 'Impact of D-Limonene in the technical and economic feasibility of the anaerobic digestion applied in biorefineries', *Biomass Convers. Biorefinery*, Dec. 2022, doi: 10.1007/s13399-022-03685-6.
- [52] 'Substance Information - ECHA'. Accessed: Jul. 01, 2024. [Online]. Available: <https://echa.europa.eu/it/substance-information/-/substanceinfo/100.025.284>
- [53] H. Gasparetto, F. de Castilhos, and N. P. G. Salau, 'Screening, experimental data, and robust kinetic modeling of vegetable oil extraction using p-cymene as a neoteric solvent for *n*-hexane replacement', *J. Clean. Prod.*, vol. 392, p. 136336, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.jclepro.2023.136336.
- [54] A. Falk Filipsson, J. Bard, S. Karlsson, W. H. Organization, and I. P. on C. Safety, *Limonene*. World Health Organization, 1998. Accessed: Jul. 01, 2024. [Online]. Available: <https://iris.who.int/handle/10665/42039>
- [55] S. M. Schwartz, R. S. Boethling, and T. Leighton, 'Fate of the terpenes anethole and dipentene in a bench-scale activated sludge system', *Chemosphere*, vol. 21, no. 10, pp. 1153–1160, Jan. 1990, doi: 10.1016/0045-6535(90)90136-H.

- [56] H. R. Srilatha, K. Nand, K. S. Babu, and K. Madhukara, 'Fungal pretreatment of orange processing waste by solid-state fermentation for improved production of methane', *Process Biochem.*, vol. 30, no. 4, pp. 327–331, Jan. 1995, doi: 10.1016/0032-9592(95)87041-5.
- [57] P. S. Calabrò, L. Pontoni, I. Porqueddu, R. Greco, F. Pirozzi, and F. Malpei, 'Effect of the concentration of essential oil on orange peel waste biomethanization: Preliminary batch results', *Waste Manag.*, vol. 48, pp. 440–447, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.wasman.2015.10.032.
- [58] M. A. Martín, J. A. Siles, A. F. Chica, and A. Martín, 'Biomethanization of orange peel waste', *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 23, pp. 8993–8999, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.133.
- [59] E. R. Baümler, M. E. Carrín, and A. A. Carelli, 'Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent', *J. Food Eng.*, vol. 178, pp. 190–197, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.01.020.
- [60] Y. Yuan, N. Shimizu, F. Li, J. Magaña, and X. Li, 'Buckwheat waste depolymerization using a subcritical ethanol solution for extraction of bioactive components: from the laboratory to pilot scale', *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 11, no. 3, p. 109807, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.jece.2023.109807.
- [61] S. Kim and B. Dale, 'Ethanol Fuels: E10 or E85 – Life Cycle Perspectives (5 pp)', *Int. J. Life Cycle Assess.*, vol. 11, no. 2, pp. 117–121, Mar. 2006, doi: 10.1065/lca2005.02.201.
- [62] D. Glossman-Mitnik and M. Maciejewska, *Solvents, Ionic Liquids and Solvent Effects*. BoD – Books on Demand, 2020.
- [63] C. Wu *et al.*, 'Effect of ethanol pre-fermentation and inoculum-to-substrate ratio on methane yield from food waste and distillers' grains', *Appl. Energy*, vol. 155, pp. 846–853, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.apenergy.2015.04.081.
- [64] D. Feng *et al.*, 'How can ethanol enhance direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion?', *Biotechnol. Adv.*, vol. 52, p. 107812, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107812.
- [65] Z. Zhao *et al.*, 'Why do DIETers like drinking: Metagenomic analysis for methane and energy metabolism during anaerobic digestion with ethanol', *Water Res.*, vol. 171, p. 115425, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.watres.2019.115425.

- [66] J. Zhang, W. Zhao, H. Zhang, Z. Wang, C. Fan, and L. Zang, 'Recent achievements in enhancing anaerobic digestion with carbon-based functional materials', *Bioresour. Technol.*, vol. 266, pp. 555–567, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.076.
- [67] P. Gahlot *et al.*, 'Conductive material engineered direct interspecies electron transfer (DIET) in anaerobic digestion: Mechanism and application', *Environ. Technol. Innov.*, vol. 20, p. 101056, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.eti.2020.101056.
- [68] 'REnewable SOLVENTs with high performance in application and improved toxicity profile | ReSolve Project | Fact Sheet | H2020', CORDIS | European Commission. Accessed: Jul. 07, 2024. [Online]. Available: <https://cordis.europa.eu/project/id/745450/it>
- [69] B. A. de Marco, B. S. Rechelo, E. G. Tótolí, A. C. Kogawa, and H. R. N. Salgado, 'Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review', *Saudi Pharm. J.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.jsps.2018.07.011.
- [70] A. Ivanković, 'Review of 12 Principles of Green Chemistry in Practice', *Int. J. Sustain. Green Energy*, vol. 6, no. 3, p. 39, 2017, doi: 10.11648/j.ijrse.20170603.12.
- [71] R. A. Sheldon, 'Utilisation of biomass for sustainable fuels and chemicals: Molecules, methods and metrics', *Catal. Today*, vol. 167, no. 1, pp. 3–13, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.cattod.2010.10.100.
- [72] P. T. Anastas, M. M. Kirchoff, and T. C. Williamson, 'Catalysis as a foundational pillar of green chemistry', *Appl. Catal. Gen.*, vol. 221, no. 1, pp. 3–13, Nov. 2001, doi: 10.1016/S0926-860X(01)00793-1.
- [73] T. Welton, 'Solvents and sustainable chemistry', *Proc. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 471, no. 2183, p. 20150502, Nov. 2015, doi: 10.1098/rspa.2015.0502.
- [74] J. Kärkkäinen, 'Preparation and characterization of some ionic liquids and their use in the dimerization reaction of 2-methylpropene', jultika.oulu.fi. Accessed: Jul. 07, 2024. [Online]. Available: <https://oulurepo.oulu.fi/handle/10024/35456>
- [75] A. K. de Souza Abud and C. E. de Farias Silva, 'Chapter 21 - Bioethanol in Brazil: Status, Challenges and Perspectives to Improve the Production', in *Bioethanol Production from Food Crops*, R. C. Ray and S. Ramachandran, Eds., Academic Press, 2019, pp. 417–443. doi: 10.1016/B978-0-12-813766-6.00021-7.

- [76] A. M. Sawant and K. R. Vamkudoth, 'Biosynthetic process and strain improvement approaches for industrial penicillin production', *Biotechnol. Lett.*, vol. 44, no. 2, pp. 179–192, Feb. 2022, doi: 10.1007/s10529-022-03222-5.
- [77] G. A. Pauli, *The Blue Economy: 10 Years, 100 Innovations, 100 Million Jobs*. Paradigm Publications, 2010.
- [78] 'Agenda 2030', ONU Italia. Accessed: May 20, 2024. [Online]. Available: <https://unric.org/it/agenda-2030/>
- [79] 'The EU and the United Nations – common goals for a sustainable future - European Commission'. Accessed: Jul. 19, 2024. [Online]. Available: https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/sustainable-development-goals/eu-and-united-nations-common-goals-sustainable-future_en
- [80] I. H. Pike and A. Jackson, 'Fish oil: production and use now and in the future', *Lipid Technol.*, vol. 22, no. 3, pp. 59–61, 2010, doi: 10.1002/lite.201000003.
- [81] M. Lucarini *et al.*, 'Sustainable Management of Secondary Raw Materials from the Marine Food-Chain: A Case-Study Perspective', *Sustainability*, vol. 12, no. 21, Art. no. 21, Jan. 2020, doi: 10.3390/su12218997.
- [82] FAO, *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. FAO ;, 2022. Accessed: May 20, 2024. [Online]. Available: <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cc0461en>
- [83] 'Record fisheries and aquaculture production makes critical contribution to global food security', Newsroom. Accessed: May 20, 2024. [Online]. Available: <https://www.fao.org/newsroom/detail/record-fisheries-aquaculture-production-contributes-food-security-290622/en>
- [84] 'The state of World fisheries and aquaculture 2022'. Accessed: May 20, 2024. [Online]. Available: <https://www.fao.org/3/cc0461en/online/cc0461en.html>
- [85] 'Utilization and processing of fisheries and aquaculture production'. Accessed: May 19, 2024. [Online]. Available: <https://www.fao.org/3/cc0461en/online/sofia/2022/utilization-processing-fisheries-production.html>
- [86] 'Towards Blue Transformation', www.fao.org. Accessed: May 20, 2024. [Online]. Available: <https://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/en/>

- [87] NOT AVAILABLE, *Fao yearbook. fishery and aquaculture statistics 2016*. Place of publication not identified: FOOD & AGRICULTURE ORG, 2018.
- [88] 'the EU market overview'. Accessed: Jul. 20, 2024. [Online]. Available: <https://eumofa.eu/the-eu-market>
- [89] L. Redazione, 'Gli italiani amano mangiare il pesce?', *Rinnovabili*. Accessed: Nov. 01, 2024. [Online]. Available: <https://www.rinnovabili.it/agrifood/gli-italiani-e-il-consumo-di-pesce/>
- [90] 'ISNART - Istituto Nazionale Ricerche Turistiche', *Isnart*. Accessed: Nov. 01, 2024. [Online]. Available: <https://www.isnart.it/it/>
- [91] A. Pignatelli, 'Pesce: cresce il consumo degli italiani', *Corriere dell'Economia*. Accessed: Jul. 21, 2024. [Online]. Available: <https://www.corrieredelleconomia.it/2023/06/02/pesce-cresce-il-consumo-degli-italiani/>
- [92] A. Nawaz *et al.*, 'Valorization of fisheries by-products: Challenges and technical concerns to food industry', *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 99, pp. 34–43, May 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2020.02.022.
- [93] H. Ritchie, P. Rosado, and M. Roser, 'Environmental Impacts of Food Production', *Our World Data*, Dec. 2022, Accessed: Nov. 01, 2024. [Online]. Available: <https://ourworldindata.org/environmental-impacts-of-food>
- [94] 'The State of World Fisheries and Aquaculture 2020'. Accessed: May 20, 2024. [Online]. Available: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/02d655dc-06a3-4a37-bd5a-328f45bc2852/content/ca9229en.html>
- [95] E. Paone *et al.*, 'Towards the Anchovy Biorefinery: Biogas Production from Anchovy Processing Waste after Fish Oil Extraction with Biobased Limonene', *Sustainability*, vol. 13, no. 5, Art. no. 5, Jan. 2021, doi: 10.3390/su13052428.
- [96] S. R., J. J., and T. S. A., 'Purification, characterization, molecular modeling and docking study of fish waste protease', *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 118, pp. 569–583, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.119.
- [97] A. Ghaly, V. vasudevan ramakrishnan, M. S. Brooks, S. M. Budge, and D. Dave, 'Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review', *J. Microb.*

- Biochem. Technol.*, vol. 5, pp. 107–129, Jan. 2013, doi: 10.4172/1948-5948.1000110.
- [98] S. Khan *et al.*, 'Fish Protein and Its Derivatives: The Novel Applications, Bioactivities, and Their Functional Significance in Food Products', *Food Rev. Int.*, vol. 38, no. 8, pp. 1607–1634, Nov. 2022, doi: 10.1080/87559129.2020.1828452.
- [99] J. Toppe, S. Albrektsen, B. Hope, and A. Aksnes, 'Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species', *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 146, no. 3, pp. 395–401, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.cbpb.2006.11.020.
- [100] B. Socas-Rodríguez, G. Álvarez-Rivera, A. Valdés, E. Ibáñez, and A. Cifuentes, 'Food by-products and food wastes: are they safe enough for their valorization?', *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 114, pp. 133–147, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.05.002.
- [101] G. Caruso, R. Floris, C. Serangeli, and L. Di Paola, 'Fishery Wastes as a Yet Undiscovered Treasure from the Sea: Biomolecules Sources, Extraction Methods and Valorization', *Mar. Drugs*, vol. 18, no. 12, Art. no. 12, Dec. 2020, doi: 10.3390/md18120622.
- [102] S. Tiwari, P. Yawale, and N. Upadhyay, 'Carotenoids: Extraction strategies and potential applications for valorization of under-utilized waste biomass', *Food Biosci.*, vol. 48, p. 101812, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.fbio.2022.101812.
- [103] V. Venugopal, 'Valorization of Seafood Processing Discards: Bioconversion and Bio-Refinery Approaches', *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 5, Jun. 2021, doi: 10.3389/fsufs.2021.611835.
- [104] Md. S. I. Sarkar *et al.*, 'Exploring fish in a new way: A review on non-food industrial applications of fish', *Heliyon*, vol. 9, no. 12, p. e22673, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e22673.
- [105] C. S. Araújo, A. M. C. Rodrigues, M. R. S. Peixoto Joele, E. A. F. Araújo, and L. F. H. Lourenço, 'Optimizing process parameters to obtain a bioplastic using proteins from fish byproducts through the response surface methodology', *Food Packag. Shelf Life*, vol. 16, pp. 23–30, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.fpsl.2018.01.009.
- [106] E. M. P. X. Neves, R. R. Pereira, G. V. da S. Pereira, G. V. da S. Pereira, L. L. Vieira, and L. de F. H. Lourenço, 'EFFECT OF POLYMER MIXTURE ON BIOPLASTIC DEVELOPMENT FROM FISH WASTE', *Bol. Inst. Pesca*, vol. 45, no. 4, Art. no. 4, Dec. 2019, doi: 10.20950/1678-2305.2019.45.4.518.

- [107] 'Homepage | IFFO - The Marine Ingredients Organisation'. Accessed: May 20, 2024. [Online]. Available: <https://www.iffo.com/>
- [108] N. C. Chinenye, C. I. Felicia, and U. C. Doris, 'Fatty acid profile of some selected locally consumed vegetable oils in Enugu State, Nigeria', *Am. J. Food Nutr.*, vol. 7, no. 4, pp. 130–135, 2019.
- [109] M. Cholewski, M. Tomczykowa, and M. Tomczyk, 'A comprehensive review of chemistry, sources and bioavailability of omega-3 fatty acids', *Nutrients*, vol. 10, no. 11, p. 1662, 2018.
- [110] W. S. Harris, 'Omega-3 fatty acids', in *Encyclopedia of dietary supplements*, CRC Press, 2004, pp. 493–504.
- [111] A. M. R. <https://www.alliedmarketresearch.com>, 'Fish Oil Omega-3 Market Size, Share | Forecast to 2032', Allied Market Research. Accessed: May 26, 2024. [Online]. Available: <https://www.alliedmarketresearch.com/fish-oil-omega-3-market-A07082>
- [112] R. Adili, M. Hawley, and M. Holinstat, 'Regulation of platelet function and thrombosis by omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids', *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, vol. 139, pp. 10–18, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.prostaglandins.2018.09.005.
- [113] N. Rubio-Rodríguez, S. M. de Diego, S. Beltrán, I. Jaime, M. T. Sanz, and J. Rovira, 'Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods', *J. Food Eng.*, vol. 109, no. 2, pp. 238–248, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.10.011.
- [114] R. Ciriminna, A. Scurria, G. Avellone, and M. Pagliaro, 'A Circular Economy Approach to Fish Oil Extraction', *ChemistrySelect*, vol. 4, no. 17, pp. 5106–5109, 2019, doi: 10.1002/slct.201900851.
- [115] 'Fats and oils in human nutrition. Report of a joint expert consultation. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization', *FAO Food Nutr. Pap.*, vol. 57, pp. i–xix, 1–147, 1994.
- [116] K. W. Sheppard and C. L. Cheatham, 'Omega-6/omega-3 fatty acid intake of children and older adults in the U.S.: dietary intake in comparison to current dietary recommendations and the Healthy Eating Index', *Lipids Health Dis.*, vol. 17, no. 1, p. 43, Mar. 2018, doi: 10.1186/s12944-018-0693-9.

- [117] N. and A. (NDA) EFSA Panel on Dietetic Products, 'Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to DHA and contribution to normal brain development pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006', *EFSA J.*, vol. 12, no. 10, p. 3840, 2014.
- [118] A. P. Jain, K. K. Aggarwal, and P. Y. Zhang, 'Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease', *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, vol. 19, no. 3, pp. 441–5, 2015.
- [119] J. Hartweg, R. Perera, V. M. Montori, S. F. Dinneen, A. H. Neil, and A. J. Farmer, 'Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) for type 2 diabetes mellitus', *Cochrane Database Syst. Rev.*, no. 1, 2008, doi: 10.1002/14651858.CD003205.pub2.
- [120] F. K. Welty, 'Omega-3 fatty acids and cognitive function', *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 34, no. 1, p. 12, Feb. 2023, doi: 10.1097/MOL.0000000000000862.
- [121] M. H. Bloch and J. Hannestad, 'Omega-3 fatty acids for the treatment of depression: systematic review and meta-analysis', *Mol. Psychiatry*, vol. 17, no. 12, pp. 1272–1282, 2012.
- [122] J. M. Coletta, S. J. Bell, and A. S. Roman, 'Omega-3 fatty acids and pregnancy', *Rev. Obstet. Gynecol.*, vol. 3, no. 4, p. 163, 2010.
- [123] 'The production of fish meal and oil - 3. The process'. Accessed: Aug. 01, 2024. [Online]. Available:
- [124] T. Chimsook and W. Wannalangka, 'Effect of Microwave Pretreatment on Extraction Yield and Quality of Catfish Oil in Northern Thailand', *MATEC Web Conf.*, vol. 35, p. 04001, 2015, doi: 10.1051/matecconf/20153504001.
- [125] K. Ivanovs and D. Blumberga, 'Extraction of fish oil using green extraction methods: a short review', *Energy Procedia*, vol. 128, pp. 477–483, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.egypro.2017.09.033.
- [126] Y. Zhang *et al.*, 'Extraction of fish oil from fish heads using ultra-high pressure pre-treatment prior to enzymatic hydrolysis', *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 70, p. 102670, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.ifset.2021.102670.
- [127] G. Catanese *et al.*, 'Insights on the drivers of genetic divergence in the European anchovy', *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 4180, Jun. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-03926-z.
- [128] 'Peru sets quota for first anchovy fishing season, while previous one still underway' <https://www.fao.org/4/X6899E/X6899E04.htm>, Undercurrent

- News. Accessed: Aug. 02, 2024. [Online]. Available: <https://www.undercurrentnews.com/2017/01/12/peru-opens-first-anchovy-fishing-season-while-previous-one-still-underway/>
- [129] I. Ahuja, E. Dauksas, J. F. Remme, R. Richardsen, and A.-K. Løes, 'Fish and fish waste-based fertilizers in organic farming – With status in Norway: A review', *Waste Manag.*, vol. 115, pp. 95–112, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.wasman.2020.07.025.
- [130] S. Nordrum, T. Åsgård, K. D. Shearer, and P. Arnessen, 'Availability of phosphorus in fish bone meal and inorganic salts to Atlantic salmon (*Salmo solar*) as determined by retention', *Aquaculture*, vol. 157, no. 1, pp. 51–61, Nov. 1997, doi: 10.1016/S0044-8486(97)00145-2.
- [131] M. Radziemska, M. D. Vaverková, D. Adamcová, M. Brtnický, and Z. Mazur, 'Valorization of Fish Waste Compost as a Fertilizer for Agricultural Use', *Waste Biomass Valorization*, vol. 10, no. 9, pp. 2537–2545, Sep. 2019, doi: 10.1007/s12649-018-0288-8.
- [132] M. Illera-Vives, S. Seoane Labandeira, L. M. Brito, A. López-Fabal, and M. E. López-Mosquera, 'Evaluation of compost from seaweed and fish waste as a fertilizer for horticultural use', *Sci. Hortic.*, vol. 186, pp. 101–107, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.scienta.2015.02.008.
- [133] A. Muscolo *et al.*, 'AnchoisFert: A New Organic Fertilizer from Fish Processing Waste for Sustainable Agriculture', *Glob. Chall.*, vol. 6, no. 5, p. 2100141, 2022, doi: 10.1002/gch2.202100141.
- [134] U. Choe, A. M. Mustafa, H. Lin, U. Choe, and K. Sheng, 'Anaerobic co-digestion of fish processing waste with a liquid fraction of hydrothermal carbonization of bamboo residue', *Bioresour. Technol.*, vol. 297, p. 122542, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.biortech.2019.122542.
- [135] A. Serrano, J. A. Siles, A. F. Chica, and M. Á. Martín, 'Agri-food waste valorization through anaerobic co-digestion: fish and strawberry residues', *J. Clean. Prod.*, vol. 54, pp. 125–132, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.jclepro.2013.05.002.
- [136] S. Fraterrigo Garofalo *et al.*, 'From tuna viscera to added-value products: A circular approach for fish-waste recovery by green enzymatic hydrolysis', *Food Bioprod. Process.*, vol. 137, pp. 155–167, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.fbp.2022.11.006.
- [137] 'ICCAT·CICTA·CICAA'. Accessed: Aug. 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.iccat.int/en/index.asp>

- [138] C. Sawatdeenarunat *et al.*, 'Anaerobic biorefinery: Current status, challenges, and opportunities', *Bioresour. Technol.*, vol. 215, pp. 304–313, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.074.
- [139] D. Deublein and A. Steinhauser, *Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction*. John Wiley & Sons, 2011.
- [140] P. Merlin Christy, L. R. Gopinath, and D. Divya, 'A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms', *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 34, pp. 167–173, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.rser.2014.03.010.
- [141] O. W. Awe, Y. Zhao, A. Nzihou, D. P. Minh, and N. Lyczko, 'A Review of Biogas Utilisation, Purification and Upgrading Technologies', *Waste Biomass Valorization*, vol. 8, no. 2, pp. 267–283, Mar. 2017, doi: 10.1007/s12649-016-9826-4.
- [142] M. Kim, Y.-H. Ahn, and R. E. Speece, 'Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic', *Water Res.*, vol. 36, no. 17, pp. 4369–4385, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0043-1354(02)00147-1.
- [143] D. G. Cirne, A. Lehtomäki, L. Björnsson, and L. L. Blackall, 'Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops', *J. Appl. Microbiol.*, vol. 103, no. 3, pp. 516–527, Sep. 2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03270.x.
- [144] E. Paone, T. Tabanelli, and F. Mauriello, 'The rise of lignin biorefinery', *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 24, pp. 1–6, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.cogsc.2019.11.004.
- [145] M. U. Khan and B. K. Ahring, 'Lignin degradation under anaerobic digestion: Influence of lignin modifications -A review', *Biomass Bioenergy*, vol. 128, p. 105325, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.biombioe.2019.105325.
- [146] M. H. Gerardi, *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. John Wiley & Sons, 2003.
- [147] S. Kalyuzhnyi, A. Veeken, and B. Hamelers, 'Two-particle model of anaerobic solid state fermentation', *Water Sci. Technol.*, vol. 41, no. 3, pp. 43–50, Feb. 2000, doi: 10.2166/wst.2000.0054.
- [148] S. Hwang, Y. Lee, and K. Yang, 'Maximization of acetic acid production in partial acidogenesis of swine wastewater', *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 75, no. 5, pp. 521–529, 2001, doi: 10.1002/bit.10068.

- [149] F. E. Mosey and X. A. Fernandes, 'Patterns of Hydrogen in Biogas from the Anaerobic Digestion of Milk-Sugars', *Water Sci. Technol.*, vol. 21, no. 4-5, pp. 187-196, Apr. 1989, doi: 10.2166/wst.1989.0222.
- [150] B. Bilitewski, G. Härdtle, and K. Marek, *Waste Management*. Springer Science & Business Media, 1996.
- [151] H. G. Wood and L. G. Ljungdahl, 'Autotrophic character of the acetogenic bacteria', *Var. Autotroph. Life*, vol. 1, pp. 201-250, 1991.
- [152] 'Methanogenesis and methanogenic partnerships | Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences'. Accessed: May 20, 2024. [Online]. Available: <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rstb.1982.0064>
- [153] K. R. Manchala, Y. Sun, D. Zhang, and Z.-W. Wang, 'Chapter Two - Anaerobic Digestion Modelling', in *Advances in Bioenergy*, vol. 2, Y. Li and X. Ge, Eds., Elsevier, 2017, pp. 69-141. doi: 10.1016/bs.aibe.2017.01.001.
- [154] K. Ostrem and N. J. Themelis, 'Greening waste: Anaerobic digestion for treating the organic fraction of municipal solid wastes', *Earth Eng. Cent. Columbia Univ.*, vol. 200, 2004.
- [155] E. C. Duin and M. L. McKee, 'A New Mechanism for Methane Production from Methyl-Coenzyme M Reductase As Derived from Density Functional Calculations', *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 8, pp. 2466-2482, Feb. 2008, doi: 10.1021/jp709860c.
- [156] 'TRATTAMENTI BIOLOGICI AVANZATI - Vincenzo Naddeo, Tiziano Zarra, Vincenzo Belgiorno, Alessandra Cesaro - Google Libri'. Accessed: Oct. 03, 2023. [Online]. Available: [https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=voaCDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA5&dq=ncenzo+Belgiorno,+V.+N.+\(2018\).+Trattamenti+Biologici+Avanzati+-+BioMAc+2018&ots=jYr3iZhVWa&sig=_l74Jw98lW_VrtqcTOw_43nWPzI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=voaCDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA5&dq=ncenzo+Belgiorno,+V.+N.+(2018).+Trattamenti+Biologici+Avanzati+-+BioMAc+2018&ots=jYr3iZhVWa&sig=_l74Jw98lW_VrtqcTOw_43nWPzI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- [157] E. Nie, P. He, H. Zhang, L. Hao, L. Shao, and F. Lü, 'How does temperature regulate anaerobic digestion?', *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 150, p. 111453, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.rser.2021.111453.
- [158] C. Madigou, K.-A. Lê Cao, C. Bureau, L. Mazéas, S. Déjean, and O. Chapleur, 'Ecological consequences of abrupt temperature changes in anaerobic digesters', *Chem. Eng. J.*, vol. 361, pp. 266-277, 2019.

- [159] R. E. Speece, 'Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment', *Environ. Sci. Technol.*, vol. 17, no. 9, pp. 416A-427A, 1983.
- [160] L. Appels, J. Baeyens, J. Degrève, and R. Dewil, 'Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge', *Prog. Energy Combust. Sci.*, vol. 34, no. 6, pp. 755–781, 2008.
- [161] C. Zhang, H. Su, J. Baeyens, and T. Tan, 'Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production', *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 38, pp. 383–392, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.rser.2014.05.038.
- [162] B. K. Ahring, M. Sandberg, and I. Angelidaki, 'Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 43, no. 3, pp. 559–565, Jul. 1995, doi: 10.1007/BF00218466.
- [163] O. Lahav and B. E. Morgan, 'Titration methodologies for monitoring of anaerobic digestion in developing countries—a review', *J. Chem. Technol. Biotechnol. Int. Res. Process Environ. Clean Technol.*, vol. 79, no. 12, pp. 1331–1341, 2004.
- [164] L. Mézes, G. Biró, E. Sulyok, M. Petis, J. Borbély, and J. Tamás, 'Novel approach of the basis of FOS/TAC method', in *Proceedings. International Symposia" Risk Factors for Environment and Food Safety" and" Natural Resources and Sustainable Development" and*, 2011.
- [165] S. Castelli and S. C. de Sannazzaro, *Biomasse per la produzione di energia. Produzione, gestione e processi di trasformazione*. Maggioli Editore, 2011.
- [166] G. F. Parkin and W. F. Owen, 'Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges', *J. Environ. Eng.*, vol. 112, no. 5, pp. 867–920, 1986.
- [167] R. Rajagopal, D. I. Massé, and G. Singh, 'A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia', *Bioresour. Technol.*, vol. 143, pp. 632–641, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.030.
- [168] O. Yenigün and B. Demirel, 'Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review', *Process Biochem.*, vol. 48, no. 5, pp. 901–911, May 2013, doi: 10.1016/j.procbio.2013.04.012.
- [169] J. Procházka, P. Dolejš, J. Máca, and M. Dohányos, 'Stability and inhibition of anaerobic processes caused by insufficiency or

- excess of ammonia nitrogen', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 93, no. 1, pp. 439–447, Jan. 2012, doi: 10.1007/s00253-011-3625-4.
- [170] Z. Zahan, M. Z. Othman, and T. H. Muster, 'Anaerobic digestion/co-digestion kinetic potentials of different agro-industrial wastes: A comparative batch study for C/N optimisation', *Waste Manag.*, vol. 71, pp. 663–674, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.wasman.2017.08.014.
- [171] M. S. Romero-Güiza, J. Vila, J. Mata-Alvarez, J. M. Chimenos, and S. Astals, 'The role of additives on anaerobic digestion: A review', *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 58, pp. 1486–1499, May 2016, doi: 10.1016/j.rser.2015.12.094.
- [172] S. Jain, S. Jain, I. T. Wolf, J. Lee, and Y. W. Tong, 'A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste', *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 52, pp. 142–154, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.rser.2015.07.091.
- [173] P. Scherer and H. Sahn, 'Influence of sulphur-containing compounds on the growth of *Methanosarcina barkeri* in a defined medium', *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 12, no. 1, pp. 28–35, Mar. 1981, doi: 10.1007/BF00508115.
- [174] R. V. Barbosa *et al.*, 'Mercury concentrations in tuna blood and muscle mirror seawater methylmercury in the Western and Central Pacific Ocean', *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 180, p. 113801, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.113801.
- [175] S. Hamelin, M. Amyot, T. Barkay, Y. Wang, and D. Planas, 'Methanogens: Principal Methylators of Mercury in Lake Periphyton', *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, no. 18, pp. 7693–7700, Sep. 2011, doi: 10.1021/es2010072.
- [176] F. Fazzino, R. Luque, E. Paone, A. Pedullà, R. Sidari, and P. S. Calabrò, 'Long-Term Preservation of Orange Peel Waste for the Production of Acids and Biogas', *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 10, no. 41, pp. 13733–13741, Oct. 2022, doi: 10.1021/acssuschemeng.2c03878.
- [177] R. Wikandari, S. Gudipudi, I. Pandiyan, R. Millati, and M. J. Taherzadeh, 'Inhibitory effects of fruit flavors on methane production during anaerobic digestion', *Bioresour. Technol.*, vol. 145, pp. 188–192, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.041.
- [178] R. Ciriminna, M. Lomeli-Rodriguez, P. D. Carà, J. A. Lopez-Sanchez, and M. Pagliaro, 'Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy', *Chem. Commun.*, vol. 50, no. 97, pp. 15288–15296, Nov. 2014, doi: 10.1039/C4CC06147K.

- [179] F. Fazzino, P. Frontera, A. Malara, A. Pedullà, and P. S. Calabrò, 'Effects of carbon-based conductive materials on semi-continuous anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste and waste activated sludge', *Chemosphere*, vol. 357, p. 142077, Jun. 2024, doi: 10.1016/j.chemosphere.2024.142077.
- [180] R. Mulka, W. Szulczewski, J. Szlachta, and M. Mulka, 'Estimation of methane production for batch technology – A new approach', *Renew. Energy*, vol. 90, pp. 440–449, May 2016, doi: 10.1016/j.renene.2016.01.012.
- [181] E. Maleki, A. Bokhary, and B. Q. Liao, 'A review of anaerobic digestion bio-kinetics', *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 17, no. 4, pp. 691–705, Dec. 2018, doi: 10.1007/s11157-018-9484-z.
- [182] N. Kythreotou, G. Florides, and S. A. Tassou, 'A review of simple to scientific models for anaerobic digestion', *Renew. Energy*, vol. 71, pp. 701–714, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.renene.2014.05.055.
- [183] D. E. Contois, 'Kinetics of Bacterial Growth: Relationship between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures', *Microbiology*, vol. 21, no. 1, pp. 40–50, 1959, doi: 10.1099/00221287-21-1-40.
- [184] 'UNI/TS 11703:2018 - UNI Ente Italiano di Normazione'. Accessed: May 17, 2024. [Online]. Available: <https://store.uni.com/en/uni-ts-11703-2018>
- [185] C. Holliger *et al.*, 'Towards a standardization of biomethane potential tests', *Water Sci. Technol.*, vol. 74, no. 11, pp. 2515–2522, Sep. 2016, doi: 10.2166/wst.2016.336.
- [186] andrea, 'Fattoria della Piana - La Calabria Buona si Muove', Fattoria della Piana. Accessed: May 18, 2024. [Online]. Available: <https://fattoriadellapiana.it/>
- [187] A. Donoso-Bravo, S. I. Pérez-Elvira, and F. Fdz-Polanco, 'Application of simplified models for anaerobic biodegradability tests. Evaluation of pre-treatment processes', *Chem. Eng. J.*, vol. 160, no. 2, pp. 607–614, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.cej.2010.03.082.
- [188] S. Achinas and G. J. W. Euverink, 'Theoretical analysis of biogas potential prediction from agricultural waste', *Resour.-Effic. Technol.*, vol. 2, no. 3, pp. 143–147, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.reffit.2016.08.001.
- [189] 'Regulation - 2019/1009 - EN - EUR-Lex'. Accessed: Apr. 22, 2024. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2019/1009/oj>

- [190] 'Regolamento Commissione Ue 2022/1519/Ue', Reteambiente. Accessed: Jul. 17, 2024. [Online]. Available: <https://www.reteambiente.it/normativa/49245/regolamento-commissione-ue-20221519ue/>
- [191] 'EU waste management law | EUR-Lex'. Accessed: Jul. 17, 2024. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/EN/legal-content/summary/eu-waste-management-law.html>
- [192] 'Fighting water pollution from agricultural nitrates | EUR-Lex'. Accessed: Jul. 17, 2024. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/EN/legal-content/summary/fighting-water-pollution-from-agricultural-nitrates.html>
- [193] E. Angelonidi and S. R. Smith, 'A comparison of wet and dry anaerobic digestion processes for the treatment of municipal solid waste and food waste', *Water Environ. J.*, vol. 29, no. 4, pp. 549–557, 2015, doi: 10.1111/wej.12130.
- [194] L. S. Franca and J. P. Bassin, 'The role of dry anaerobic digestion in the treatment of the organic fraction of municipal solid waste: A systematic review', *Biomass Bioenergy*, vol. 143, p. 105866, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.biombioe.2020.105866.
- [195] C. Negri *et al.*, 'Anaerobic digestion of food waste for bio-energy production in China and Southeast Asia: A review', *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 133, p. 110138, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.rser.2020.110138.
- [196] F. S. Santos, B. C. Ricci, L. S. França Neta, and M. C. S. Amaral, 'Sugarcane vinasse treatment by two-stage anaerobic membrane bioreactor: Effect of hydraulic retention time on changes in efficiency, biogas production and membrane fouling', *Bioresour. Technol.*, vol. 245, pp. 342–350, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.08.126.
- [197] 'Anaerobic co-digestion of chicken manure and corn stover in batch and continuously stirred tank reactor (CSTR) - ScienceDirect'. Accessed: Nov. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852414000790?via%3Dihub>
- [198] G. Srisowmeya, M. Chakravarthy, and G. Nandhini Devi, 'Critical considerations in two-stage anaerobic digestion of food waste – A review', *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 119, p. 109587, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.rser.2019.109587.
- [199] W. P. Barber and D. C. Stuckey, 'The use of the anaerobic baffled reactor (ABR) for wastewater treatment: a review', *Water Res.*, vol.

33, no. 7, pp. 1559–1578, May 1999, doi: 10.1016/S0043-1354(98)00371-6.

- [200] S. Chang, 'Anaerobic Membrane Bioreactors (AnMBR) for Wastewater Treatment', *Adv. Chem. Eng. Sci.*, vol. 2014, Oct. 2013, doi: 10.4236/aces.2014.41008.
- [201] P. A. Cremonez, J. G. Teleken, T. R. Weiser Meier, and H. J. Alves, 'Two-Stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: A review', *J. Environ. Manage.*, vol. 281, p. 111854, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.jenvman.2020.111854.
- [202] Z. Zahan, M. Z. Othman, and T. H. Muster, 'Anaerobic digestion/co-digestion kinetic potentials of different agro-industrial wastes: A comparative batch study for C/N optimisation', *Waste Manag.*, vol. 71, pp. 663–674, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.wasman.2017.08.014.
- [203] L. Mu, L. Zhang, K. Zhu, J. Ma, M. Ifran, and A. Li, 'Anaerobic co-digestion of sewage sludge, food waste and yard waste: Synergistic enhancement on process stability and biogas production', *Sci. Total Environ.*, vol. 704, p. 135429, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135429.
- [204] L. Li, X. Peng, X. Wang, and D. Wu, 'Anaerobic digestion of food waste: A review focusing on process stability', *Bioresour. Technol.*, vol. 248, pp. 20–28, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2017.07.012.
- [205] R. Karki *et al.*, 'Anaerobic co-digestion: Current status and perspectives', *Bioresour. Technol.*, vol. 330, p. 125001, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2021.125001.
- [206] C. Dennehy *et al.*, 'Anaerobic co-digestion of pig manure and food waste; effects on digestate biosafety, dewaterability, and microbial community dynamics', *Waste Manag.*, vol. 71, pp. 532–541, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.wasman.2017.10.047.
- [207] Z. Wang *et al.*, 'Impact of total solids content on anaerobic co-digestion of pig manure and food waste: Insights into shifting of the methanogenic pathway', *Waste Manag.*, vol. 114, pp. 96–106, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.wasman.2020.06.048.
- [208] T. Fitamo, L. Treu, A. Boldrin, C. Sartori, I. Angelidaki, and C. Scheutz, 'Microbial population dynamics in urban organic waste anaerobic co-digestion with mixed sludge during a change in feedstock composition and different hydraulic retention times', *Water Res.*, vol. 118, pp. 261–271, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.watres.2017.04.012.

- [209] J. Masih-Das and W. Tao, 'Anaerobic co-digestion of foodwaste with liquid dairy manure or manure digestate: Co-substrate limitation and inhibition', *J. Environ. Manage.*, vol. 223, pp. 917–924, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.jenvman.2018.07.016.
- [210] Z. Zhao, Y. Li, J. He, and Y. Zhang, 'Establishing Direct Interspecies Electron Transfer during Laboratory-Scale Anaerobic Digestion of Waste Activated Sludge via Biological Ethanol-Type Fermentation Pretreatment', *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 6, no. 10, pp. 13066–13077, Oct. 2018, doi: 10.1021/acssuschemeng.8b02618.
- [211] M. C. González-Mas, J. L. Rambla, M. P. López-Gresa, M. A. Blázquez, and A. Granell, 'Volatile Compounds in Citrus Essential Oils: A Comprehensive Review', *Front. Plant Sci.*, vol. 10, Feb. 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.00012.
- [212] A. P. H. Association, A. W. W. Association, and W. E. Federation, 'Standard methods for the examination of water and wastewater', in *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 1995, p. [1000]-[1000]. Accessed: Aug. 13, 2024. [Online]. Available: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/pah-246827>
- [213] H. J. D. Dorman and S. G. Deans, 'Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils', *J. Appl. Microbiol.*, vol. 88, no. 2, pp. 308–316, Feb. 2000, doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x.
- [214] Y.-M. Yun, H.-S. Shin, C.-K. Lee, Y.-K. Oh, and H.-W. Kim, 'Inhibition of residual n-hexane in anaerobic digestion of lipid-extracted microalgal wastes and microbial community shift', *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 23, no. 8, pp. 7138–7145, Apr. 2016, doi: 10.1007/s11356-015-4643-z.
- [215] D. M. Pizzone *et al.*, 'The LimoFish Circular Economy Process for the Marine Bioeconomy', *ChemSusChem*, vol. n/a, no. n/a, p. e202301826, doi: 10.1002/cssc.202301826.
- [216] C. W. M. Institute, 'On-farm Composting Handbook Appendix A', 1992, Accessed: Nov. 05, 2024. [Online]. Available: <https://hdl.handle.net/1813/112240>
- [217] G. Liu, Y. Wang, L. Hu, and H. He, 'Characterization of the Volatile Compounds of Onion with Different Fresh-Cut Styles and Storage Temperatures', *Foods*, vol. 11, no. 23, p. 3829, Nov. 2022, doi: 10.3390/foods11233829.
- [218] P. S. Calabrò, E. Paone, and D. Komilis, 'Strategies for the sustainable management of orange peel waste through anaerobic

digestion', *J. Environ. Manage.*, vol. 212, pp. 462–468, Apr. 2018,
doi: 10.1016/j.jenvman.2018.02.039.

La borsa di dottorato cofinanziata con risorse del Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005) risorse Fondo Sociale Europeo REACT-EU, Azione I.1 “Dottorati Innovativi con caratterizzazione industriale”, Azione IV.4 “Dottorati e contratti di ricerca su tematiche dell’innovazione” e Azione IV.5 “Dottorati su tematiche Green”



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



*Ministero dell'Università
e della Ricerca*



PON
RICERCA
E INNOVAZIONE
2014 - 2020

REACT EU

