



Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Ambientali
Monitoraggio e Risanamento dell'Ambiente

Tesi di Laurea

Valorizzazione di sottoprodotti della filiera agroalimentare:
effetto dei pretrattamenti sulla fermentazione acidogenica in
regime mesofilo e termofilo

Relatore:

Prof. Marco Gottardo

Laureanda:

Alessia Scarpa

Matricola: 876219

Anno accademico:

2025/2026

*“La sopravvivenza delle nostre società e del nostro
pianeta dipende da un mondo più sostenibile”.*

(Sustainable Development Goals)

Sommario

Abstract	
1.Introduzione	1
1.1 Direttive europee: rifiuto, sottoprodotto, <i>end of waste</i>	5
1.2 Valorizzazione dei sottoprodotti del settore agroindustriale: da scarto a risorsa	7
1.2.1 Industria vitivinicola	7
1.2.2 Industria brassicola	9
1.3 Processi di conversione biochimica	12
1.3.1 Panoramica sulla Digestione Anaerobica	12
1.3.2 Fermentazione acidogenica e applicazioni degli acidi grassi volatili	14
1.3.3 Principali tecniche di pretrattamento	21
1.3.3.1 Pretrattamento termico	22
1.3.3.2 Pretrattamenti acidi e alcalini	22
1.3.3.3 Pretrattamento ossidativo mediante Reazione Fenton	24
1.3.3.4 Criticità e limiti dei pretrattamenti	28
1.3.4 Parametri del processo fermentativo	30
2. Scopo della tesi	33
3. Materiali e metodi	34
3.1 Substrati	34
3.1.1 Fecce di vino	34
3.1.2 Trebbie di birra	34
3.2 Piano di lavoro	35
3.3 Solidi totali/Solidi volatili	38
3.4 Determinazione dell'azoto ammoniacale (N-NH ₃)	38
3.5 Determinazione dell'azoto totale (TKN)	39
3.6 Determinazione del COD (Chemical Oxygen Demand) su matrice secca	40
3.7 Determinazione di sCOD (Soluble Chemical Oxygen Demand)	41
3.8 Determinazione di acidi grassi volatili	41
3.9 Analisi del pH	42
4. Risultati e discussioni	43
4.1 Caratterizzazione delle fecce di vino	43
4.2 Pretrattamenti delle fecce di vino	44
4.2.1 Solubilizzazione della sostanza organica nelle fecce di vino	44
4.2.2 Rilascio di azoto ammoniacale nelle fecce di vino	45
4.3 Caratterizzazione delle trebbie di birra	46
4.4 Pretrattamenti delle trebbie di birra	47

4.4.1 Solubilizzazione della sostanza organica nelle trebbie di birra	47
4.4.2 Rilascio di azoto ammoniacale nelle trebbie di birra	48
4.5 Prove di fermentazione.....	49
4.5.1 Fermentazione acidogenica in regime termico mesofilo.....	49
4.5.1.1 Controllo in bianco in regime mesofilo	49
4.5.1.2 Fermentazione della trebbia non pretrattata in regime mesofilo	51
4.5.1.3 Fermentazione della trebbia pretrattata con Reagente Fenton in regime mesofilo	53
4.5.1.4 Fermentazione della trebbia pretrattata in ambiente alcalino in regime mesofilo.....	55
4.5.1.5 Fermentazione della feccia non pretrattata in regime mesofilo.....	57
4.5.1.6 Fermentazione della feccia pretrattata con Reagente Fenton in regime mesofilo	59
4.5.1.7 Fermentazione della feccia pretrattata in ambiente alcalino in regime mesofilo	62
4.5.2 Fermentazione acidogenica in regime termico termofilo	64
4.5.2.1 Controllo in bianco in regime termofilo	64
4.5.2.2 Fermentazione della trebbia non pretrattata in regime termofilo	66
4.5.2.3 Fermentazione della trebbia pretrattata con Reagente Fenton in regime termofilo	68
4.5.2.4 Fermentazione della trebbia pretrattata in ambiente alcalino in regime termofilo	70
4.5.2.5 Fermentazione della feccia non pretrattata in regime termofilo	72
4.5.2.6 Fermentazione della feccia pretrattata con Reagente Fenton in regime termofilo	74
4.5.2.7 Fermentazione della feccia pretrattata in ambiente alcalino in regime termofilo.....	76
5. Conclusioni	78
6. Bibliografia	81

Abstract

Lo scopo del presente studio è stato quello di indagare l'effetto di diversi pretrattamenti sulla biodegradabilità di fecce di vino e trebbie di birra, al fine di favorire la produzione di acidi grassi volatili (VFA) mediante fermentazione acidogenica. Dopo una caratterizzazione iniziale, entrambe le matrici sono state sottoposte a pretrattamenti termici in condizione neutre (pH 7, 70°C), acide (pH 2, 70°C), alcaline (pH 13, 70°C) e con Reagente Fenton in ambiente acido. I test sono stati condotti in regime reattoristico batch per una durata totale di 48h. Sulla base dei risultati ottenuti, i pretrattamenti più efficaci sono stati selezionati per le successive prove di fermentazione. Queste prove sono state condotte in reattori batch, con volume di 700 ml e con carico operativo pari a 15gCOD/gVS_{Inoculo}, sia in regime termico mesofilo che termofilo, per una durata di due settimane. I risultati hanno evidenziato che, per i substrati analizzati, il regime termico mesofilo è risultato più favorevole rispetto quello termofilo nella produzione di VFA. Per le fecce di vino, i pretrattamenti applicati non hanno determinato incrementi significativi sulla produzione di VFA rispetto alla matrice grezza. Per le trebbie di birra, invece, il pretrattamento alcalino ha favorito la solubilizzazione del materiale organico ed ha accelerato la bioconversione del substrato, risultando particolarmente promettente per la produzione di acido propionico.

1.Introduzione

Esiste una sola Terra; eppure, è previsto che già nei primi cinquant'anni di questo secolo, per soddisfare i nostri bisogni, saranno necessarie le risorse di tre pianeti (Commissione Europea, 2020).

La popolazione umana è quadruplicata negli ultimi cento anni (Grazioli, 2015), raggiungendo ad oggi quasi 8.2 miliardi di individui (www.unric.org/crescita-o-contrazione). Di conseguenza, nei prossimi decenni si prevede un consumo raddoppiato di risorse come biomasse, combustibili fossili, minerali e metalli che porterà ad un incremento del 70% di produzione di rifiuti entro il 2050 (Commissione Europea, 2020).

Recentemente la problematica del sovrasfruttamento delle risorse si è fatta così evidente da poter calcolare annualmente il giorno esatto in cui la biocapacità della terra è sufficiente a fornire l'impronta ecologica dell'umanità, *Earth Overshoot Day*, che arretra temporalmente ogni anno sempre più. Nel 2025 la biodisponibilità del nostro pianeta è terminata il 24 luglio, evidenziando l'insostenibilità ambientale della società odierna (www.overshoot.footprintnetwork.org).

Tutela dell'ambiente, crescita economica ed inclusione sociale, rientrano nel programma d'azione globale che mira ad uno sviluppo sostenibile della società, inteso come sviluppo che soddisfa i bisogni del presente senza compromettere la capacità delle future generazioni di soddisfare i propri. Tale principio, articolato in 17 Obiettivi di Sviluppo Sostenibile, è cardine dell'Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile, che mira ad una visione olistica di sostenibilità bilanciata dalle sue tre dimensioni: economia, società, ambiente (ONU, 2015).

Purtroppo, viviamo in una società in cui il benessere attuale viene prima di quello delle future generazioni, che preferisce perseguire vantaggi immediati senza porre l'attenzione alle possibili ripercussioni sul lungo periodo. Di questo ne è un esempio il tradizionale concetto economico lineare "prelevare, produrre e smaltire". Azioni come estrazione e trasformazione delle risorse sono fonti principali di emissioni di gas ad effetto serra (GHGs), i quali sono causa di problematiche ambientali come cambiamento climatico, perdita di biodiversità e stress idrico (Commissione Europea, 2020). Seguire questo modello implica depauperare il pianeta di risorse ed alimentare un ingente flusso di rifiuti che contribuiscono significativamente al degrado ambientale (Pacheco et al.,2024) in quanto, il fine vita in discarica o all'incenerimento, sono causa di inquinamento (Lukitawesa et al.,2020).

Pertanto, nel 2020 la Commissione Europea attua il "Green Deal", che è parte integrante dell'agenda 2030, un piano che prevede una serie di strategie e progetti per ridurre le emissioni e raggiungere la neutralità climatica nel 2050 (Green Deal Europeo). Sostenibilità, crescita economica e salvaguardia

dell'ambiente ne sono obiettivi cardine il cui compimento può verificarsi solo ottimizzando il concetto di economia circolare. Tale sistema economico mira a “fare di più con meno”, promuovendo una società che disaccoppi crescita economica dal consumo di risorse, riducendo il flusso di estrazione di materie prime implementando il riciclo e riutilizzo di rifiuti (**Fig. 1**). Un modello rigenerativo con lo scopo di minimizzare la propria impronta sul pianeta e restituire più di quanto si prenda (Zalunardo, 2017) (Alnafrah et al., 2025).

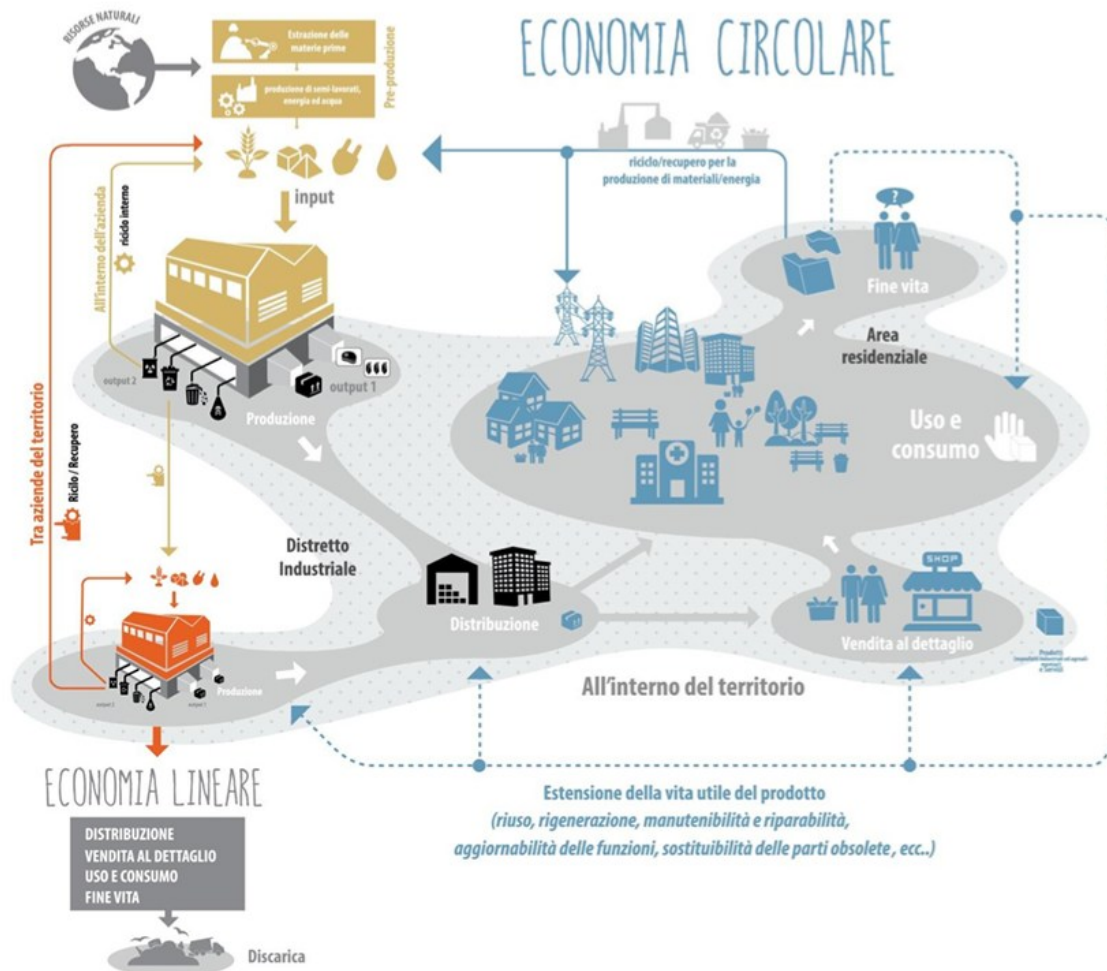


Figura 1: Schema economia circolare

Fonte: Creo et al., 2018

A tal proposito, la Commissione Europea, sostiene il concetto di bioeconomia che rappresenta una strategica opportunità di questo secolo per guidare l'economia verso una crescita più verde, competitiva e resiliente (Commissione Europea, 2025). Mira a sostenere l'odierna ottica di sviluppo promuovendo innovazione biotecnologica e l'utilizzo di biomasse primarie alternative al fossile per la produzione di beni e servizi (biocarburanti, biopolimeri, prodotti chimici). Inoltre, in quest'ottica ci si pone anche l'obiettivo di valorizzare le biomasse secondarie come i sottoprodotti e i residui

provenienti dal settore agricolo, forestale, urbano e alimentare (Commissione Europea, 2025) (BIT, 2017).

Rientra nell'obiettivo di "defossilizzazione", come principale produttore di carbonio rinnovabile, il settore agroalimentare che ricopre circa il 40% del territorio europeo, composto da un insieme di attività che vanno dalla produzione agricola, alla trasformazione, alla distribuzione e al consumo di alimenti (BIT, 2017). Tale filiera, oltre a soddisfare il bisogno primario di nutrizione dell'uomo e fornire servizi ecosistemici al pianeta (EEA, 2015), è anche causa di un elevato flusso di rifiuti organici, sottoprodotti ed effluenti (Creo et al., 2018) accumulati massivamente a causa della crescita demografica, sviluppo economico e cambiamenti nei modelli di produzione e consumo (BIT, 2017) (Albinelli et al., 2024). Infatti, si stima che le diverse attività di trasformazione alimentare producano circa 250 milioni di tonnellate l'anno di scarti (Fig. 2) che sono una sfida sul piano della circolarità (Fava et al., 2015) (Pappalettera, 2024) (Battista et al., 2019). Nell'ambito della bioraffineria, i rifiuti agricoli, in quanto risorse rinnovabili, possono trovare ampia applicazione come substrati per la produzione di *fine chemicals*, materiali e biocombustibili (Shawaky et al., 2025) (Albinelli et al., 2024).

Rientrano in tal contesto l'industria vitivinicola e brassicola (Fig. 3), la cui valorizzazione dei rispettivi sottoprodotti è oggetto di studio del presente elaborato. Pertanto, per convertire la società ad un'economia circolare e più sostenibile è necessario promuovere la sostituzione della produzione petrolchimica con tecniche biotecnologiche basate sulla biomassa (Bastidas-Oyanedel et al., 2015).

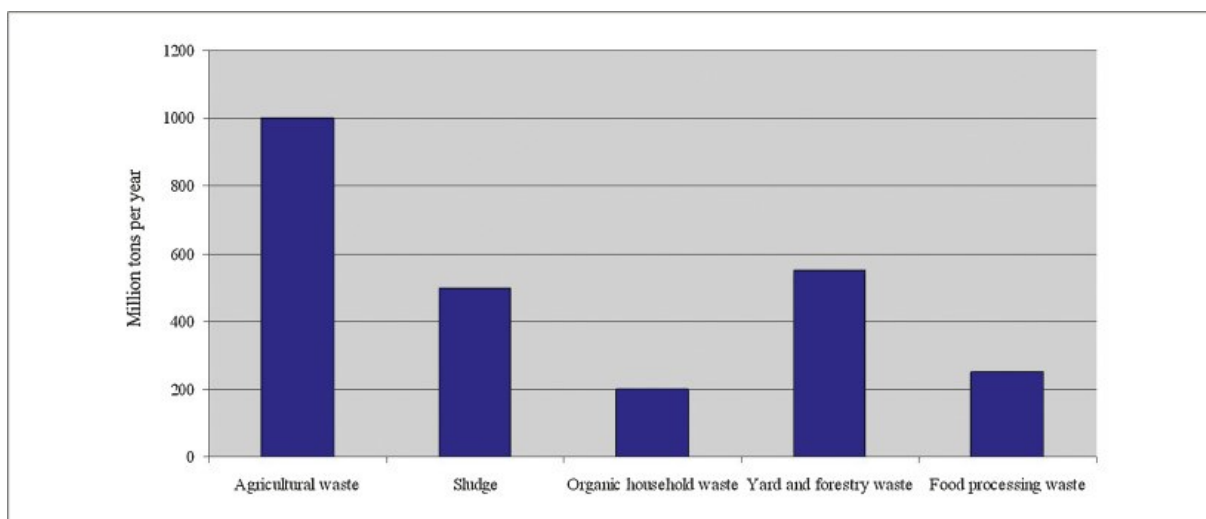


Figura 2: Fonti dei rifiuti in Europa (250 milioni di tonnellate/anno dalla trasformazione alimentare)

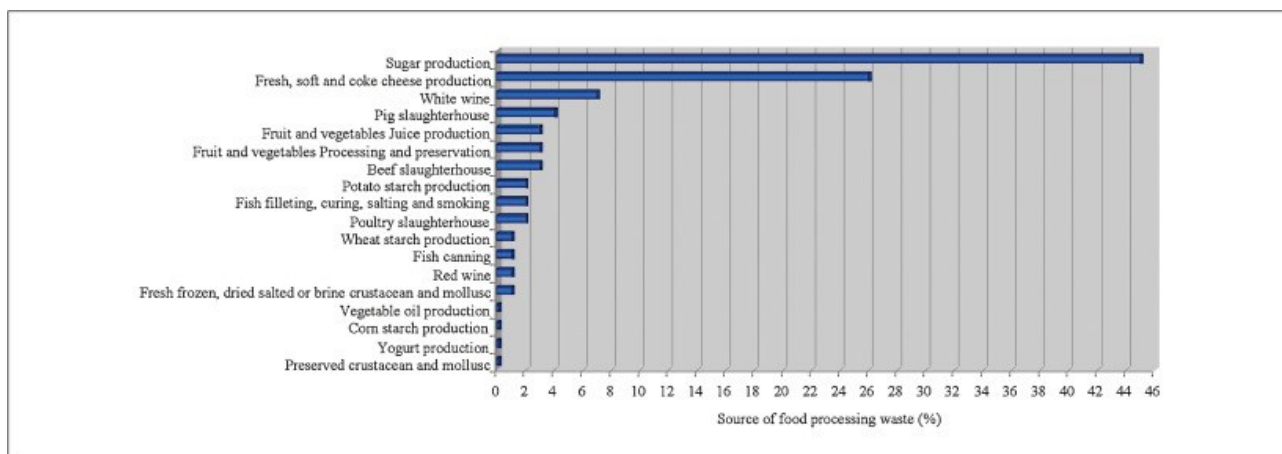


Figura 3: Tipologie e quantità di sottoprodotti e rifiuti organici in Europa

Fonte: Fava et al., 2015

1.1 Direttive europee: rifiuto, sottoprodotto, *end of waste*

I recenti piani d'azione europei come “*un nuovo piano d'azione per l'economia circolare*” e “*un quadro strategico per una bioeconomia dell'UE competitiva e sostenibile*” poggiano su tematiche cardine introdotte dalla Direttiva 2008/98/CE e successiva modifica 2018/851, definita WFD “Waste Framework Directive”. La Direttiva Quadro sui Rifiuti stabilisce un quadro giuridico per il trattamento dei rifiuti con lo scopo di ridurre l'impatto ambientale e salvaguardare la salute umana. Perseguendo gli ideali di circolarità introduce obiettivi di recupero e di riciclaggio, il concetto di Responsabilità Estesa del Produttore (EPR) e afferma il principio di “chi inquina paga”. In tale normativa viene descritta la gerarchia della gestione dei rifiuti dove la fase di prevenzione gioca un ruolo fondamentale nel processo di realizzazione di un prodotto in quanto, in un'ottica di *eco-design*, il suddetto deve poter essere riutilizzabile e generare il minor impatto possibile lungo la filiera produttiva. Non di meno dovrebbe essere riciclabile o recuperabile mediante altri processi. Fine ultimo lo smaltimento, in cui dovrebbero rientrare il minor numero possibile di risorse (Fig. 4) (DEFRA, 2011).

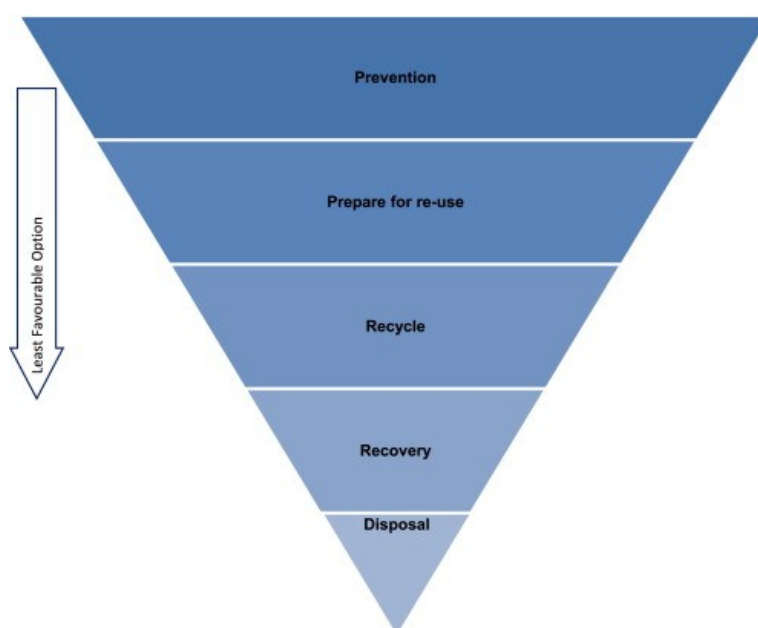


Figura 4: Gerarchia dei rifiuti

Fonte: Papargyropoulou et al., 2014

In merito a ciò, la Direttiva invita gli stati membri dell'UE ad adottare misure che riguardano la prevenzione della produzione di rifiuti, migliorandone la gestione in modo che tali sostanze od oggetti possano essere considerati una risorsa. Nella recente modifica viene posto l'accento sul ruolo chiave di adottare le misure ottimali al riconoscimento dei sottoprodotti, per promuoverne un utilizzo sostenibile e un'opportuna applicazione industriale (DIRETTIVA (UE) 2018/851).

La WFD viene recepita a livello nazionale nel Testo Unico Ambientale (d.lgs.152/06), con apposite modifiche alla parte quarta, titolo primo “gestione rifiuti”, dove vengono riportate le definizioni di rifiuto (Art.183), sottoprodotto (Art.184-bis) ed *end of waste* (Art. 184-ter).

Viene definito genericamente “rifiuto” qualsiasi oggetto o sostanza di cui il detentore abbia l’intenzione o obbligo di disfarsi a differenza di ciò che diventa *end of waste*, ovvero qualsiasi rifiuto che cessa di essere tale se sottoposto ad opportune operazioni di recupero.

Un sottoprodotto, invece, è un qualsiasi oggetto o sostanza che non è un rifiuto in quanto soddisfa determinate condizioni:

- è parte integrante di un processo produttivo il cui scopo non è la produzione di tale sostanza od oggetto;
- è certo il suo utilizzo in altri processi produttivi;
- lo si può utilizzare direttamente senza che debba subire alcun trattamento diverso dalla normale pratica industriale;
- è legale l’utilizzo se non impatta negativamente sulla salute umana e sull’ambiente;

1.2 Valorizzazione dei sottoprodotti del settore agroindustriale: da scarto a risorsa

1.2.1 Industria vitivinicola

L'industria vitivinicola rappresenta un tassello fondamentale del settore produttivo del Mediterraneo. A livello mondiale nel 2020 è stata stimata una produzione di vino pari a 260 milioni di ettolitri e l'Italia si colloca al sesto posto tra le nazioni esportatrici, con circa 47.5 milioni di ettolitri l'anno (Caminiti et al., 2025). L'intera filiera di produzione del vino è caratterizzata da diverse fasi che includono diraspatura, pigiatura, fermentazione, chiarificazione, invecchiamento, imbottigliamento e confezionamento, per concludersi con trasporto e distribuzione del prodotto finito ai mercati di vendita (Fig. 5) (Creo et al., 2018).

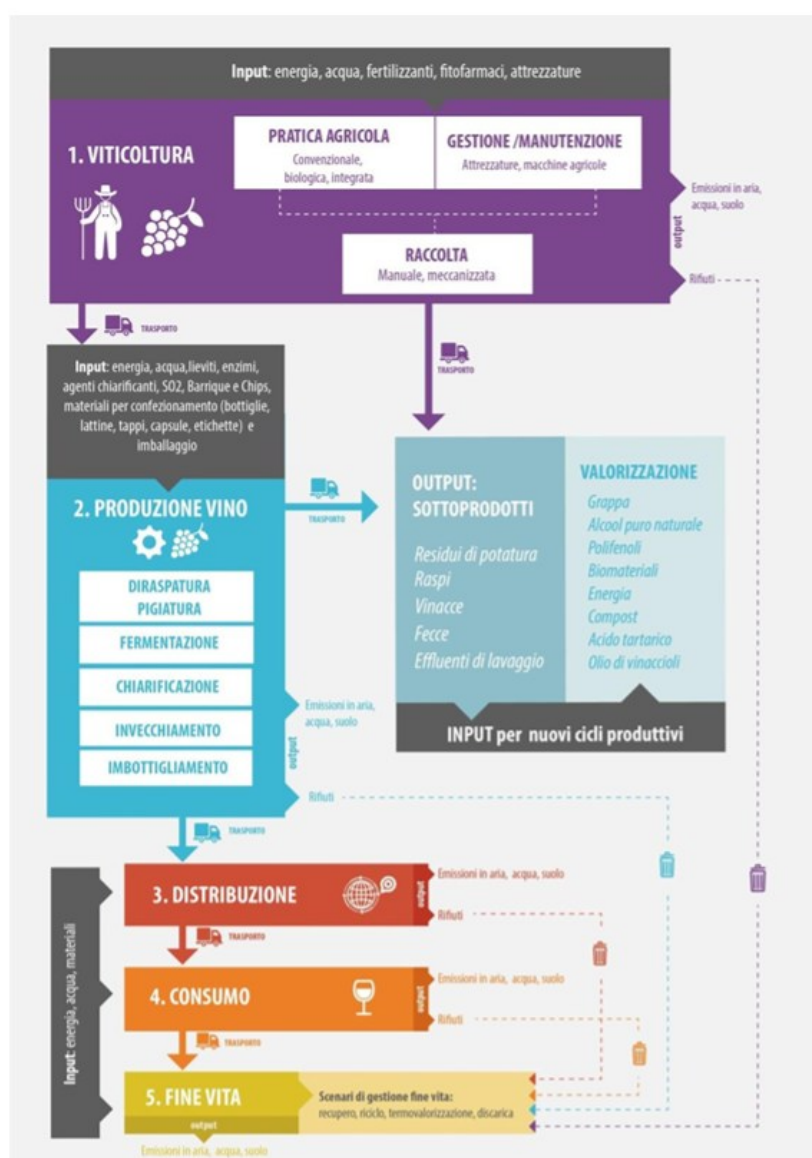


Figura 5: Descrizione filiera vitivinicola

Fonte: Creo et al., 2018

L'impatto ambientale di questo settore include la fase di coltivazione dell'uva, che è responsabile di circa il 2% delle emissioni annuali di gas ad effetto serra (GHGs), la produzione di residui di potatura della fase agricola (circa 5 t/ha) e vari tipi di scarti derivati dalla lavorazione del substrato ([Agraso-Otero et al., 2025](#)) ([Caminiti et al., 2025](#)).

Mediamente vengono prodotti 196 litri di acque reflue, 0.1 kg di fanghi e 1.6 kg di fecce di vino per ogni ettolitro di vino prodotto. Raspi, fecce e vinacce rappresentano circa il 30% in peso sul totale di uva raccolta ([Agraso-Otero et al., 2025](#)) che, prima dell'entrata in vigore della normativa attuale il D.M. 7407/2010, in quanto sostanze contenenti ancora un certo grado alcolico, venivano obbligatoriamente inviate alle distillerie. ([Capitani, 2017](#)). Ad oggi, in un'ottica di circolarità, la normativa identifica le fecce e le vinacce come sottoprodotti da poter destinare, sotto controllo, anche ad utilizzi alternativi come nel settore farmaceutico, cosmetico, energetico e agronomico diretto o indiretto per la produzione di fertilizzanti ([Capitani, 2017](#)).

La necessità di riconversione dei sottoprodotti dell'industria vinicola deriva dal fatto che, essendo caratterizzati da un'elevata domanda chimica e biochimica di ossigeno (COD e BOD), sono considerati degli inquinanti ambientali se rilasciati senza trattamenti ([Kucek et al., 2016](#)) ([Chetrariu et al., 2025](#)).

In particolar modo le fecce sono definite dal regolamento europeo CEE n. 337/979 come “il sedimento formatosi alla base del deposito o della botte contenente vino dopo la fermentazione, durante la conservazione o dopo aver effettuato trattamenti autorizzati al prodotto, nonché i residui ottenuti dalla filtrazione o centrifugazione di detto prodotto” ([Chetrariu et al., 2025](#)).

La composizione delle fecce può variare a seconda del tipo di uva e può essere caratteristica delle condizioni del processo di produzione del vino. Le accomuna il fatto di essere delle biomasse eterogenee ad elevato contenuto di carbonio organico, aventi un pH acido e composte principalmente da lieviti, ricche in fenoli, potassio ed etanolo ([Da Ros et al., 2017](#)).

Per gli stessi motivi che ne fanno delle fecce un inquinante ambientale, risultano degli ottimi substrati per le bioraffinerie in processi come digestioni anaerobiche e fermentazioni, attività di bioconversione dei materiali organici di scarto in biogas, bioidrogeno e composti ad alto valore aggiunto come i VFA (Volatile Fatty Acids) ([Millati et al., 2023](#)) ([Da Ros et al., 2017](#)) ([Miele et al., 2007](#)).

1.2.2 Industria brassicola

L'industria della birra nel 2024 è arrivata ad immettere nel commercio mondiale circa 1.88 miliardi di ettolitri di questa bevanda che, in quanto a consumo, risulta terza solo dopo acqua e caffè e acquisendo il primato tra quelle alcoliche (Statista) (Paula et al., 2023).

Il processo di produzione di questa bevanda consta di diversi passaggi che iniziano dalla lavorazione del malto con la fase di macinazione, a seguire l'ammontamento, filtrazione, bollitura e per finire la fermentazione che converte gli zuccheri in birra (Fig. 6) (Hejna, 2021).

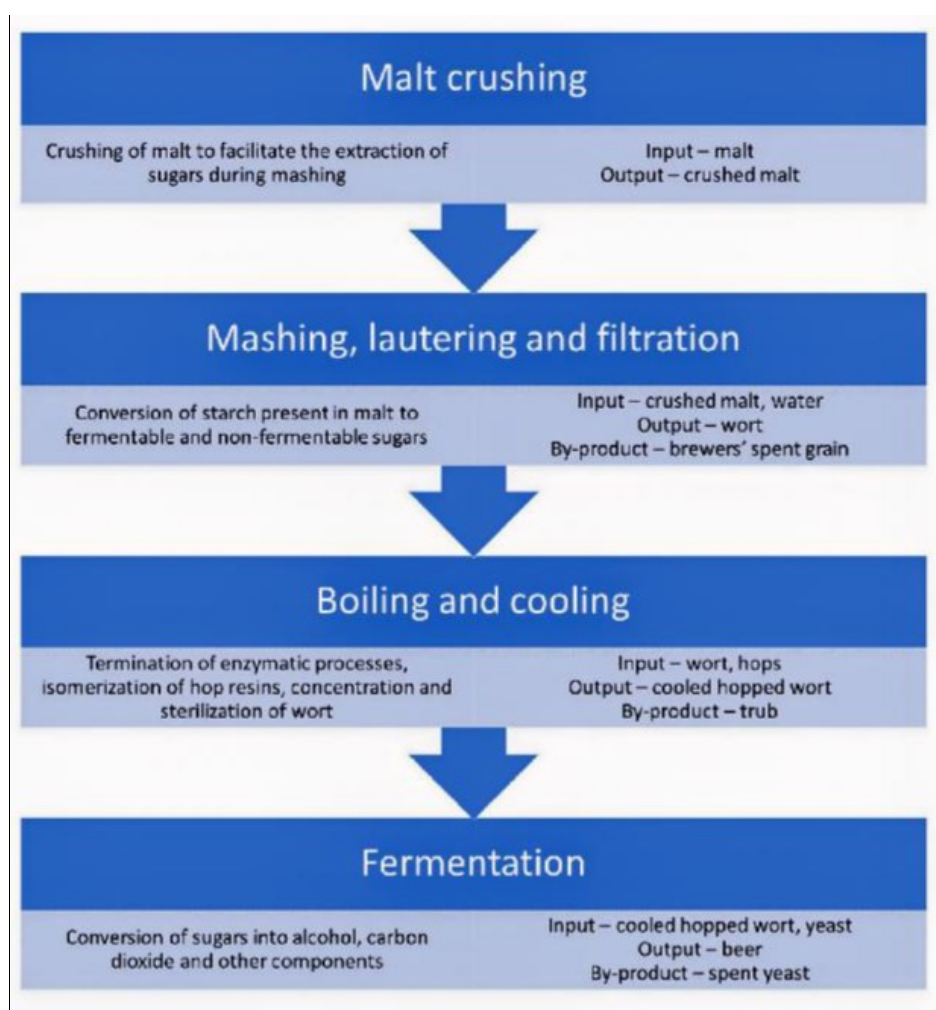


Figura 6: Schema generale delle fasi di produzione della birra e relativi sottoprodotti

Fonte: Hejna, 2022

Ciò che lega questo settore industriale alla necessità di applicazione nell'ambito dell'economia circolare è l'elevata produzione di scarti, tra cui vi ritroviamo luppolo esausto, germogli di malto, lieviti e prime fra tutte per abbondanza le trebbie di malto (Brewers' Spent Grain) (Hejna, 2021) (Mussatto et al., 2006).

Solo nel contesto europeo, l'intera produzione di residui dell'industria brassicola ammonta a circa 4 tonnellate l'anno (Almendinger et al., 2020) di cui l'85% è composto dalle trebbie (Steiner et al., 2015), per un totale di quasi 3.4 milioni di tonnellate l'anno che equivalgono a 20kg di sottoprodotto per ogni 100 litri di birra (Lynch et al., 2016) (Lao et al., 2020).

Le BSG (Brewers' Spent Grain) sono una sostanza lignocellulosica eterogenea composta principalmente da strati di pula, pericarpo e tegumento del seme che ricopre il chicco d'orzo originale (Steiner et al., 2015). Costituiscono il residuo insolubile che deriva dal processo di filtrazione del mosto e sono caratterizzate prevalentemente da fibre (cellulosa ed emicellulosa 30% - 50% p/p), proteine (19% - 30% p/p), che rappresentano circa il 20% e 70% dell'intera composizione, e lignina (Fig. 7) (Mussatto et al., 2006) (Lynch et al., 2016).

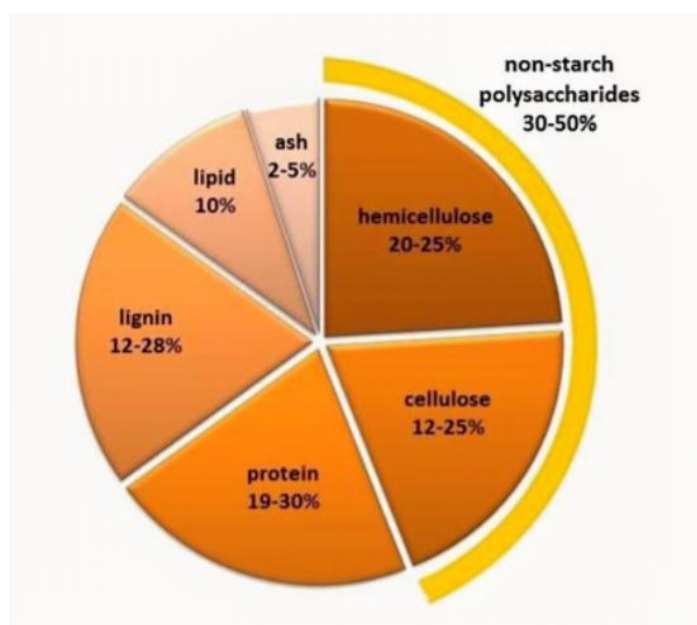


Figura 7: Tipica composizione delle Brewers' Spent Grain

Fonte: Lynch et al., 2016

L'ingente quantità di BSG prodotta annualmente dall'industria brassicola rende questo sottoprodotto una biomassa a basso valore economico; tuttavia, le sue caratteristiche nutrizionali ne favoriscono l'impiego nella produzione di mangimi per animali, che rappresenta attualmente la destinazione più diffusa. (Hejna, 2021) (Steiner et al., 2015).

L'elevata disponibilità, il basso valore economico e le difficoltà di stoccaggio rendono le trebbie un potenziale problema ambientale, soprattutto qualora non vengano destinate all'alimentazione animale e siano invece avviate a incenerimento. Nell'odierno contesto politico e socioeconomico la comunità scientifica è impegnata nella ricerca di utilizzi alternativi di tali biomasse, con lo scopo di valorizzarne le caratteristiche qualitative mediante processi biotecnologici ecocompatibili e sostenibili (Puligundla

et al., 2021). Le possibili applicazioni, oggetto di studio della comunità scientifica, spaziano dalla nutrizione umana (estrazione di composti fenolici e proteine), alla produzione di energia mediante combustione ed estrazione di cellulosa e lignina (applicazioni polimeriche e industria cartaria) (Hejna, 2021) (Paula et al., 2023).

L'ostacolo all'applicazione su vasta scala di questa biomassa è la struttura lignocellulosica di cui sono composte. La lignina è un polimero polifenolico complesso, di cui le trebbie ne sono composte del 30%, che conferisce struttura e rigidità alla parete cellulare vegetale e rende difficoltosa l'applicazione biotecnologica delle BSG (Lynch et al., 2016) (Paula et al., 2023).

Affinché il materiale lignocellulosico possa essere utilizzato come substrato sostenibile in un contesto biotecnologico, in quanto recalcitrante, deve subire dei processi di pretrattamento allo scopo di rendere le strutture molecolari più accessibili all'attività enzimatica (Jönsson et al., 2016). Tra questi vi ritroviamo trattamenti termici, chimici (ambiente alcalino, acido o processi ossidativi), chimico-fisico combinati e biologici (Montgomery et al., 2014).

In tal contesto, anche un sottoprodotto dell'industria agroalimentare come le BSG può essere utilizzato come substrato promettente, in processi di digestione o fermentazione anaerobica, per produrre biogas o sostanze ad alto valore (tra cui acidi grassi volatili) da applicare nel settore alimentare, farmaceutico e dei materiali (Fig. 8) (Archilla et al., 2021) (Màrquez et al., 2021).

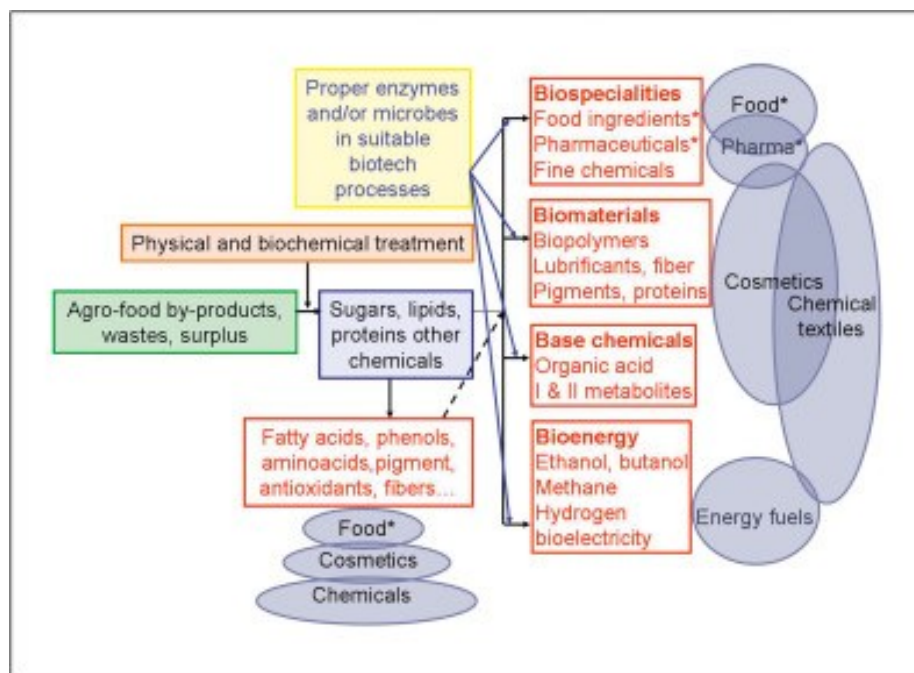


Figura 8: Caratteristiche principali di una bioraffineria di rifiuti organici basata su processi biologici

Fonte: Fava et al., 2015

1.3 Processi di conversione biochimica

1.3.1 Panoramica sulla Digestione Anaerobica

Come già riportato nel precedente paragrafo, i sottoprodotti come le fecce di vino e le trebbie sono fonti preziose di cellulosa, proteine e lipidi che possono essere valorizzati in processi fermentativi per la produzione di sostanze biochimiche ad alto valore aggiunto.

La fermentazione acidogenica è un processo biochimico anaerobico, fortemente coinvolto nel ciclo naturale del carbonio organico, che sfrutta la capacità di colture microbiche pure o miste di degradare le macromolecole complesse presenti negli scarti agricoli e riconvertirle in preziose sostanze a più basso peso molecolare, gli acidi grassi volatili (**Fig.9**) (Sarkar et al., 2026).

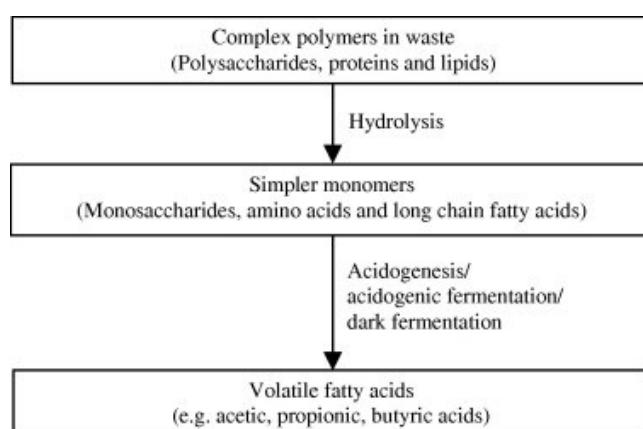


Figura 9: Schema di fermentazione anaerobica e produzione di VFA da matrice organica

Fonte: Lee et al., 2014

Essa rappresenta una parte del più complesso processo di digestione anaerobica che, nella sua interezza, porta a compimento il ciclo del carbonio convertendo gli scarti organici in biogas (metano 60% - 70%) e digestato, una biomassa ricca di nutrienti che può essere riutilizzato come fertilizzante (Zamel et al., 2026).

Nella digestione, la degradazione del materiale organico avviene mediante attività sinergiche di un consorzio di microrganismi che operano in condizione di anaerobiosi. È un processo a più fasi interconnesse, ognuna delle quali vede protagonisti ceppi batterici diversi, scandite da quattro processi chiave: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi, e metanogenesi (metanigena o idrogenotrofa) (**Fig.10**) (Varghese et al., 2022) (Li et al., 2011).

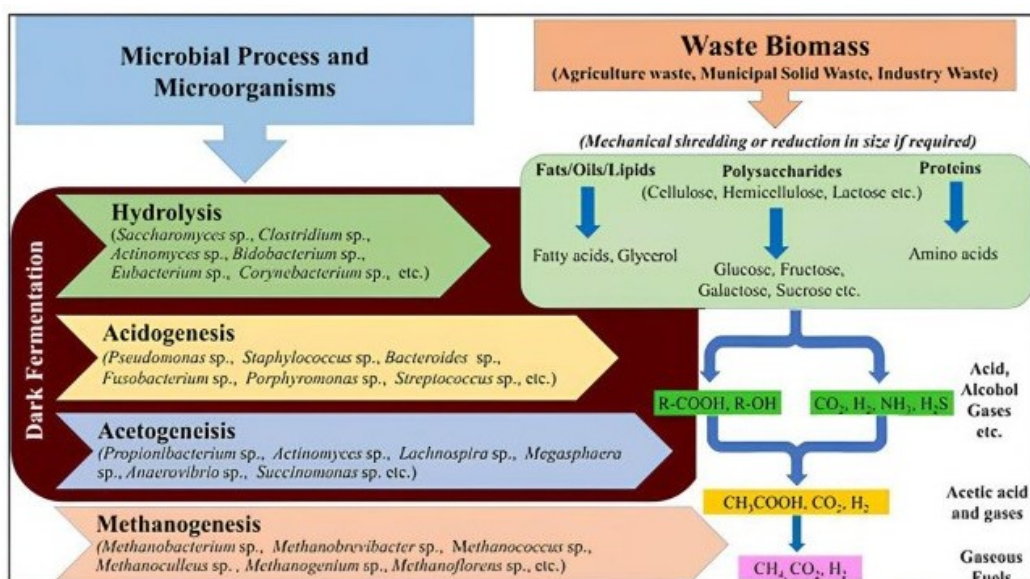


Figura 10: Schema riassuntivo digestione anaerobica

Fonte: Zamel et al., 2026

L'idrolisi rappresenta la prima fase del processo in cui i batteri, secernendo enzimi idrolitici, degradano i polimeri organici insolubili in monomeri e oligomeri solubili rendendoli disponibili per le successive comunità microbiche. Per questo motivo viene considerata il collo di bottiglia dell'intero processo e, nel caso di materiali lignocellulosici recalcitranti, possono essere necessari dei pretrattamenti (chimici, fisici o biologici) per migliorare la biodegradabilità della biomassa e massimizzare l'efficienza idrolitica di polimeri come lipidi, proteine e carboidrati. Le condizioni operative per garantire la resa del processo sono a pH 5 - 7 e una temperatura di 30 - 50 °C. I prodotti di questa fase quali amminoacidi, acidi grassi a catena lunga e zuccheri sono i substrati per la comunità di batteri fermentanti, in cui gli acetogenici svolgono parallelamente diverse vie metaboliche convertendo i monomeri in varie sostanze, tra cui principalmente acidi grassi volatili ma anche idrogeno, alcoli e anidride carbonica (Fig. 11) (Bhatia et al., 2017) (Sarkar et al., 2026).

Si tratta di una fase caratterizzata da cinetiche relativamente rapide, poiché i batteri fermentativi presentano tempi di generazione dell'ordine di circa 36h (Meegoda et al., 2018) e il pH dovrebbe mantenersi su valori neutri o di moderata alcalinità per sviluppare un eterogeneo range di VFA, anche se studi in letteratura dimostrano che tale tendenza varia in base al substrato (Lee et al., 2014). Inoltre, è stato dimostrato che pH inferiori a 3 e superiori a 11 inibiscono fortemente il processo fermentativo, attestando un pH 7 come valore ideale per massimizzare la biodisponibilità dei substrati nei processi idrolitici e acidogenici (Jin et al., 2026).

La successiva fermentazione acetogenica è una fase critica del processo di digestione in quanto la conversione dei prodotti dell'acidogenesi in acetato ed idrogeno sono substrati diretti per i batteri

metanigeni. È un processo termodinamicamente sfavorevole in condizioni standard, un classico esempio di simbiosi tra comunità microbiche, ovvero una condizione di alimentazione incrociata obbligata, che si compie solo se i metanigeni consumano velocemente l'idrogeno e l'acetato prodotto. La fase finale è la produzione di metano che può avvenire mediante due processi:

- Metanogenesi idrogenotrofa, in cui l'idrogeno reagisce con l'anidride carbonica fungendo da accettore di elettroni per la produzione di metano
- Metanogenesi acetoclastica, in cui l'acetato viene scisso tra la componente metilica, che viene ridotta a metano ed in gruppo carbossilico che viene convertito in anidride carbonica

(Zamel et al., 2026).

1.3.2 Fermentazione acidogenica e applicazioni degli acidi grassi volatili

La valorizzazione microbica di residui agroindustriali, mediante processi fermentativi anaerobici, svolge un ruolo fondamentale nel supportare principi di circolarità con il duplice obiettivo di ottenere un recupero sostenibile della sostanza organica e promuovere la produzione “*bio - based*” di molecole. I VFA sono acidi carbossilici a catena corta generalmente con meno di sei atomi di carbonio, anche noti con il termine *Short Chain Fatty Acids* (SCFA), tra cui vi ritroviamo: acido acetico, acido propionico, acido isobutirrico, acido butirrico, acido valerico, acido isovalerico. Nella fermentazione possono essere prodotti anche acidi carbossilici a catena media come acido esanoico (caproico), eptanoico (enantico) ed ottanoico (caprilico), definiti anche *Medium Chain Fatty Acids* (MCFA). Tali molecole vengono prodotte mediante processo di β -ossidazione inversa (RBO), noto anche con il termine di *chain elongation* (**Fig. 11**) (Sarkar et al., 2026) (Bhatia et al., 2017).

La β -ossidazione inversa (*reverse β - oxidation*) è un percorso metabolico ciclico, che avviene in condizioni di anaerobiosi, in cui si verifica l'allungamento delle catene carboniose di acidi grassi a catena corta, i quali vengono convertiti in acidi grassi a catena media grazie alla partecipazione di molecole donatrici di elettroni come etanolo e lattato. Il processo avviene mediante aggiunta di una molecola di acetil - CoA ad un carbossilato, che funge da accettore di elettroni, allungandone la catena di due atomi di carbonio alla volta (Spirito et al., 2014). Pertanto, la *reverse β - oxidation* (RBO) può avvenire su acidi grassi a numero pari di atomi di carbonio partendo dall'acido acetico (C2) e proseguendo con la produzione di acido butirrico (C4), acido caproico (C6) e acido caprilico (C8) (Han et al., 2018). Oppure, in casi in cui l'acido propionico (C3) sia presente nell'ambiente di reazione in quantità stechiometricamente elevate, può sostituirsi all'acido acetico come accettore di elettroni avviando un processo di elongazione, definito *Odd Chain Elongation*, con il susseguirsi di acidi grassi

a numero dispari di atomi di carbonio come l'acido valerico (C5) e l'acido enantico (C7) (Candry et al., 2020).

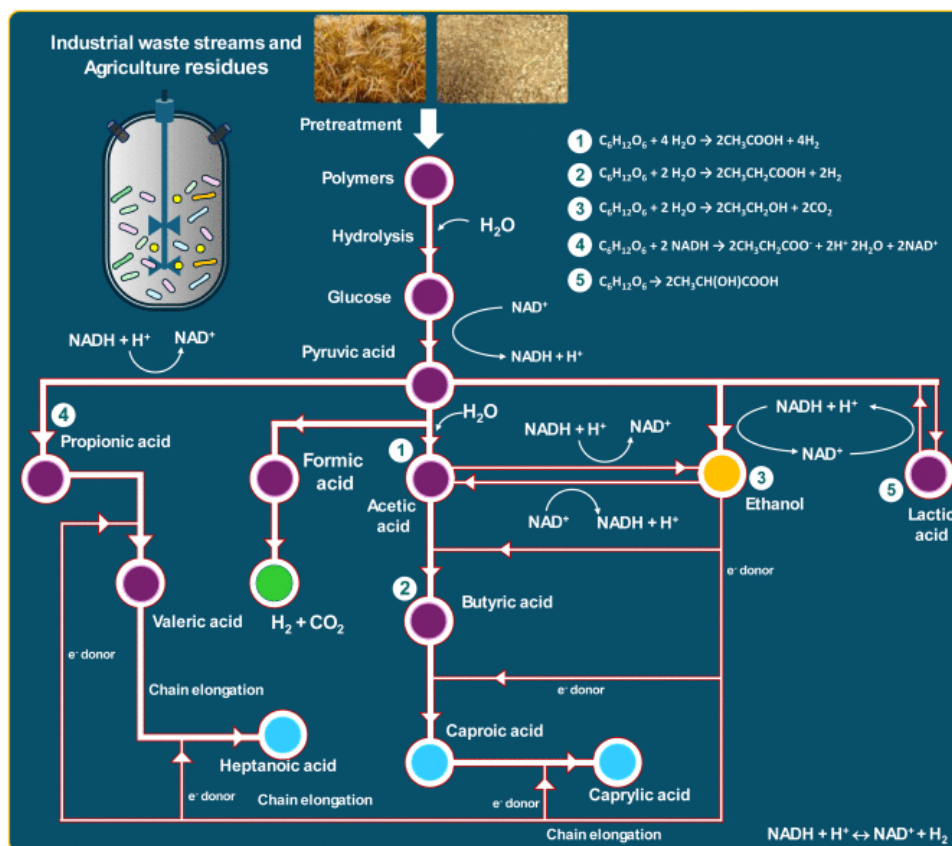


Figura 11: Percorsi di produzione di metaboliti acidogenici

Fonte: Sarkar et al., 2026

L'attenzione sulla produzione biologica di queste molecole deriva dal fatto che sono sostanze chimiche di base, prevalentemente prodotte mediante processi petrolchimici, utilizzate massivamente in diversi settori industriali, tra cui quello chimico, farmaceutico, alimentare, agricolo, trattamento acque (Qin et al., 2025) (Pandey et al., 2022) (Qin et al., 2024).

Sono importanti in quanto molecole piattaforma che trovano larga applicazione, sia singolarmente che in miscele, nella produzione di plastiche o polimeri, trasformati chimicamente in esteri, biologicamente convertiti in acidi carbossilici a catena media, utilizzati come fertilizzanti o implicati nella produzione di biopolimeri come polilattide, polisaccaridi, poliesteri alifatici e poliidrossialcanoati (PHA). Possono essere utilizzati come precursori per la produzione di biogas o bioenergia e come substrato per la rimozione biologica di fosforo e azoto negli impianti di depurazione di acque reflue (**Fig. 12**) (Varghese et al., 2022) (Suarez et al., 2021) (Anjum et al., 2019).

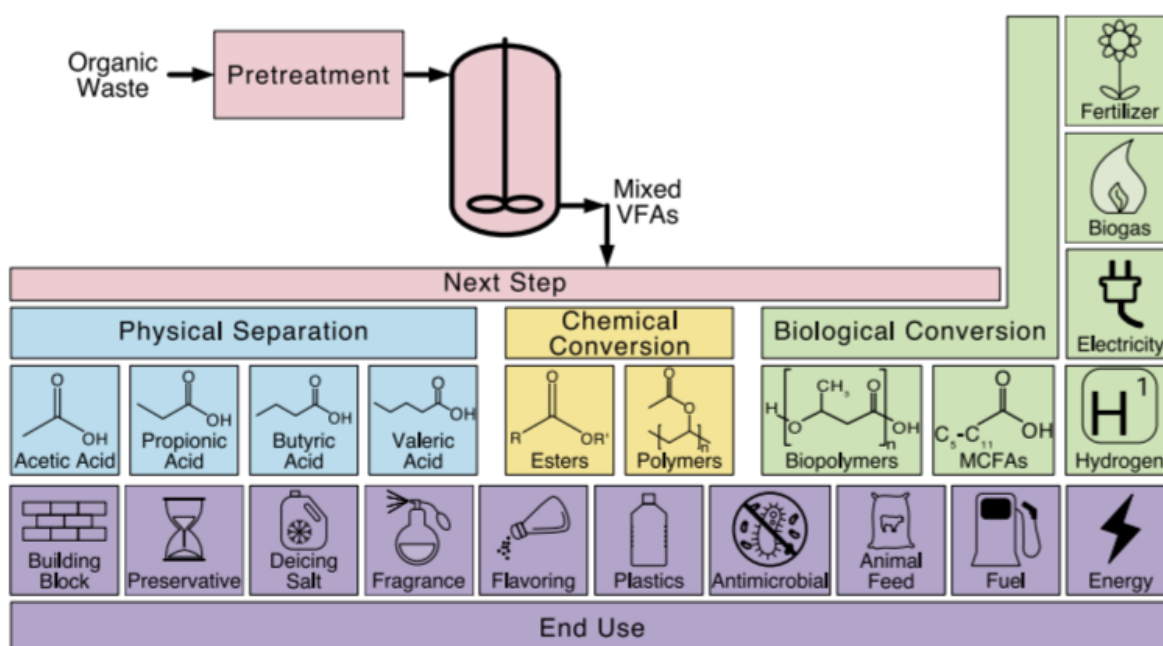


Figura 12: Esempi di utilizzi potenziali e opzioni di processo di VFA

Fonte: Suarez et al., 2021

Tuttavia, i metodi di produzione biologica degli acidi grassi volatili non possono ancora competere con i processi classici in quanto le problematiche principali sono i costi, più bassi per il fossile, e l'efficienza, che resta ancora un punto forte dell'industria petrolchimica. Inoltre, i processi fermentativi permettono di ottenere miscele di acidi grassi che poi devono subire operazioni di estrazione e purificazione, mentre le tecniche petrolchimiche sono altamente selettive per la tipologia di molecola d'interesse (Atasoy et al., 2018) (Suarez et al., 2021).

Nonostante i limiti citati, soluzioni miste di VFA, trovano interessante applicazione come precursori per la sintesi innovativa di biopolimeri quali i poliidrossialcanoati (PHA). Sono poliesteri termoplastici naturali, completamente biodegradabili, sintetizzati da più di 90 specie diverse di batteri (Gram-positivi che Gram-negativi), formati da acidi 3-, 4-, 5-, 6- idrossialcanoici (HA). I poliidrossialcanoati rappresentano una fonte di carbonio ed energia immagazzinata dai batteri sottoforma di granuli intracellulari (Strazzer et al., 2018). Vengono accumulati quando i microrganismi si ritrovano in presenza di elevate quantità di carbonio disponibile ma in condizioni sfavorevoli per la loro crescita, rappresentate da un contenuto di nutrienti essenziali quali ossigeno, azoto, fosforo, limitanti o in risposta a variazioni di pH. Nel momento in cui le condizioni ambientali tornano ottimali i PHA vengono biodegradati, recuperando l'energia e il carbonio impiegato successivamente per la crescita cellulare (Anjum et al., 2016).

La struttura generale dei poliidrossialcanoati è mostrata in **Fig. 13**.

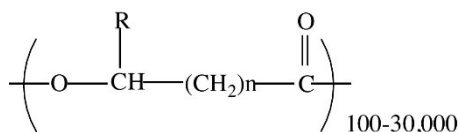


Figura 13: Formula generale PHA

Fonte: Anjum et al., 2016

Vengono classificati in base al numero di atomi di carbonio di cui è costituita l'unità monomerica in:

- *Short Chain Length* (SCL) se il numero di atomi è inferiore a sei
- *Medium Chain Length* (MCL) se composto tra sei e quattordici atomi di carbonio
- *Long Chain Length* (LCL) se costituiti da monomeri aventi più di quattordici atomi di carbonio

I batteri sintetizzano prevalentemente poliidrossialcanoati a catena corta come il poli (3-idrossibutirato) P(3HB), il poli (4 idrosibutirrato) P(4HB) e il poli (3-idrossivalerato) P(3HV) ma anche copolimeri come il P(3HB-*co*-3HV). Inoltre, producono anche polimeri a catena media che includono omopolimeri tra cui il poli (3-idrossiesanoato) P(3HHx), poli (3-idrossiottanoato) P(3HO) e i copolimeri come P(3HHx- *co* -3HO). Ad oggi sono state segnalate oltre 150 diversi costituenti monomerici di PHA a diversa struttura tra ramificata, lineare, satura, insatura e aromatica sintetizzati da numerose specie batteriche diverse poste in differenti condizioni di crescita (Anjum et al., 2016) (Boscolo Bomba, 2024).

Nel complesso esistono tre diverse vie metaboliche che vengono utilizzate per sintetizzare i poliidrossialcanoati, tra cui:

- Via I: l'utilizzo dell'acetil - coenzima A (CoA) come precursore
- Via II: la β -ossidazione degli acidi grassi volatili
- Via III: la sintesi *de novo* degli acidi grassi

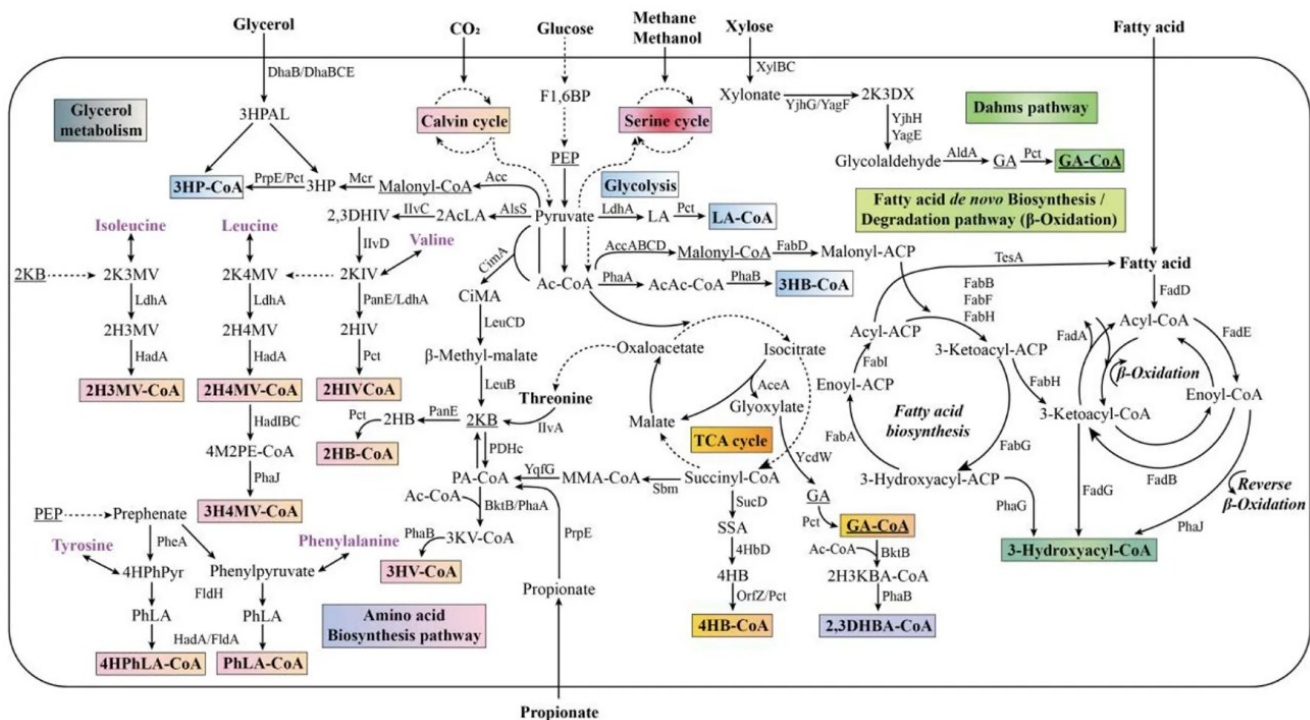


Figura 14: Principali vie metaboliche di generazione di PHA

Fonte: Tao et al., 2025

Come dimostrato in **Fig. 14** per la produzione dei PHA possono essere utilizzate diverse fonti di carbonio ma gli acidi grassi volatili vengono preferiti dai batteri in quanto ne sono i precursori metabolici diretti (**Fig. 15**) (Boscolo Bomba, 2024) (Szacherska et al., 2021). Tuttavia, la composizione dei poliidrossialcanoati in termini di tipologia di monomero e peso molecolare, che determinano caratteristiche e proprietà del polimero, variano in base al tipo di substrato utilizzato nel processo fermentativo in quanto influisce direttamente, sia qualitativamente che quantitativamente, sulla produzione degli acidi grassi volatili. Diversi studi riportano che modulando i rapporti tra i VFA si può garantire la sintesi di specifici PHA con caratteristiche e funzionalità diverse (Tao et al., 2025).

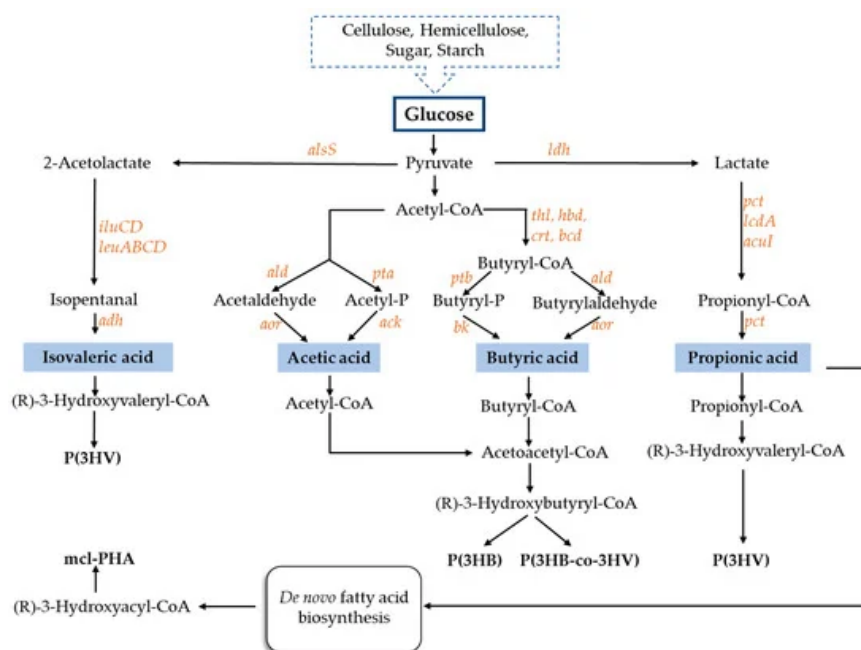


Figura 15: Schema vie metaboliche per la produzione di acidi grassi volatili e sintesi di poliidrossialcanoati

Fonte: Szacherska et al., 2021

Dalla **Fig. 15** è possibile notare come acidi grassi con numero pari di atomi di carbonio (acetato e butirrato) vengano convertiti principalmente in idrossibutirrato (HB) mentre l'acido propionico e l'acido valerico siano convertiti in idrossivalerato (HV). È noto che un substrato arricchito in acido acetico permette una crescita efficace di batteri coinvolti nella produzione di PHA poiché l'acetato è la molecola che prevalentemente viene utilizzata per la crescita cellulare, con conseguente incremento della capacità di accumulo e resa dei poliidrossialcanoati. Inoltre, è fondamentale il rapporto tra acidi grassi volatili a numero pari e dispari di atomi di carbonio perché acetato e butirrato sono consumati per primi dal metabolismo microbico, mentre acido propionico e valerico vengono utilizzati secondariamente. Tutto ciò accade in quanto l'acetil - CoA è una molecola chiave nelle diverse vie metaboliche che portano alla produzione dei PHA e questo causa un consumo elevato di acetato che ne è il principale precursore (Tao et al., 2025). Un esempio di come la manipolazione del profilo di VFA possa produrre polimeri a diversa composizione è stato dimostrato nel lavoro di Lemos et al., (2006). In questo studio, è stato evidenziato che colture microbiche miste alimentate singolarmente con acetato e propionato hanno portato a rese, in termini di accumulo di PHA, diverse. L'acetato, essendo diretto precursore dell'acetil - CoA, è stato direttamente convertito in HB, portando alla formazione di omopolimeri, mentre il propionato ha portato alla formazione di un copolimero prevalentemente composto da unità di HV (71.9% di HV e 28.1% di HB, su base molare). Il propionato è il precursore diretto del propionil - CoA che necessita della sintesi di una molecola di acetil - CoA per essere convertito in HV. Tale substrato può produrre l'acetil - CoA mediante diverse vie metaboliche anche se, sebbene abbiano come fine la produzione di HV, non è da escludere la

possibilità che due molecole di acetyl - CoA possano condensare in idrossibutir - CoA portando probabilmente alla formazione dell'idrossibutirrato (**Fig. 16**).

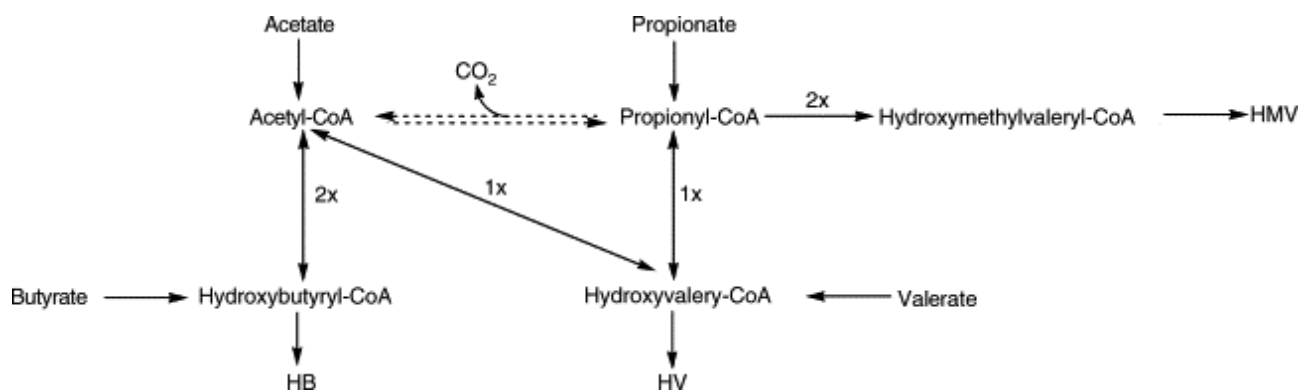


Figura 16: Rappresentazione schematica della produzione polimeri da acetato, propionato, butirrato e valerato (1x, 2x, - una o due unità)

Fonte: Lemos et al., 2006

Invece, la miscela composta dai due substrati (acetato e propionato) ha portato a maggior produzione di HV rispetto alla condizione di singola alimentazione con propionato ed una riduzione in termini di quantità di HB prodotta rispetto al test su acetato. Questo risultato ha dimostrato che le unità di acetyl-CoA, sintetizzate direttamente dall'acetato, hanno supportato la produzione di HV aumentandone la resa. Risultato simile è stato ottenuto testando butirrato e valerato come substrato di alimentazione, denotando un accumulo di idrossibutirrato 3.5 volte superiore rispetto a quello ottenuto dal valerato e propionato, ma comunque 6.6 volte inferiore rispetto all'acetato. Anche in questo caso la differenza in termini di resa di idrossibutirrato viene giustificata dal processo di decarbossilazione che sia il valerato che il propionato devono subire con conseguente perdita di atomi di carbonio. Tutto ciò ha portato i ricercatori alla conclusione che la resa polimerica sia più elevata se nella miscela sono presenti acetato e butirrato con conseguente aumento della produzione di omopolimeri di HB, mentre valerato e propionato sono responsabili di rese di produzioni inferiori ma permettono di arricchire i polimeri in idrossivalerato (HV).

I PHA sono considerati una biorisorsa rinnovabile in quanto plastiche ecocompatibili e biodegradabili che grazie alle proprietà termiche, meccaniche, e strutturali sono visti come i più validi sostituti di quelle tradizionali, ricoprendo posizione di grande interesse per l'industria chimica e delle bioplastiche (Werker et al., 2022).

Oltre allo scopo di ridurre la dipendenza dai combustibili fossili per la produzione delle plastiche ad utilizzo commerciale, la comunità scientifica ne sta studiando ulteriori applicazioni, tra cui i più innovativi sono nell'ambito medico. Essendo molecole non tossiche e completamente biocompatibili possono essere utilizzate come materiale per strumentazione medica o trovare applicazione come

materiale nella bioingegneria tissutale. Inoltre, essendo molecole idrofobiche numerosi studi ne stanno valutando l'applicazione per la somministrazione di farmaci e come strumento di diagnosi precoce per il cancro (Zhou et al., 2023) in quanto il poli- β -drossibutirrato (PHB), opportunamente modificato, riesce a legare con proteine bersaglio di cellule tumorali (Sabarinathan et al., 2019).

Ulteriore applicazione, frutto dell'elevata biodegradabilità e biocompatibilità dei PHA, è nell'ambito agricolo. Nello specifico il P(3HB-HV) è stato utilizzato per produrre dei pellet in grado di contenere insetticidi che vengono rilasciati nelle colture durante la semina. La degradazione del polimero avverrebbe in modo controllato in relazione alle condizioni ambientali che influenzano sia l'attività dei microrganismi che la contemporanea proliferazione di parassiti, permettendo un rilascio adeguato al grado di attività biologica. Inoltre, in quanto sostituti delle plastiche, i PHA possono trovare larga applicazione come materiali per strumentazione agricola (pellicole per serre, sacchi per piante, reti protettive) evitando di utilizzare polimeri che possono essere degradati dagli agenti atmosferici e rilasciare sostanze tossiche nell'ambiente (Bano et al., 2024).

In realtà, la commercializzazione su vasta scala dei PHA resta ancora limitata dai costi di estrazione e di produzione che sono circa 5 - 10 volte superiori ai processi petrolchimici. Tra questi vi rientrano l'usuale utilizzo di colture pure, che necessitano di rigide condizioni di sterilità, e di substrati raffinati che rappresentano circa il 50% del costo totale di produzione. L'utilizzo di colture microbiche miste risulta essere economicamente più competitivo ed efficace in quanto non necessitano di particolari condizioni operative. Inoltre, utilizzare un consorzio di microrganismi, permette di sfruttare le capacità cooperative di ceppi batterici diversi aumentando la rete metabolica dell'intero processo (Szacherska et al., 2021). A tal proposito, l'utilizzo finora discusso di acidi grassi volatili derivanti da fermentazioni a coltura mista di biomasse di scarto, risultano una fonte alternativa ed economica di carbonio rinnovabile che permetterebbe una produzione biologica a basso costo e sostenibile di poliidrossialcanoati (Shinde et al., 2025) (Agnihotri et al., 2022) (Strazzera et al., 2018).

1.3.3 Principali tecniche di pretrattamento

Come già riportato, essendo l'idrolisi una fase limitante dei processi di bioconversione del materiale organico, è necessario pretrattare substrati lignocellulosici al fine di renderli più facilmente disponibili all'attività microbica (**Fig. 12**); infatti, i processi di pretrattamento aiutano a rompere le pareti cellulari, rilasciando materia organica intracellulare, e ad incrementare il grado di solubilizzazione di sostanze polimeriche (Lee et al., 2014) (Suarez et al., 2021). I principali obiettivi dei pretrattamenti sono la riduzione del contenuto di lignina, la diminuzione della cristallinità della cellulosa, l'aumento della degradabilità e della solubilità del substrato, nonché la riduzione delle dimensioni particellari e l'incremento della porosità della biomassa. Di conseguenza, ottenendo un

incremento della superficie utile all'attività microbica, viene massimizzata l'efficienza degli enzimi idrolitici, l'accessibilità ai polisaccaridi e la resa generale del processo fermentativo (Paneti et al., 2026) (Varghese et al., 2022) (Atelge, et al., 2020).

1.3.3.1 Pretrattamento termico

Il pretrattamento termico della biomassa è un trattamento di tipo fisico, ampiamente utilizzato grazie alla sua rapida cinetica e capacità di idrolizzare selettivamente l'emicellulosa. Facilita il processo di delignificazione migliorando la solubilizzazione del substrato ed incrementando l'accessibilità alla cellulosa. L'efficacia di questo processo è dovuta all'interconnessione di parametri quali temperatura, durata del trattamento e tipologia di biomassa da trattare. Spesso lo si combina all'utilizzo di sostanze chimiche che, modificando le condizioni di reazione, ottimizzano la resa del processo termico incrementando significativamente la biodegradabilità del substrato. (Sun et al., 2025) (Paneti et al., 2026). Può essere svolto in range di temperatura tra 60°C e 220°C (Montgomery et al., 2014) e l'efficacia è linearmente correlata al grado di solubilità del COD presente nella biomassa. Studi condotti su matrici alimentari riportano un incremento significativo di COD solubile, dovuto all'aumento del tasso di biodegradabilità di macromolecole complesse, in relazione ad elevate temperature di pretrattamento. Nello studio condotto da Zamel et al., (2026), è stato osservato che il trattamento a 190°C ha incrementato dal 52% all'82% la biodegradabilità di carboidrati, le proteine hanno subito un aumento dal 35% al 46% mentre i lipidi hanno raggiunto un tasso di biodegradabilità dell'84% contro il 67% nella matrice alimentare non pretrattata. Procedere con un pretrattamento termico più blando (70°C) permette comunque di ottenere ottime rese ma può necessitare di tempistiche più lunghe (Kondusamy et al., 2014).

Tuttavia, test svolti su diverse biomasse alimentari hanno dimostrato che l'utilizzo di processi termici spinti può causare il rilascio di sostanze tossiche per la comunità microbica o di composti in grado di inibire l'idrolisi enzimatica, riducendo di conseguenza la successiva produzione di acidi grassi volatili (Varghese et al., 2022).

1.3.3.2 Pretrattamenti acidi e alcalini

I pretrattamenti acidi ed alcalini vengono svolti in varie condizioni sia in termini di tipologia e quantità di acidi e basi utilizzati, che in riferimento alle tempistiche di durata del processo. Sono utili al fine di ottenere un'elevata resa idrolitica del materiale lignocellulosico perché la loro funzione principale è quella di distruggere e liquefare le pareti cellulari grazie alla formazione di radicali idrossilici. Di conseguenza le proteine perdono la loro struttura originale, i lipidi subiscono processo di saponificazione a pH elevati, ed i materiali intracellulari vengono rilasciati in soluzione, a causa

della rottura della struttura polimerica extracellulare, aumentando la digeribilità del substrato (Atelge et al., 2020).

Il pretrattamento alcalino combinato al termico generalmente incrementa il COD solubile apportando una maggiore resa in termini di biodegradabilità del substrato ed è riconosciuto come uno tra i metodi più efficaci di trattamento della materia organica complessa. Per raggiungere le condizioni di reazione desiderate, possono essere utilizzate diverse soluzioni basiche con capacità di solubilizzazione che segue l'ordine: $\text{NaOH} > \text{KOH} > \text{Mg}(\text{OH})_2$ e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Kondusamy et al., 2014).

È stato ampiamente comprovato che la soluzione alcalina facilita la disgregazione del materiale lignocellulosico in quanto, rompendo i legami ad idrogeno, contribuisce ad aumentare la solubilità dell'emicellulosa. Questa componente è preferita dai batteri, rispetto alla cellulosa, perché avendo peso molecolare inferiore le conferisce una biodegradabilità più rapida. Come riportato nel lavoro pubblicato da Monlau et al., (2012), steli di girasole sono stati trattati per 24 ore a 55 °C in una soluzione al 4% NaOH p/p, ottenendo un incremento del processo di delignificazione del 36% rispetto al non pretrattato. Un altro esempio viene riportato nello studio di El Achkar et al., (2018), in cui si è verificata la degradazione del 50% della lignina e del 22% di cellulosa presenti in vinacce che sono state pretrattate a temperatura ambiente per 24h con una soluzione di NaOH al 10% p/p.

Anche i pretrattamenti acidi sono utili nel dissolvere emicellulosa e lignina lasciando la cellulosa disponibile per trasformazioni enzimatiche in zuccheri o per processi fermentativi. Possono essere utilizzati diverse tipologie di acidi inorganici e organici, a diversa concentrazione, come l'acido solforico, fosforico, citrico e cloridrico. Tenzialmente si preferisce l'utilizzo di un acido diluito correlato ad elevate temperature per degradare materiale lignocellulosico in quanto sono condizioni che massimizzano la rottura dei legami glicosidici, facilitando la solubilizzazione dell'emicellulosa (Adolore et al., 2024).

Ne viene riportato un esempio nello studio condotto da Mikulski et al., (2018), in cui vengono indagate diverse condizioni di pretrattamento con acido solforico diluito in vinacce di distilleria. È stato dimostrato che la concentrazione di glucosio, derivante dalle biomasse pretrattate, aumenta all'aumentare della temperatura, tempo di pretrattamento e concentrazione di acido solforico utilizzato. Nello studio, la più alta concentrazione di zucchero (quantità superiore all' 85% mg/g su peso secco) è stata ricavata per ciascun substrato indagato alle condizioni 0.2M di acido solforico, per 60 minuti a 120 - 130°C ed è stato dimostrato che queste condizioni di processo, "poco spinte", sono efficienti nel limitare il fenomeno indesiderato della produzione di sostanze tossiche.

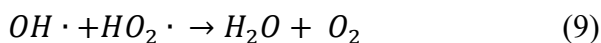
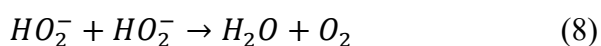
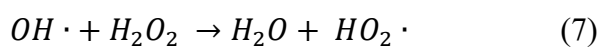
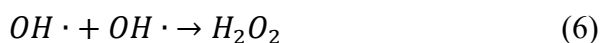
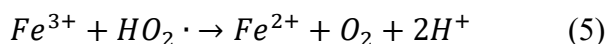
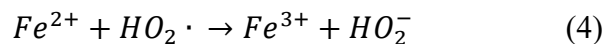
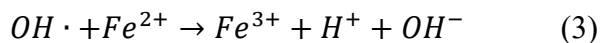
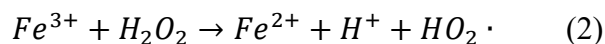
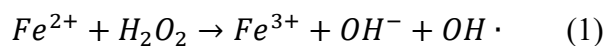
Anche gli acidi organici sono utili nel pretrattare la biomassa lignocellulosica. Come riportato nello studio di Rattanaporn et al., (2018), è stata indagata l'efficacia di pretrattamenti, con acido acetico, citrico e ossalico a diversa concentrazione e sottoposti a diverse tempistiche di processo e temperature, nel delignificare la biomassa del tronco della palma da olio. È stato dimostrato che il trattamento con acido ossalico ha avuto un'efficacia di 2.3 volte superiore, nelle condizioni ottimali, rispetto alla resa su biomassa non trattata.

1.3.3.3 Pretrattamento ossidativo mediante Reazione Fenton

Il pretrattamento mediante processo Fenton fa parte della categoria di processi di ossidazione avanzata (AOPs). Sono tecniche chimiche generalmente più economiche e caratterizzate da condizioni operative più blande rispetto alle metodiche classiche (Chan et al., 2025). Trovano larga applicazione nell'ambito della depurazione delle acque in quanto affiancano i classici trattamenti chimico-fisici e biologici nel portare a compimento il processo di mineralizzazione di sostanze organiche recalcitranti che riescono a sfuggire ai principali processi depurativi. Infatti, sono tecniche ossidative la cui azione è basata sulla formazione di specie radicaliche che, avendo un elettrone spaiato, risultano estremamente reattive. I processi di ossidazione avanzata sono classificati in base al metodo di generazione dei radicali che può essere di tipo chimico, fotochimico, indotto da radiazioni, elettrochimico e cavitazione.

La Reazione Fenton venne scoperta nel 1894 da H.J.H Fenton che fu il primo a notare che in presenza di sali di ferro il perossido di idrogeno si dissocia formando radicali idrossilici che lui utilizzò efficacemente per ossidare l'acido tartarico (Priyadarshini et al., 2022). L'innovazione della scoperta consiste nel fatto che l' H_2O_2 è un acido debole (pKa 11.65) che da solo non avrebbe una capacità ossidativa adeguata a degradare materiale organico recalcitrante, il che comporterebbe basse velocità di reazione anche a concentrazioni ragionevoli. I sali di ferro sono quindi indispensabili per attivare la decomposizione del perossido d'idrogeno incrementandone il potere ossidativo. Questa miscela viene definita Reagente Fenton, composto da ioni di ferro (Fe^{2+}) che, in condizioni acide, reagiscono con il perossido di idrogeno a formare specie reattive dell'ossigeno, in grado di degradare un ampio spettro di composti organici ed inorganici (Venny et al., 2012).

Il processo può complessivamente essere descritto dalle seguenti reazioni:



La prima equazione (1) viene riconosciuta con il nome di “reazione di Fenton” e rappresenta la fase di iniziazione del processo radicalico, in cui il Fe^{2+} si ossida a Fe^{3+} catalizzando la formazione del radicale perossido ($OH \cdot$) e dando il via alla complessa sequenza di reazioni radicaliche in cui il ferro passa da stato di ossidazione 2+ a 3+ e viceversa. Infatti, la seconda equazione (2), che è definita “reazione tipo Fenton”, dimostra che in presenza di eccesso di perossido di idrogeno il Fe^{3+} viene ridotto a Fe^{2+} , portando alla formazione di radicali idroperossilici ($HO_2 \cdot$), e descrivendo così il ciclo redox degli ioni di ferro (**Fig. 17**).

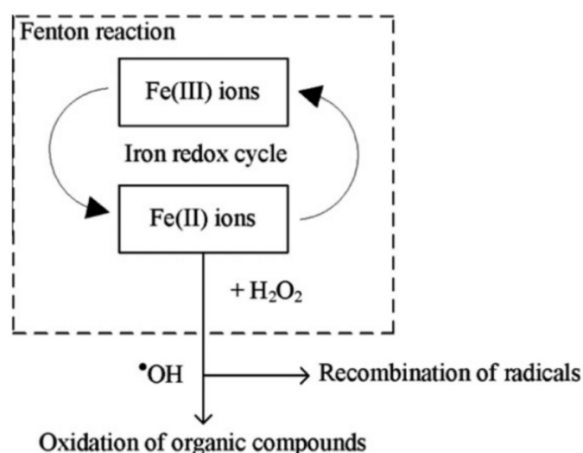
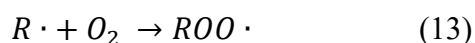
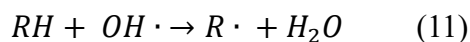


Figura 17: Ossidazione della materia organica mediante Processo Fenton

È importante sottolineare che, mentre il ferro aggiunto in piccole quantità funge da catalizzatore, il perossido di idrogeno viene totalmente consumato per la produzione di radicali idrossili. Pertanto, l'acqua ossigenata funge sia da promotore che anche da terminatore della reazione. Le reazioni 2, 3, 4, 5, sono fasi limitanti la velocità del processo Fenton in quanto descrivono il consumo del perossido di idrogeno ed il processo di ossido - riduzione ciclica degli ioni di ferro. Il radicale idrossilico, che si forma nella prima fase, può essere eliminato sia dagli ioni ferrosi (3), che dal perossido di idrogeno (7), dai radicali idroperossilici (9) oppure possono essere eliminati per reazione tra radicale idrossilico stesso (6). Le equazioni 6, 7, 8, 9, rappresentano reazioni estremamente veloci che possono avvenire tra radicali o tra perossido di idrogeno e radicale durante il processo. Nel caso in cui due molecole di acqua ossigenata dovessero reagire assieme, equazione 10, comporterebbe a un incremento di costi del trattamento in quando il perossido di idrogeno verrebbe inutilmente consumato a formare ossigeno molecolare e acqua (Babuponnusami et al., 2014) (Casalatina, 2013).

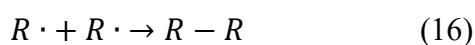
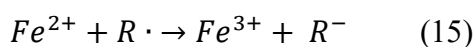
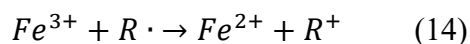
Il principale vantaggio della reazione i Fenton è che il radicale idrossilico ha una capacità ossidativa aspecifica, permette di degradare un'elevata quantità di molecole e legami diversi, comprese strutture aromatiche, legami covalenti cellulosa - emicellulosa o cellulosa - lignina ma anche legami glicosidici di cellulosa a catena lunga arricchendo il substrato di cellulosa a catena corta (Chan et al., 2025).

Pertanto, i substrati organici (RH) subiscono attacco radicalico da parte delle specie idrossiliche, processo che può essere descritto mediante le seguenti equazioni:



In questo modo molecole organiche complesse vengono convertite in specie estremamente reattive ($R \cdot$) che alimentano la catena di processi ossidativi radicalici i quali porteranno alla formazione di molecole generalmente meno reattive e meno complesse (Bahri et al., 2018).

Infatti, i radicali organici possono subire ulteriori processi di ossidoriduzione, ad opera degli ioni ferrici e ferrosi, e coniugarsi assieme per terminare la catena radicalica (eq. 16):



(Babuponnusami et al., 2014)

L'efficienza del processo Fenton è legata a determinati parametri operativi e tra i più importanti da tenere in considerazione ci sono: pH, temperatura, rapporto Fe^{2+}/H_2O_2 .

- pH di processo:

Generalmente il processo Fenton viene condotto a pH acido (3-5.5) perché questa condizione favorisce la formazione di Fe^{2+} , al quale sono associate velocità elevate di reazione, e minimizza la precipitazione di ioni Fe^{3+} . Tuttavia, un valore estremamente basso di pH stabilizza il perossido di idrogeno limitando la produzione di radicali idrossilici con conseguente impatto negativo sulla resa complessiva e sull'efficacia di degradazione della lignina. Invece, procedere in ambiente alcalino significa abbassare il potenziale ossidativo della coppia redox OH/H_2O , passando da $E = 2.80V$ a pH 0 a valori di $E = 1.95V$ a pH 14 e far precipitare gli ossidi di ferro con conseguente carenza di catalizzatore (Fe^{2+}) (Casalatina, 2013) (Chan et al., 2025) (Babuponnusami et al., 2014).

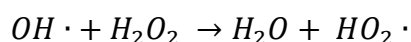
- Temperatura di processo:

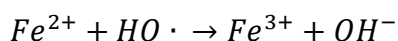
Il processo Fenton procede molto bene a temperatura ambiente. Temperature elevate potrebbero influenzare positivamente la cinetica di reazione ma essendo un processo ossidativo esotermico è termodinamicamente favorito alle basse temperature. Il range ottimale si attesta tra i 20°C e 30°C ma se si vuole velocizzare il processo è possibile operare fino e non oltre i 51°C perché oltre a tale temperatura si favorisce la volatilizzazione dell' H_2O_2 (Casalatina, 2013).

- Rapporto Fe^{2+}/H_2O_2 :

L'efficienza del processo Fenton tendenzialmente aumenta all'aumentare della quantità di ioni ferrosi. Alcuni studi però evidenziano che una quantità eccessiva di ferro non sia così linearmente efficace nell'incrementare il processo degradativo in quanto, la quantità non utilizzata, finisce per aumentare il contenuto di solidi disciolti sottoforma di sali di ferro. Per quanto riguarda la quantità di perossido di idrogeno deve essere sufficiente a garantire l'intero processo ossidativo in relazione al tipo di substrato da dover trattare. La presenza di residuo di H_2O_2 , dovuto ad un dosaggio eccessivo, risulta tossica per comunità batteriche implicate in successivi processi biologici (Babuponnusami et al., 2014).

Tuttavia, fattore importante per massimizzare l'efficienza del processo è trovare un rapporto di massa ottimale tra Fe^{2+} e H_2O_2 evitando che dosaggi elevati possano promuovere le reazioni di eliminazione dei radicali idrossilici:





È stato dimostrato infatti che la reazione di ossidazione del materiale organico, ad opera del radicale idrossilico, sia più efficiente quando né H_2O_2 né Fe^{2+} sono sovradosati (Lopez et al., 2004). Nello studio condotto da Karthikeyan et al., (2026), è stata valutata la capacità del processo Fenton nel ridurre il contenuto di lignina della biomassa di mais con lo scopo incentivare i successivi processi di bioconversione. Sono stati testati diversi rapporti molari di reagente Fenton (1:25, 1:50, 1:75) dimostrando che le condizioni ottimali di pretrattamento sono state ottenute utilizzando il rapporto molare più “contenuto” quale 1:25, riducendo il contenuto di lignina del 36% rispetto al non pretrattato.

1.3.3.4 Criticità e limiti dei pretrattamenti

Ogni tecnica di pretrattamento offre opportunità specifiche per ottenere una trasformazione chimico - fisica della biomassa ed incrementarne la biodegradabilità, contribuendo significativamente a migliorare l'efficienza del successivo processo fermentativo. Tuttavia, come già precedentemente citato, ciascun metodo non è esente dal causare problematiche. Nel caso del pretrattamento termico, l'efficienza del processo è strettamente correlata ai costi in quanto è un metodo che può essere molto energivoro. Inoltre, a temperature superiori a 160°C è possibile che si vengano a formare dei sottoprodotti indesiderati che possono inibire i processi biochimici a valle. Anche i pretrattamenti di tipo chimico possono portare alla formazione di derivati tossici e di inquinanti secondari che costituiscono un importante fattore di criticità (Varghese et al., 2022).

La formazione di sottoprodotti indesiderati si presenta soprattutto se i residui di lignina non vengono sottratti alla fine del processo di pretrattamento e restano come substrato nelle fasi successive. La formazione di sostanze inibitrici può avvenire sia durante il processo di solubilizzazione dell'emicellulosa e della lignina (come l'acido acetico, levulinico e furfurale), che derivare involontariamente dall'alterazione della struttura cellulosica. Inoltre, la lignina può essere trasformata in idrossimetilfurfurale (HMF) e furfurale durante il processo di disidratazione degli zuccheri esosi e pentosi, i quali inibiscono il successivo processo fermentativo perché alterano la struttura della comunità microbica e ne ritardano la crescita degli organismi anaerobi (Atelge et al., 2020) (Jonsson et al., 2016) (Tan et al., 2021).

L'utilizzo di acidi o di basi per trattare la biomassa può comportare la formazione di composti fenolici. Anche in piccola quantità (< 1 g/l), queste sostanze compromettono l'integrità della membrana cellulare microbica influenzando la crescita della comunità e la digestione degli zuccheri, riducendo

significativamente la resa fermentativa (Chan et al., 2025). Tuttavia, la formazione di inibitori è legata alla tipologia di processo e biomassa utilizzata (Fig. 18) (Atelge et al., 2020) (Jonsson et al., 2016).

Perciò, per superare le criticità riguardanti i diversi metodi di pretrattamento, viene suggerito come ideale la modalità di trattamento combinato in quanto permetterebbe di compensare i difetti dei singoli processi. In questo modo sarebbe possibile superarne le limitazioni, massimizzare la frazione di cellulosa accessibile all'attività enzimatica ed aumentare le rese in termini di produzione di acidi grassi volatili (Varghese et al., 2022).

Pretreatment methods	Main effect	Used chemicals	By-product formation
Acid-based methods	Hydrolysis of hemicelluloses to monosaccharides	Involve catalysts such as H_2SO_4 , SO_2 , HCl , H_3PO_4	Aliphatic carboxylic acids, phenylic compounds, furans, etc.
Hydrothermal processing	Solubilization of hemicelluloses without complete hydrolysis	No additives	Acetic acid, minor amounts of furan aldehydes
Mild alkaline methods	Removal of lignin and a minor part of hemicelluloses	Involve alkali such as $NaOH$, $Ca(OH)_2$, NH_3	Acetic acid, hydroxy acids, dicarboxylic acids, phenolic compounds
Oxidative methods	Removal of lignin and part of hemicelluloses	Involve oxidants such as H_2O_2 and O_2 (alkaline conditions), and O_3	Aldonic and aldaric acids, furoic acid, phenolic acids, acetic acid
Chemical pulping processes	Methods that target lignin and to some extent hemicelluloses	Kraft pulping, sulfite pulping, soda pulping, organosolv pulping	Aliphatic acids
Alternative solvents	Dissolution of specific lignocellulosic components or the whole biomass	Ionic liquids	Dependent on solvent and conditions

Figura 18: Rassegna dei principali sottoprodotti derivanti da pretrattamenti chimici del materiale lignocellulosico

Fonte: Jonsson et al., 2016

1.3.4 Parametri del processo fermentativo

Sebbene la produzione di acidi grassi volatili sia strettamente influenzata dalla tipologia di substrato utilizzato, l'efficienza della fermentazione anaerobica può essere ottimizzata attraverso un'opportuna regolazione dei principali parametri operativi del processo.

Tra i principali fattori che influenzano il processo si annovera la temperatura, che gioca un ruolo chiave nelle fasi idrolitica e fermentativa. Essa incide direttamente sull'efficienza del sistema, in quanto influenza le cinetiche di crescita batterica: i vari ceppi microbici, infatti, prediligono specifici intervalli termici e rispondono in modo differente alle variazioni di temperatura. Numerosi studi indicano le condizioni mesofile (20 - 40 °C) come ottimali per la produzione di VFA, sebbene temperature più elevate possano incrementare il tasso di solubilizzazione delle sostanze organiche. Tuttavia, la letteratura riporta risultati contrastanti circa l'efficacia delle condizioni termofile per la produzione di acidi grassi volatili. (Pandey et al., 2022).

Come accennato in precedenza, il pH operativo è un parametro determinante perché i batteri riducono sensibilmente l'attività metabolica per valori estremamente acidi o alcalini. Studi riportati in letteratura affermano che il valore ottimale dipende dalla tipologia di substrato utilizzato, generalmente si preferisce un ambiente neutro o leggermente alcalino per la degradazione e fermentazione di biomasse alimentari. Modificando il pH è possibile influenzare direttamente la resa qualitativa della fermentazione in quanto si possono indagare intervalli ottimali per prediligere la produzione di determinati acidi a scapito di altri, ma ciò è strettamente legato alla tipologia di substrato (Lee et al., 2014).

In aggiunta all'elevata biodegradabilità del materiale organico anche il contenuto di nutrienti è fondamentale per la buona riuscita del processo. L'azoto risulta l'elemento limitante la crescita microbica anaerobica ed è stato dimostrato che la capacità di assorbimento di carbonio è circa trenta volte superiore a quella dell'azoto; perciò, substrati con un rapporto N/C di circa 25 - 30:1 sembrano essere ottimali per un processo efficace mentre biomasse a bassa concentrazione di azoto potrebbero richiedere tempi più lunghi (Chew et al., 2021).

Un parametro importante per incentivare la produzione di acidi grassi volatili è l'ISR (Inoculum to Substrate Ratio) definito come il rapporto tra inoculo e substrato in termini di componente volatile ($\text{gVS inoculo} / \text{gVS substrato}$). È un valore che incide significativamente se l'obiettivo è quello di promuovere il processo fermentativo a scapito della produzione di metano. Le condizioni ottimali per incrementare la produzione di acidi grassi volatili sono rappresentate da un valore ISR basso perché corrisponde a condizioni di elevato contenuto di materiale organico rispetto alla quantità di

microrganismi (Tian et al., 2024). Infatti, tali condizioni incentivano sia il processo idrolitico iniziale, in quanto caratterizzato da una cinetica di utilizzo del substrato di primo ordine indipendente dalla concentrazione di batteri idrolizzanti, che di conseguenza la successiva fase fermentativa acidogenica tipicamente descritta, dal punto di vista cinetico, dal modello di Monod (APAT, 2005). In questo modo la materia organica viene velocemente convertita in acidi grassi volatili, abbassando il pH dell'ambiente di reazione, con conseguente inibizione del processo di metanogenesi (Xu et al., 2012). Diversi studi riportano come rapporto ottimale ISR di 1:1 (condizione standard) o 0.5:1 (condizione più spinta). Infatti, nel lavoro di Li et al., (2020) è stato dimostrato che la produzione totale di acidi grassi volatili, derivanti da processo di fermentazione acidogenica su idrolizzato di paglia di mais, è risultata massima con un rapporto ISR 0.5:1 (5170 mgCOD/l). La resa si è ridotta adottando i rapporti 1:1 e 2:1 passando da 3813 mgCOD/l a 1546 mgCOD/l, dimostrando che all'utilizzo del rapporto 0.5:1 è corrisposto un abbassamento del pH, dovuto all'efficienza fermentativa, che ha influenzato la struttura della comunità batterica con conseguente inibizione dell'attività metanigena. Inoltre, è stato evidenziato che il rapporto ISR influenza anche la composizione di acidi grassi volatili prodotti. Nello studio viene riportato l'acido butirrico come molecola principale in tutte le prove citate seguito dall'acido acetico ma un'eterogeneità maggiore, in termini di VFA, si è ottenuta con il rapporto 1:1 dove sono stati riscontrati anche acido propionico, isobutirrico e valerico.

Numerosi studi in letteratura utilizzano configurazioni reattoristiche in continuo o semi - continuo in quanto permettono di comprendere appieno la potenzialità della fermentazione acidogenica seppur con lo svantaggio di ottenere una produttività inferiore rispetto alla reattoristica di tipo batch (Suarez et al., 2021). In tal contesto un parametro importante è l'OLR (Organic Loading Rate) che rappresenta la disponibilità del substrato per il processo fermentativo (Pandey et al., 2022), ovvero materiale organico (comunemente espresso in termini di Chemical Oxygen Demand, Total Solids o Volatile Solids) immesso nel reattore giornalmente per unità di volume. È stata osservata una relazione lineare tra OLR e produzione di VFA, i quali aumentano fino al raggiungimento di un valore di OLR massimo che è caratteristico del tipo di substrato (Lee et al., 2014). Questa crescita ha un limite che, indipendentemente dalla tipologia di materiale organico utilizzato, corrisponde ad un elevato valore di OLR oltre il quale si verifica una riduzione della quantità di acidi grassi prodotti (Khan et al., 2016). Ciò dimostra il superamento di condizioni ottimali di processo correlate ad un brodo di fermentazione che diventa troppo viscoso (Varghese et al., 2022) (Lee et al., 2014). Inoltre, essendo che l'OLR determina significativamente anche la distribuzione dei VFA, studi riportati in letteratura considerano opportuno valutare gli effetti di questo parametro in relazione ad altri fattori, quali pH ed il tempo di ritenzione idraulica (Hydraulic Retention Time, HRT), che possono influenzare direttamente la resa fermentativa (Lee et al., 2014) (Jiang et al., 2013).

Altro fattore chiave è il tempo di ritenzione idraulica (Hydraulic Retention Time), che in reattori alimentati in continuo o semi-continuo, rappresenta la quantità di tempo trascorso dal substrato all'interno del sistema (Zanlungo, 2023). Diversi studi in letteratura riportano valori differenti di HRT ottimali, in termini di resa di acidi grassi volatili, suggerendo che questo parametro non debba essere considerato come unico fattore determinante la produzione di VFA (Zhou et al., 2018). Infatti, il tempo di residenza idraulico deve essere definito con lo scopo di garantire una degradazione totale del substrato ed è legato in modo inversamente proporzionale al valore di OLR (Franceschin, 2021). Inoltre, è un parametro a cui sono strettamente legate le prestazioni delle comunità microbiche, perciò, è importante che venga scelto accuratamente per evitare l'eliminazione accidentale dal reattore di microrganismi fermentanti con una cinetica di crescita superiore all'HRT (Zanlungo, 2023). Tuttavia, è stato osservato che HRT elevati possono promuovere sia la proliferazione di batteri metanigeni, con consumo di VFA e conseguente produzione di metano, che portare a modifiche nella composizione della miscela promuovendo il processo di β – ossidazione inversa e conseguente elongazione della catena degli acidi carbossilici prodotti (Jankowska et al., 2017) (Riboli, 2023).

2. Scopo della tesi

Il presente lavoro ha lo scopo di valutare gli effetti di diversi pretrattamenti, effettuati su matrici organiche complesse quali fecce di vino e trebbie di birra (BSG), sulla resa del processo di fermentazione acidogenica condotta in regime termico mesofilo e termofilo.

Inizialmente, è stata svolta la caratterizzazione dei substrati nella loro condizione originaria e successivamente sono stati effettuati dei test di pretrattamento, con il fine di valutare quale processo fosse da considerarsi più idoneo nel degradare e solubilizzare il materiale organico recalcitrante di cui le biomasse in esame sono composte.

Individuate le condizioni di pretrattamento più efficaci, le matrici non trattate e quelle sottoposte ai pretrattamenti selezionati sono state confrontate in termini di produzione complessiva di acidi grassi volatili, evoluzione temporale del processo fermentativo e composizione della miscela di VFA. Le prove sono state condotte in reattori batch replicati, sia in regime mesofilo sia termofilo, mantenendo costante il rapporto I/S (Inoculo/Substrato). Il pH è stato mantenuto prossimo alla neutralità per l'intera durata delle fermentazioni, così da valutare prevalentemente l'effetto della temperatura e della tipologia di pretrattamento sulla produzione di acidi grassi volatili.

3. Materiali e metodi

3.1 Substrati

I substrati utilizzati per questo studio sono dei sottoprodotti derivanti dalle lavorazioni del settore vitivinicolo e brassicolo, quali fecce di vino e trebbie di birra (BSG). Inoltre, è stato utilizzato il fango dell'impianto di trattamento acque di Treviso come inoculo del processo fermentativo.

3.1.1 Fecce di vino

Le fecce di vino (**Fig. 19**) sono una matrice eterogenea caratterizzata da un pH acido e composta principalmente da un elevato contenuto di carbonio organico, lieviti, ricche in fenoli e potassio. Rappresentano il principale scarto del processo di vinificazione ([Da Ros et al., 2017](#)).

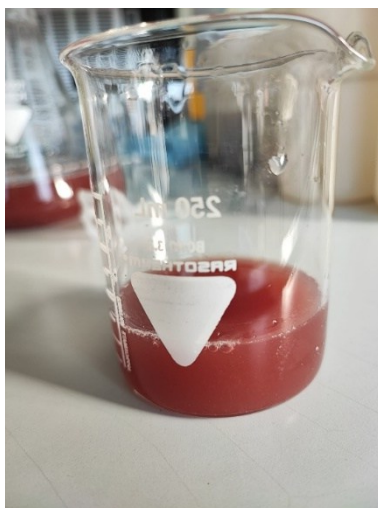


Figura 19: Fecce di vino

3.1.2 Trebbie di birra

Le trebbie di birra (**Fig. 20**) costituiscono il residuo insolubile lignocellulosico che deriva dal processo di filtrazione del mosto di birra. Composte prevalentemente di cellulosa, emicellulosa, lignina e proteine ([Lynch et al., 2016](#)).



Figura 20: Trebbie di birra

3.2 Piano di lavoro

Nella prima fase del presente studio è stata effettuata la caratterizzazione delle matrici in esame quali fecce di vino e trebbie di birra. Per quanto concerne la feccia sono state eseguite le analisi di azoto totale (TKN), azoto ammoniacale (N-NH_3), COD (su campione secco), sCOD, Solidi Totali (TS), Solidi Volatili (VS) e pH. Mentre per le trebbie, essendo un substrato solido, si è ritenuto opportuno procedere con le analisi di azoto totale (TKN), COD (su campione secco), Solidi Totali (TS) e Solidi Volatili (VS). Ottenuto il quadro completo sulle caratteristiche dei substrati, si è proceduto ai test riguardanti i pretrattamenti delle biomasse.

Per quanto riguarda la feccia i pretrattamenti sono stati svolti sulla matrice tal quale, in quanto già allo stato liquido. Per la trebbia, essendo un residuo solido, è stato necessario prepararne una soluzione. Pertanto, sulla base di quanto riportato nello studio di Pérez-Barragán et al., (2024), si è scelto di utilizzare una soluzione con concentrazione di solidi totali del 7% p/p. I pretrattamenti sono stati svolti in condizioni reattoristiche discontinue (batch) utilizzando delle bottiglie chiuse ermeticamente e riempite con un volume di substrato pari a 400ml. I trattamenti svolti sono stati di tipo termico in condizioni di pH neutro (pH 7, 70°C) e termico combinato a condizioni acide (pH 2 con H_2SO_4 al 96%), alcaline (pH 13 con NaOH al 30%) e con reattivo di Fenton in ambiente acido. Per l'esecuzione di quest'ultimo, feccia e trebbia sono state sottoposte a due diversi rapporti $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$:

- 1:10 di $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (pH 3, 1ml di H_2O_2 , 1g di $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
- 1:5 di $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (pH 3, 2ml di H_2O_2 , 1g di $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)

La durata del processo è stata di 48h e per valutare l'efficienza dei diversi pretrattamenti sono state svolte, all'inizio e a conclusione del test, le analisi di azoto ammoniacale (N-NH_3) e di COD solubile (sCOD). La tempistica è stata così definita in quanto dopo 24h di processo non è stato rilevato un incremento significativo dei parametri analizzati.

Tutte le analisi sono state svolte in triplicato da cui è stato calcolato il valore medio e relativa deviazione standard.

Di seguito viene riportata la **Tabella. 1** riassuntiva dei test di pretrattamento effettuati:

Tabella 1: Lista dei pretrattamenti impiegati nello studio

Nome campione	Tipologia di pretrattamento
Feccia 1	Termico (pH 7, 70°C)
Feccia 2	Termico - Alcalino (pH 13, 70°C)
Feccia 3	Termico - Acido (pH 2, 70°C)
Feccia 4	Termico - Fenton (pH 3, 1:10 di Fe^{2+}/H_2O_2 , 70°C)
Feccia 5	Termico - Fenton (pH 3, 1:5 di Fe^{2+}/H_2O_2 , 70°C)
Trebbia 6	Termico (pH 7, 70°C)
Trebbia 7	Termico - Alcalino (pH 13, 70°C)
Trebbia 8	Termico - Acido (pH 2, 70°C)
Trebbia 9	Termico - Fenton (pH 3, 1:10 di Fe^{2+}/H_2O_2 , 70°C)
Trebbia 10	Termico - Fenton (pH 3, 1:5 di Fe^{2+}/H_2O_2 , 70°C)

Valutati i risultati ottenuti da ciascun pretrattamento su entrambe le matrici in esame, per le successive prove di fermentazione sono stati selezionati i due test che sono risultati più efficaci nell'incrementare la solubilizzazione e degradabilità del materiale organico di fecce di vino e trebbie di birra.

Le prove di fermentazione sono state condotte utilizzando lo strumento Nautilus (**Fig. 21**) il quale ha permesso di effettuare i test in regime reattoristico batch in condizioni termostatiche (37°C per la fermentazione in regime termico mesofilo, 55°C per la fermentazione in regime termico termofilo).

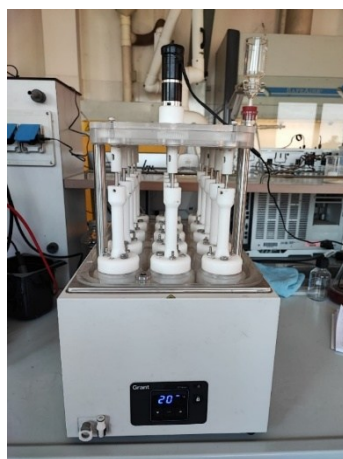


Figura 21: Rappresentazione della strumentazione Nautilus

Il volume utile di ciascun reattore è stato definito di 700ml ed il carico operativo utilizzato è stato di 15gCOD/gVS_{Inoculo}.

Prima di procedere con le fermentazioni, l'inoculo (**Fig. 22**) è stato acclimatato per due settimane alle condizioni termiche adeguate ai relativi processi fermentativi a cui era destinato, con l'aggiunta di glucosio per mantenere attivo il metabolismo microbico. In entrambe le fermentazioni sono stati svolti i medesimi test che hanno avuto in oggetto i substrati pretrattati, substrati tal quali ed anche la prova in bianco (senza aggiunta di substrato esogeno).



Figura 22: Inoculo

Il monitoraggio della produzione di acidi grassi volatili è stato effettuato cercando di mantenere il più possibile la medesima frequenza di campionamento, in entrambi i regimi fermentativi, mediante prelievo di piccole aliquote di brodo di fermentazione di ciascun reattore. È stato eseguito al momento dell'avvio (t_0), dopo 24h (t_1), dopo 48h (t_2) ed a giorni alterni fino alla fine del processo, la cui durata è stata definita di due settimane.

I campioni prelevati da ogni reattore sono stati sottoposti ad una fase di centrifugazione e poi filtrati con pompa a vuoto (**Fig. 23**) dotata di filtro a fascia nera (47mm/0.2 μ m). Il campione così ottenuto è stato l'oggetto delle analisi riguardanti la produzione di acidi grassi volatili (VFA).



Figura 23: Pompa a vuoto con filtro fascia nera

Alla fine di ciascuna operazione di campionamento è stato controllato e adeguatamente tamponato il pH di ogni reattore per mantenere le condizioni di reazione neutre durante l'intero processo.

3.3 Solidi totali/Solidi volatili

Il contenuto di Solidi Totali e la relativa percentuale di Solidi Volatili sono analisi tipiche per la caratterizzazione di matrici solido - liquide. I TS rappresentano la componente flottante, sedimentabile e colloidale nonché tutto il materiale che è presente in soluzione, ottenuti come residuo secco, previo passaggio in stufa a 100°C per 48h, della matrice in esame. Per individuare la percentuale di volatili, i solidi così essiccati devono subire incenerimento in muffola a 550°C per 24h, ricavando in questo modo i solidi totali fissi. Infine, per differenza tra i Solidi Totali ed i fissi si ottiene il contenuto di Solidi Volatili che sono indice della quantità di sostanza organica presente nella matrice in esame. Nel presente lavoro questi dati sono stati così ricavati per la caratterizzazione delle fecce di vino, trebbie di birra e per l'inoculo delle fermentazioni.

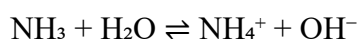
$$TS \left(\frac{gTS}{kg} \right) = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} * 1000$$

$$TVS \text{ in } \% \text{ di TS} = \left(\frac{\frac{P_2 - P_3}{P_1 - P_0} * 1000}{TS} \right) * 100$$

Con: P_0 peso del crogiolo vuoto, P_1 peso del crogiolo con matrice, P_2 peso dopo essiccazione in stufa, P_3 peso dopo incenerimento in muffola

3.4 Determinazione dell'azoto ammoniacale (N-NH₃)

Il contenuto di azoto ammoniacale (N-NH₃) è stato analizzato mediante elettrodo selettivo per l'ammoniaca (ISE) ed apposito lettore. L'ammoniaca presente in soluzione acquosa esiste in equilibrio con lo ione ammonio (NH₄⁺):



Lo strumento reagisce selettivamente al gas ammoniacale, il quale diffonde attraverso la membrana permeabile dell'elettrodo modificando il pH della soluzione interna. Pertanto, essendo che l'elettrodo misura l'ammoniaca (NH₃), il pH del campione deve essere regolato su valore alcalino (superiore a 11), tipicamente utilizzando una base forte come l'idrossido di sodio (NaOH), così che tutto

l'ammonio venga convertito in ammoniaca. L'elettrodo misura potenziometricamente la variazione del pH che risulta direttamente proporzionale alla concentrazione di NH_3 .

L'elettrodo (ISA) necessita di essere calibrato preparando una serie di soluzioni standard a concentrazione nota (100mM, 10mM, 1mM, 0.1mM, 0.01mM) da cui si ricava una curva di calibrazione.

Ultimata la calibrazione dello strumento, per misurare la concentrazione di azoto ammoniacale, ad ogni campione viene corretto il pH (a valore 11) con una soluzione di idrossido di sodio (NaOH). Successivamente, si posiziona l'elettrodo all'interno della soluzione campione che viene mantenuta in agitazione mediante una barretta magnetica e si aggiunge la soluzione standard (ISA). Il valore potenziometrico, espresso in mV, viene registrato nel momento in cui risulta stabilizzato. Inserendo il dato nella curva di calibrazione è possibile calcolare la concentrazione di azoto ammoniacale ($\text{mgN-NH}_3/\text{l}$).

3.5 Determinazione dell'azoto totale (TKN)

La determinazione dell'azoto totale mediante metodo Kjeldhal (TKN) consiste nel decomporre completamente la quantità di azoto carbonio organico presente nei campioni in azoto ammoniacale. In questo modo tutto l'azoto del campione sarà presente sottoforma di azoto ammoniacale che verrà analizzato mediante tecnica colorimetrica. Pertanto, ciò che verrà analizzato sarà quanto segue:

$$\text{TKN} = \text{N}_{\text{ORG}} + \text{N-NH}_3 + \text{N-NH}_4^+$$

Il metodo Kjeldhal consiste in una digestione acida (con acido solforico e perodisolfato di potassio) del residuo secco del campione (precedentemente seccato in stufa a 105 °C per due giorni) effettuata ad una temperatura di 370°C. Tutto l'azoto organico viene mineralizzato mediante mineralizzatore a microonde e trasformato in solfato d'ammonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) che verrà distillato in corrente di vapore. Alla fine, si procede con l'analisi colorimetrica e la concentrazione di azoto totale verrà così calcolata:

$$[\text{TKN}] = \frac{m * \text{ABS} * \text{F.D} * V}{P}$$

Con:

- m: coefficiente angolare retta di calibrazione
- ABS: assorbanza
- F.D: fattore di diluizione del campione
- V: volume del matraccio
- P: peso campione secco

L'unità di misura del TKN è:

$$[\text{TKN}] = [\text{gN}] / [\text{KgTS}]$$

3.6 Determinazione del COD (Chemical Oxygen Demand) su matrice secca

Il valore di COD rappresenta la quantità di ossigeno necessario ad ossidare chimicamente, mediante ossidante forte e a caldo, le sostanze presenti nel campione. Per poter determinare il COD su matrice secca il campione deve essere disidratato in stufa per 2h a 105 °C. Dal residuo secco ne viene prelevata una aliquota nota che viene sottoposta a processo di digestione acida, condotta in un mineralizzatore a microonde, mediante aggiunta di una soluzione di percromato di potassio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ossidante forte) in presenza di acido solforico (H_2SO_4) e solfato d'argento (Ag_2SO_4), utilizzato come catalizzatore, e solfato di mercurio (HgSO_4 per evitare l'interferenza dovuta alla presenza di cloruri). La determinazione del COD avviene mediante titolazione con solfato d'ammonio e ferro (soluzione FAS) del dicromato di potassio residuo, utilizzando la Ferroina come indicatore.

Per il calcolo del COD si utilizza la seguente equazione:

$$[\text{COD}] = \frac{(B-C) * \left(\frac{V * N}{T}\right) * 8}{P}$$

Con:

- N: normalità del bicromato (0.25N)
- V: Volume (ml) di $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
- B: Volume (ml) di FAS usato per la titolazione del bianco
- C: Volume (ml) di FAS usato per titolare il campione
- T: Volume (ml) di FAS usato per titolare il titolo
- P: peso (gTS) del campione secco
- 8: peso equivalente dell'ossigeno

La misura viene espressa in: $\text{mgCOD} * \text{gTS}^{-1}$

3.7 Determinazione di sCOD (Soluble Chemical Oxygen Demand)

Il dato di sCOD rappresenta la quantità di ossigeno richiesta per ossidare chimicamente la frazione solubile di materiale organico, ovvero la frazione facilmente biodegradabile presente nel campione filtrato. Il dato è stato ottenuto utilizzando il kit commerciale “Nanocolor CSB 10000” mediante tecnica colorimetrica. Il contenuto di sCOD presente nel campione viene ossidato dal reagente, la cui riduzione determina una variazione del colore del campione che passa da arancio a verde. La quantità di ioni ridotti è proporzionale alla concentrazione di COD del campione il cui valore di assorbanza viene misurata mediante tecnica spettrofotometrica.

Previa calibrazione dello spettrofotometro, la concentrazione di sCOD è determinata dalla seguente equazione:

$$[\text{sCOD}] = [\text{sCOD}]_{\text{avg}} * \text{F.D.}$$

Con:

- $[\text{sCOD}]_{\text{avg}}$: rappresenta la concentrazione media di sCOD misurata dall'analisi spettrofotometrica
- F.D: fattore di diluizione

Il dato viene riportato in mgCOD/l

3.8 Determinazione di acidi grassi volatili

Gli acidi grassi volatili sono i principali prodotti del processo di fermentazione acidogenica e rappresentano una parte del COD facilmente biodegradabile del materiale organico fermentato.

Le biomolecole indagate nel presente studio sono state: acido acetico, acido propionico, acido isobutirrico, acido butirrico, acido pentanoico, acido isopentanoico, acido isocaproico, acido caproico, acido eptanoico

La concentrazione di acidi grassi volatili è stata analizzata mediante tecnica gascromatografica con detector a ionizzazione di fiamma (GC-FID). L'analisi è stata condotta mediante gascromatografo Agilent 8890, equipaggiato con colonna capillare Agilent J&W DB-WAX Ultra Inert (30 m × 0.530 mm × 1.0 μm), utilizzando idrogeno come gas di trasporto.

I campioni sono stati preparati in Eppendorf utilizzando 1000 μl di campione, precedentemente diluito in acqua distillata con rapporto 1:100 per le fecce di vino e 1:10 per le trebbie di birra. Successivamente, sono stati aggiunti 100 μl di acido fosforico e 100 μl di acido 2-etilbutirrico come standard interno.

3.9 Analisi del pH

La misura di pH è stata ottenuta mediante pHmetro professionale portatile XS pH70 Vio (**Fig. 24**)



Figura 24: pHmetro portatile

4. Risultati e discussioni

Le sperimentazioni oggetto del presente studio sono state concepite con previa caratterizzazione dei substrati in esame a cui sono seguiti i test di pretrattamento e le prove di fermentazione. Vengono riportate di seguito le tabelle e grafici riassuntivi dei valori ottenuti per feccia di vino e trebbie di birra.

4.1 Caratterizzazione delle fecce di vino

Nella seguente tabella (**Tab.2**) vengono riportati i valori relativi alle analisi di caratterizzazione effettuate su feccia di vino non pretrattata.

Tabella 2: Caratterizzazione chimico – fisica della feccia utilizzata nella sperimentazione

Parametro	Valore medio $\pm$ DS	Unità di misura
TKN	34.7 ± 1.73	gN/KgTS
Azoto ammoniacale	0.10 ± 0.01	gN-NH ₃ /l
COD su secco	875 ± 4.23	gCOD/kgTS
COD solubile	66.33 ± 3.32	gCOD/l
Soliti Totali	2.17 ± 0.11	g/kg
Solidi Totali Volatili	1.86 ± 0.09	g/kg
Solidi Volatili/Solidi Totali	86 ± 0.50	%
pH	3	-

In generale, le caratteristiche della feccia vinicola utilizzata nel presente studio si discostavano da dati riscontrati in letteratura. Gli autori Jasko et al. (2012) e Finesso, (2014) concordano valori di TS e TVS relativamente di 70 gTS/kg e 40 gTVS/kg, con una percentuale di volatili sul totale di circa 55%, contrariamente a quanto emerso nel presente studio (**Tab. 2**) in cui è stata rilevata una %TVS/TS di 86% con un contenuto medio di TS e TVS ben più basso rispetto alla letteratura citata. Tuttavia, un rapporto elevato tra solidi volatili e totali evidenzia un contenuto significativo di materiale organico caratterizzante la feccia in esame.

Il valore medio analizzato di azoto totale (TKN) (**Tab. 2**), pari a 34.7 ± 1.73 gN/KgTS è risultato coerente con quanto riscontrato in letteratura negli studi di Da Ros et al. (2014) e Finesso (2014).

Al contrario, per quanto concerne il contenuto di azoto ammoniacale il substrato in esame (**Tab. 2**) presentava concentrazioni più elevate di quanto descritto nello studio di Finesso, (2014) in cui vengono riportati i valori di 29 mgN-NH₃/l e 60 mgN-NH₃/l, differenza dovuta ad oscillazioni stagionali.

La discordanza di dati relativi alle caratteristiche delle fecce di vino è da ricondurre al fatto che, essendo un sottoprodotto del processo di vinificazione, dipendono dalle materie prime utilizzate.

4.2 Pretrattamenti delle fecce di vino

4.2.1 Solubilizzazione della sostanza organica nelle fecce di vino

Il seguente grafico (**Fig. 25**) riporta i dati relativi all'incremento rilevato della concentrazione di sCOD, osservato al termine di ciascun pretrattamento.

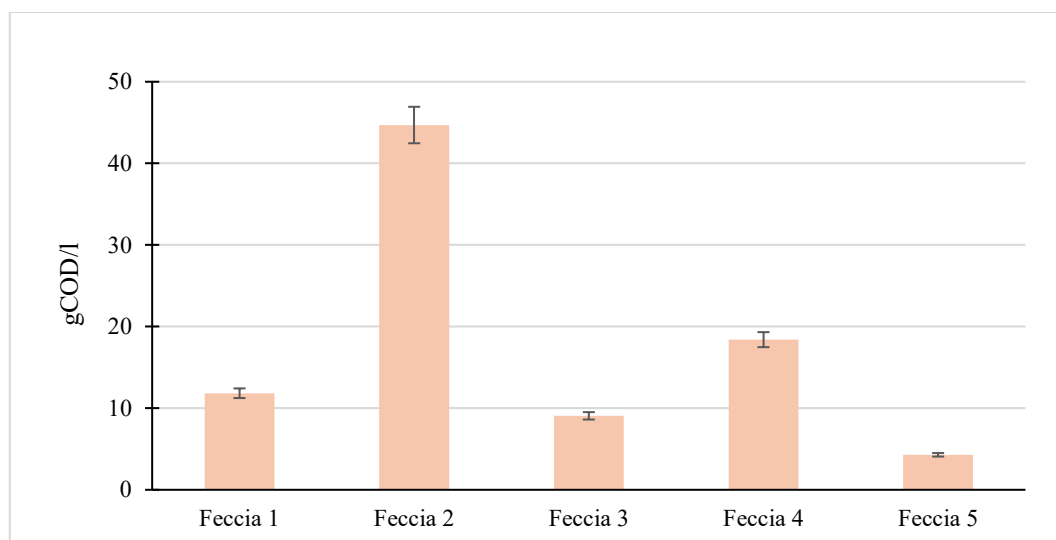


Figura 25: Incremento della concentrazione di sCOD osservato al termine delle prove di pretrattamento dalle fecce di vino

Per quanto concerne la feccia di vino il pretrattamento più efficace è stato quello alcalino (feccia 2) grazie al quale è stato ottenuto un incremento medio della concentrazione iniziale di sCOD pari a 44.70 ± 2.03 gCOD/l (**Fig. 25**), passando da un valore medio iniziale di 66.33 ± 3.32 gCOD/l ad un valore medio finale di 111.03 ± 5.55 gCOD/l.

Segue, in termini di resa, il trattamento con Reagente Fenton 1:10 di Fe^{2+}/H_2O_2 (feccia 4) in cui l'incremento della concentrazione di sCOD è stato di 18.40 ± 0.92 gCOD/l. Invece, l'effetto del pretrattamento con Reagente Fenton a rapporto 1:5 di Fe^{2+}/H_2O_2 (feccia 5) è risultato inferiore, in termini di incremento di sCOD, rispetto al medesimo pretrattamento a minor dosaggio di perossido d'idrogeno (feccia 4), evidenziando mediamente una differenza di circa 15 gCOD/l tra i due test.

I pretrattamenti termico (feccia 1) e acido (feccia 3) hanno determinato aumenti simili del COD solubile, con incrementi medi rispettivamente pari a 11.83 ± 0.59 gCOD/l e 9.06 ± 0.45 gCOD/l. In particolare, la concentrazione media di sCOD è aumentata da 66.33 ± 3.32 gCOD/l a 79.19 ± 3.95 gCOD/l nel caso del pretrattamento termico e a 75.39 ± 3.77 gCOD/l nel caso del pretrattamento acido.

4.2.2 Rilascio di azoto ammoniacale nelle fecce di vino

Il seguente grafico (**Fig. 26**) riporta i dati relativi all'incremento rilevato della concentrazione di azoto ammoniacale, osservato al termine di ciascun pretrattamento.

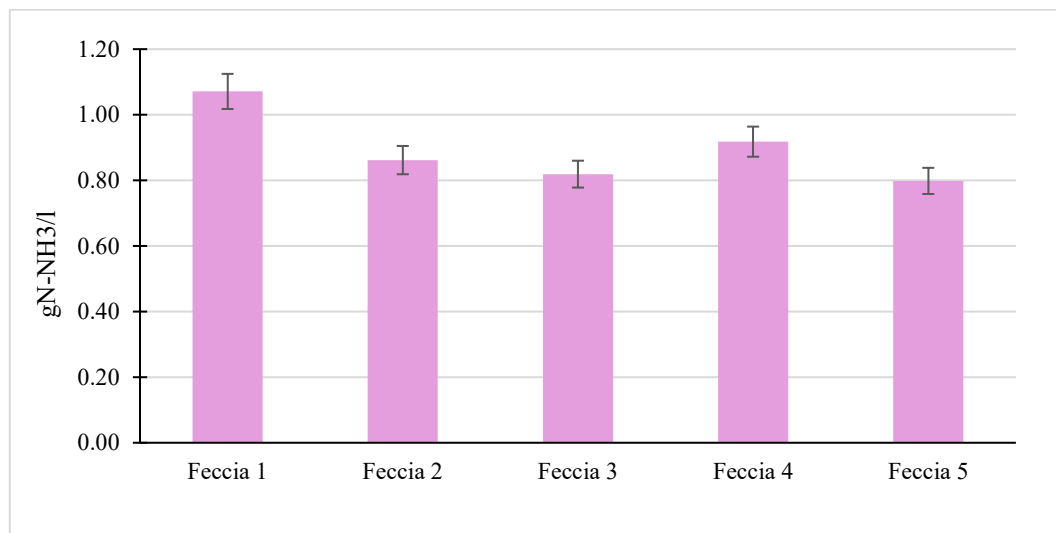


Figura 26: Incremento della concentrazione di azoto ammoniacale osservato al termine delle prove di pretrattamento dalle fecce di vino

Per quanto concerne il valore di azoto ammoniacale (**Fig. 26**), dai pretrattamenti alcalino (feccia 2) e acido (feccia 3) è stato ottenuto un similare incremento di valori medi di concentrazione, rispettivamente di 0.86 ± 0.04 gN-NH₃/l e 0.82 ± 0.05 gN-NH₃/l, ovvero nove volte maggiore il dato iniziale (**Tab. 2**).

Il pretrattamento termico è risultato il più promettente nell'incentivare la biodisponibilità di azoto ammoniacale (**Fig. 26**). Infatti, la concentrazione del nutriente è aumentata di 1.07 ± 0.05 gN-NH₃/l (da 0.10 ± 0.01 gN-NH₃/l a 1.17 ± 0.05 gN-NH₃/l) rispetto al valore iniziale.

Una lieve differenza è stata riscontrata tra i due processi Fenton (feccia 4 – 5). Tra questi è stato osservato un incremento maggiore utilizzando rapporto 1:10 di Fe^{2+}/H_2O_2 (feccia 4), con un valore medio di 0.92 ± 0.05 gN-NH₃/l, in linea con l'efficacia ottenuta per il dato di sCOD (**Fig. 26**), dimostrandosi un pretrattamento efficace nel degradare e solubilizzare le molecole contenute nel substrato.

4.3 Caratterizzazione delle trebbie di birra

Vengono riassunti nella seguente tabella (**Tab.3**) i valori relativi delle analisi di caratterizzazione svolte su trebbia di birra non pretrattata.

Tabella 3: caratterizzazione chimico – fisica della trebbia utilizzata nella sperimentazione

Parametro	Valore medio $\pm$ DS	Unità di misura
TKN	31.4 ± 1.57	gN/kgTS
COD su secco	972 ± 5.32	gCOD/kgTS
Soliti Totali	936 ± 4.20	g/kg
Solidi Totali Volatili	894 ± 3.30	g/kg
Solidi Volatili/Solidi Totali	96 ± 0.50	%

Il valore medio di azoto totale (TKN) analizzato nel presente studio, pari a 31.4 ± 1.57 gN/KgTS, è risultato in linea con quanto riportato in letteratura da Lebiocka et al. (2021) e Kebede (2020) in cui vengono citati valori rispettivamente di 3.8 % e 3.2 % (% peso secco).

Le concentrazioni di Solidi totali e Volatili (**Tab.3**) sono risultati coerenti con quanto riportato nello studio di Teixeira et al., (2020) in cui si riportano valori relativi a trebbie grezze di TS e TVS pari a 969 ± 4 g/kg e 936 ± 5 g/kg con un rapporto VS/TS di $96,6 \pm 0,1$ %.

4.4 Pretrattamenti delle trebbie di birra

4.4.1 Solubilizzazione della sostanza organica nelle trebbie di birra

Nel seguente grafico (**Fig. 27**) vengono riportati gli incrementi in termini di concentrazione di sCOD, ottenuti al termine dei pretrattamenti.

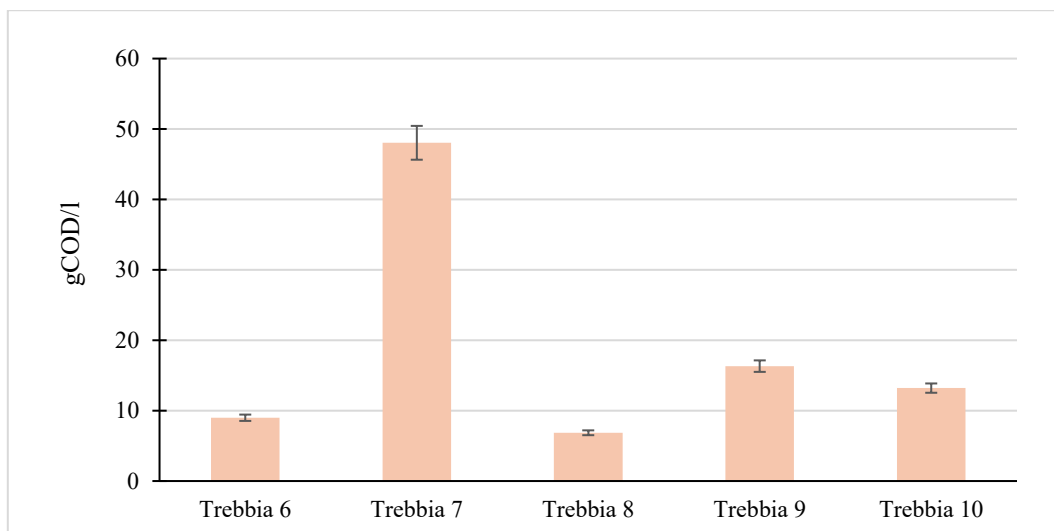


Figura 27: Incremento della concentrazione di sCOD osservato al termine delle prove di pretrattamento dalle trebbie di birra

Valutando i dati relativi al valore di COD solubile (**Fig. 27**) è risultato evidente che il trattamento alcalino (trebbia 7) sia stato per la trebbia quello più efficace. È stato ottenuto un incremento di sCOD di 8 volte il valore iniziale, pari a 48.04 ± 0.92 gCOD/l, passando da una concentrazione media di 6.03 ± 0.30 gCOD/l ad un valore finale di 54.07 ± 2.70 gCOD/l dopo 48h di pretrattamento.

A seguire, in termini di incremento di sCOD, vi troviamo il processo Fenton, con rese comparabili tra i due dosaggi di perossido di idrogeno (trebbia 9 – 10), dimostrando un aumento di quasi 4 volte il valore di sCOD presente nelle trebbie di birra non pretrattate.

Infine, nonostante il trattamento termico (trebbia 6) e acido (trebbia 8) siano risultati i meno efficaci per questo substrato, hanno comunque portato ad un raddoppio della frazione di sCOD iniziale.

4.4.2 Rilascio di azoto ammoniacale nelle trebbie di birra

Il seguente grafico (**Fig. 28**) riporta i dati relativi all'incremento rilevato della concentrazione di azoto ammoniacale, osservato al termine di ciascun pretrattamento.

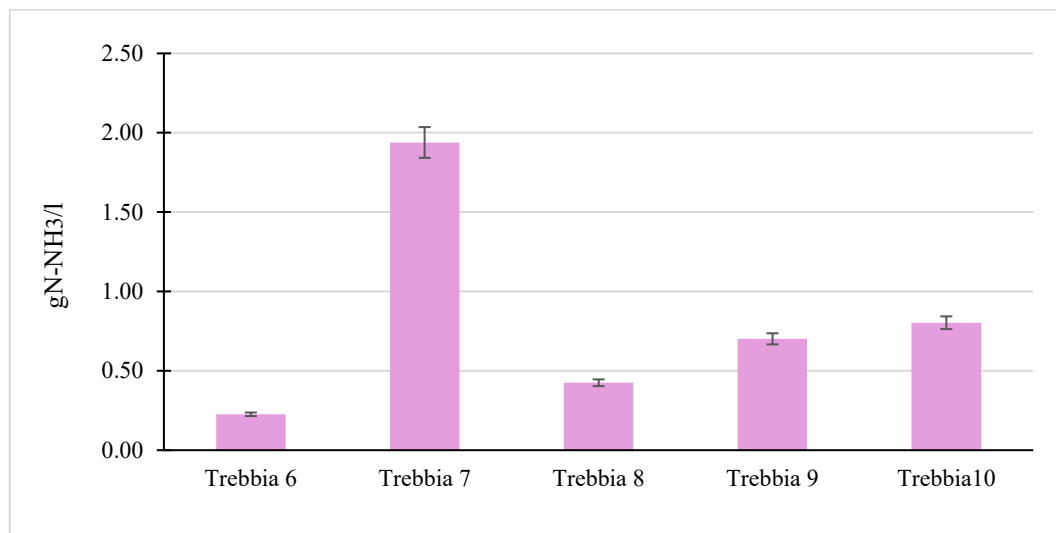


Figura 28: Incremento della concentrazione di azoto ammoniacale osservato al termine delle prove di pretrattamento dalle trebbie di birra

Rilevante è stato il dato riguardante il rilascio di azoto ammoniacale (**Fig. 28**) risultante dal pretrattamento alcalino (trebbia 7) in cui, in linea con l'effetto ottenuto su sCOD (**Fig. 27**), è stato osservato l'incremento massimo di 1.94 ± 0.10 gN-NH₃/l (passando da 0.01 gN-NH₃/l a 1.95 ± 0.09 gN-NH₃/l).

Seguono la resa dei processi Fenton (trebbia 9 – 10), con risultati simili tra loro, raggiungendo i valori di 0.72 ± 0.03 gN-NH₃/l e 0.82 ± 0.04 gN-NH₃/l che corrispondono ad incrementi di 0.71 ± 0.03 gN-NH₃/l e 0.81 ± 0.04 gN-NH₃/l rispettivamente con rapporto 1:10 e 1:5 di Fe^{2+}/H_2O_2 (**Fig. 28**)

Meno rilevanti sono stati i risultati ottenuti dai pretrattamenti di tipo termico (trebbia 6) e acido (trebbia 8) in cui l'incremento della concentrazione di azoto ammoniacale rispetto al valore iniziale è stato rispettivamente di 0.23 ± 0.01 gN-NH₃/l e 0.42 ± 0.02 gN-NH₃/l (**Fig. 28**).

4.5 Prove di fermentazione

Sulla base dei dati ottenuti nei pretrattamenti, in particolare con riferimento al parametro di sCOD (Fig. 25, Fig. 27), si è scelto di utilizzare nei test di fermentazione le matrici pretrattate con trattamento alcalino e con processo Fenton 1:10 di Fe^{2+}/H_2O_2 . Ciascun test è stato condotto alle condizioni riportate nel paragrafo “Piano di lavoro” e per poter effettuare un confronto sull’efficacia dei pretrattamenti sono state testate, nei processi fermentativi, anche i substrati non pretrattati; inoltre è stata condotta una prova in bianco, senza aggiunta di substrato.

L’inoculo utilizzato nelle prove di fermentazione è stato caratterizzato riscontrando un tenore di solidi totali (TS) pari a 15.97gTS/kg di cui il 74% di volatili (11.87 gTVS/kg)

4.5.1 Fermentazione acidogenica in regime termico mesofilo

I dati riguardanti i test di fermentazione di trebbia di birra e feccia di vino (per entrambi i substrati sono stati valutati il test con materiale grezzo, pretrattato alcalino e pretrattato Fenton) sono stati ottenuti mantenendo il processo in regime termico mesofilo (37°C) e durata del test di due settimane.

La produzione di acidi grassi volatili è stata corretta al netto dei valori rilevati durante la prova in bianco.

4.5.1.1 Controllo in bianco in regime mesofilo

I dati descritti dai seguenti grafici (Fig. 29, Fig. 30) riguardano i processi svolti dall’inoculo senza aggiunta di substrato.

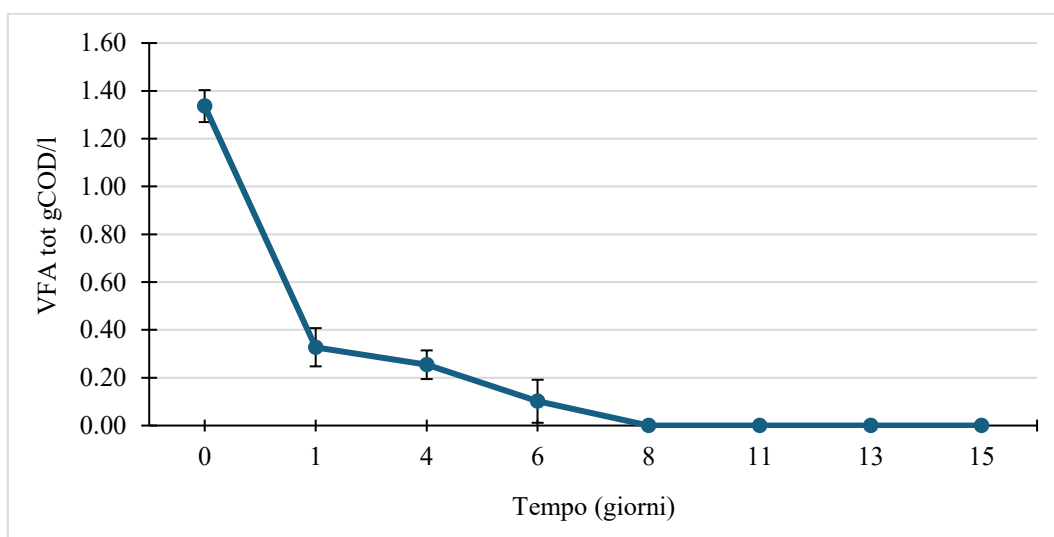


Figura 29: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento del bianco

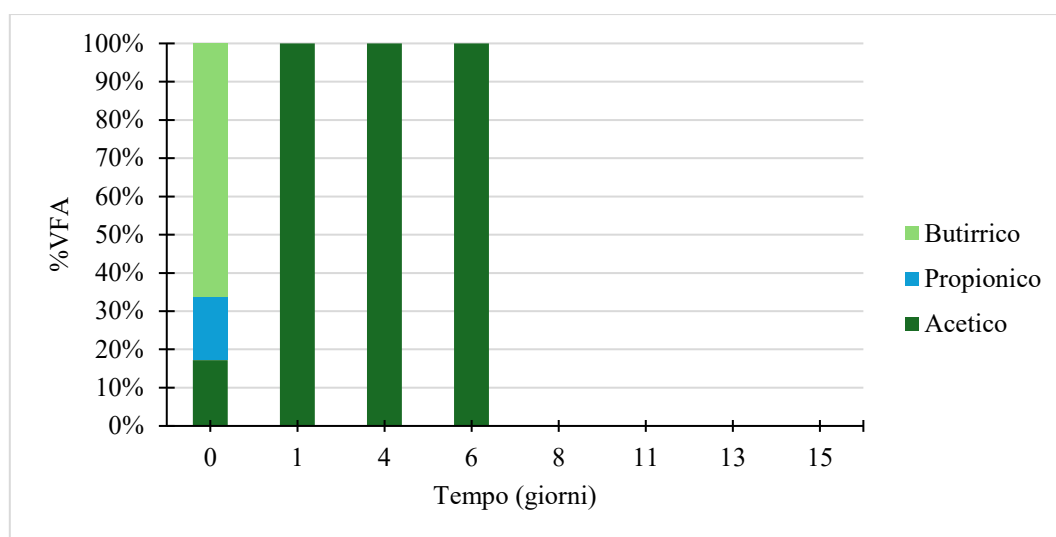


Figura 30: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento del bianco

Da questo test è possibile osservare il processo di lavoro in “endogeno” della comunità, in cui i microrganismi utilizzano le proprie riserve cellulari per sostenersi non essendoci substrato (materiale organico esogeno) che possa sostenerne l’attività biologica. Infatti, all’inizio del processo (t0) era presente una concentrazione minima di acidi grassi volatili che sono stati consumati come fonte di carbonio nei successivi sei giorni (**Fig. 29**). Gli acidi propionico e butirrico sono stati utilizzati come substrato nelle prime 24h di processo ed in parte trasformati in acido acetico, essendo la molecola principalmente utilizzata dal metabolismo microbico. Quest’ultimo è stato esaurito dalla comunità al sesto giorno con il conseguente arresto dell’attività batterica (**Fig. 30**).

4.5.1.2 Fermentazione della trebbia non pretrattata in regime mesofilo

I dati descritti dai seguenti grafici (**Fig. 31**, **Fig. 32**) riguardano il processo fermentativo svolto con trebbia di birra non pretrattata.

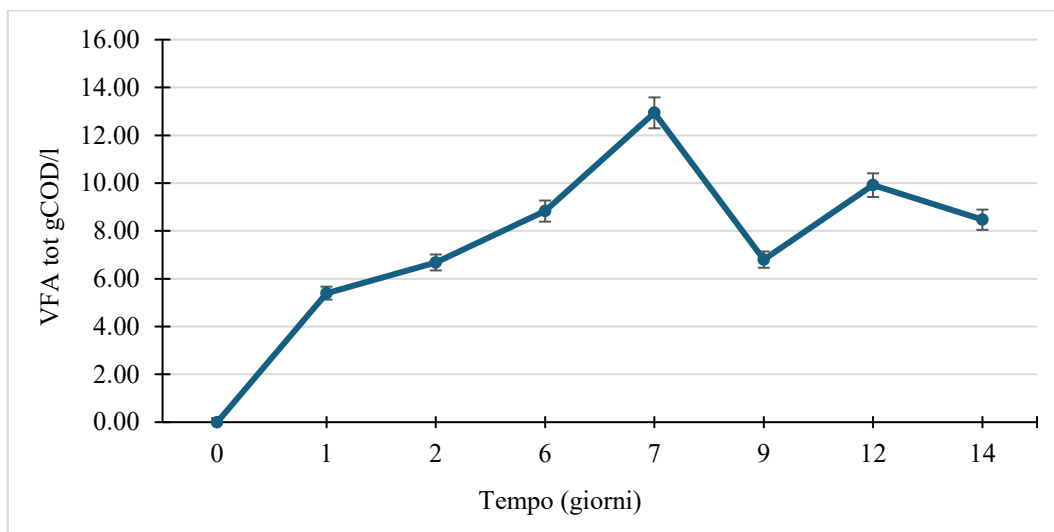


Figura 31: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento della trebbia grezza

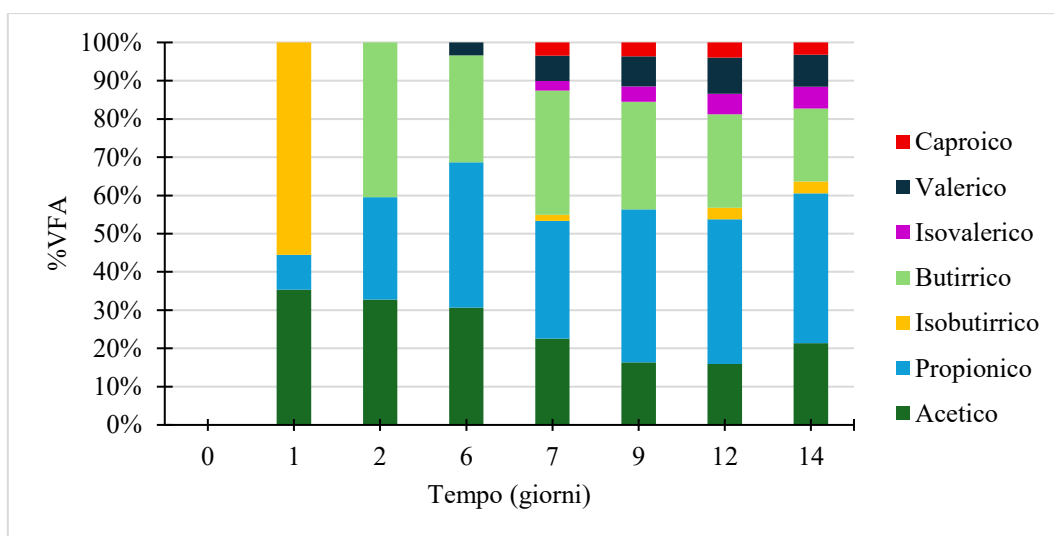


Figura 32: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento della trebbia grezza

Nella fase iniziale del processo fermentativo della trebbia di birra non pretrattata, si è osservata principalmente la produzione di acido isobutirrico e acido acetico, mentre l'acido propionico è risultato presente in quantità marginali. Dopo 48h di fermentazione, il profilo degli acidi grassi volatili (VFA) risultava caratterizzato dalla presenza predominante di acido butirrico, pari al 40% del totale, seguito da acido acetico e acido propionico, rispettivamente pari al 35% e al 25% (**Fig. 32**).

Al sesto giorno nel brodo di reazione è stato prodotto l'acido valerico, che è rimasto presente fino alla fine del processo, rappresentando circa il 10% della produzione di acidi grassi volatili totali

(VFA). Al contempo, l'acido propionico ha iniziato ad essere dominante come prodotto del processo fermentativo con un rapporto, di circa il 40% su base COD, che si è mantenuto abbastanza costante tra i VFA prodotti (**Fig. 32**). Inoltre, durante la fermentazione, si è assistito ad un graduale decremento di acido acetico seguito dalla produzione di acido butirrico che ha raggiunto la massima concentrazione al settimo giorno in corrispondenza della massima quantità di VFA totali prodotti (12.94 gCOD/l) (**Fig. 31**). In tal contesto, si è evidenziata anche una iniziale produzione di acido caproico, rimasto presente con una percentuale inferiore al 5% del totale, fino alla fine della fermentazione.

Dopo 48h dal raggiungimento del picco fermentativo (nono giorno), la concentrazione di acidi grassi volatili totali è stata dimezzata, per poi incrementare nuovamente di circa 3.00 gCOD/l nel penultimo campionamento, passando da 6.80 ± 0.34 gCOD/l a 9.91 ± 0.50 gCOD/l (**Fig. 31**). Tuttavia, nell'ultima settimana di processo, si è osservata una definita proporzione tra i VFA prodotti (**Fig. 32**).

Alla fine, negli ultimi giorni di fermentazione, la situazione del processo è sembrata tendere verso il consumo degli acidi grassi volatili, dinamica che probabilmente è stata indotta dalla ridotta disponibilità di substrato utile al metabolismo fermentativo acidogenico.

4.5.1.3 Fermentazione della trebbia pretrattata con Reagente Fenton in regime mesofilo

I seguenti grafici (**Fig. 33**, **Fig. 34**) riportano i dati relativi al processo fermentativo con substrato la trebbia pretrattata con Reagente Fenton. In questo paragrafo viene discusso il confronto tra la prova di fermentazione svolta con trebbia grezza e con trebbia pretrattata.

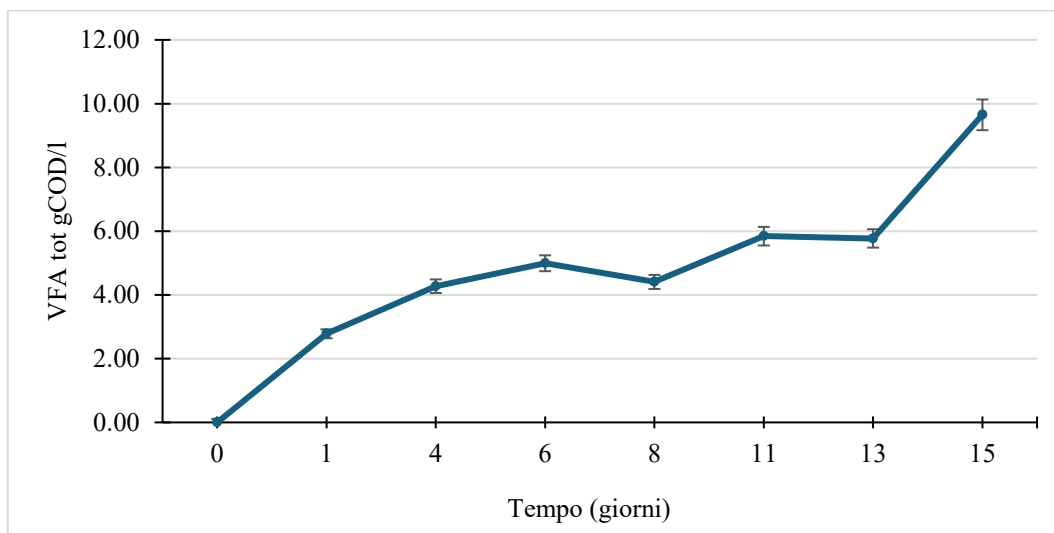


Figura 33: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento della trebbia pretrattata con Reagente Fenton

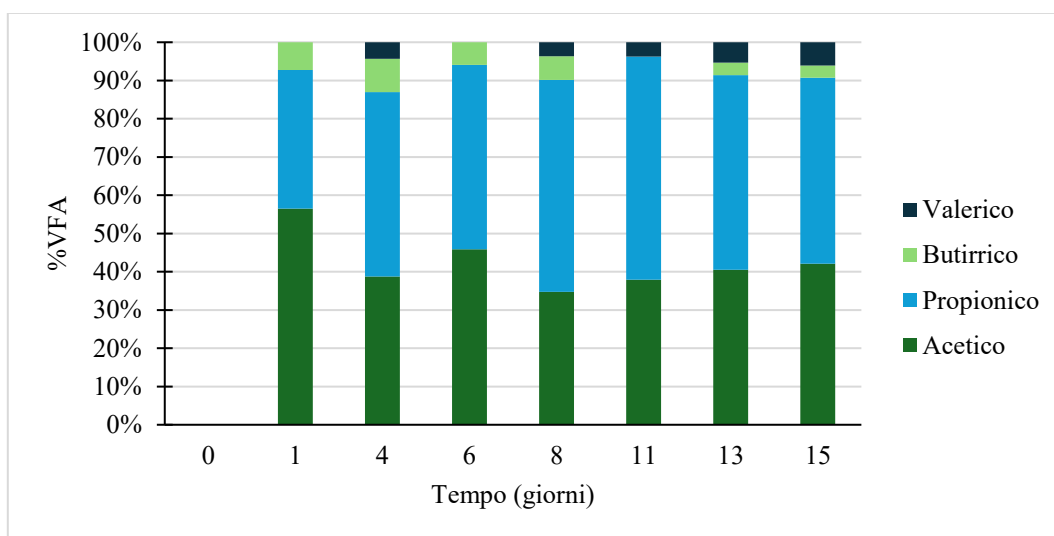


Figura 34: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento della trebbia pretrattata con Reagente Fenton

Il pretrattamento con Reattivo Fenton per la trebbia di birra non sembra essere stato decisivo nell'incrementare la produzione di acidi grassi volatili nel breve periodo. La concentrazione massima ottenuta è stata di 9.65 ± 0.48 gCOD/l al quindicesimo e ultimo giorno di processo (**Fig. 33**). Gli acidi acetico e propionico hanno dominato l'intero processo fermentativo (**Fig. 34**) in rapporti che si sono mantenuti pressoché costanti.

Per gran parte della durata del processo, la fermentazione è stata caratterizzata da una lenta cinetica di bioconversione del substrato mostrando solo al termine della prova un presunto accenno di ripartenza produttiva di VFA. Tuttavia, essendo lo scopo dei pretrattamenti quello di incrementare la produzione di tali acidi grassi volatili nel breve periodo rispetto a quanto è possibile ottenere con il substrato grezzo, non si considera vantaggioso protrarre il test oltre la tempistica definita. Infatti, già nella prima settimana di fermentazione con trebbia grezza è stata ottenuta una concentrazione maggiore di biomolecole (12.94 ± 0.65 gCOD/l al t7) (**Fig. 31**) rispetto a quanto riscontrato durante l'intero processo con trebbia pretrattata con Reagente Fenton (9.65 ± 0.48 gCOD/l al t 15) (**Fig. 33**). Questo risultato indica che il tipo di pretrattamento ed il regime termico adottati nel processo fermentativo non hanno garantito le condizioni ottimali al fine di incrementare la produzione in acidi grassi volatili.

Anche in questo caso (**Fig. 34**), come riportato per il test della trebbia non pretrattata (**Fig. 32**), in presenza di una decisa produzione di acido propionico è comparsa anche un'iniziale e progressiva concentrazione di acido valerico. Sebbene non sia stata indagata la presenza di etanolo o di altre molecole donatrici di elettroni, i risultati ottenuti potrebbero essere stati coerenti con il verificarsi del processo di *Odd chain elongation* in cui, come riportato da Candry et al., (2020), rapporti elevati di acido propionico rispetto ad altri acidi favoriscono il processo di *chain elongation* di molecole con numero dispari di atomi di carbonio e parallelamente viene sorretta la via metabolica tradizionale di produzione di acetato.

4.5.1.4 Fermentazione della trebbia pretrattata in ambiente alcalino in regime mesofilo

I dati riportati nei seguenti grafici (**Fig. 35**, **Fig. 36**) descrivono il processo fermentativo in condizioni termiche mesofile con substrato la trebbia trattata con soluzione alcalina. In questo paragrafo viene discusso il confronto tra il test di fermentazione svolto con trebbia grezza e trebbia pretrattata.

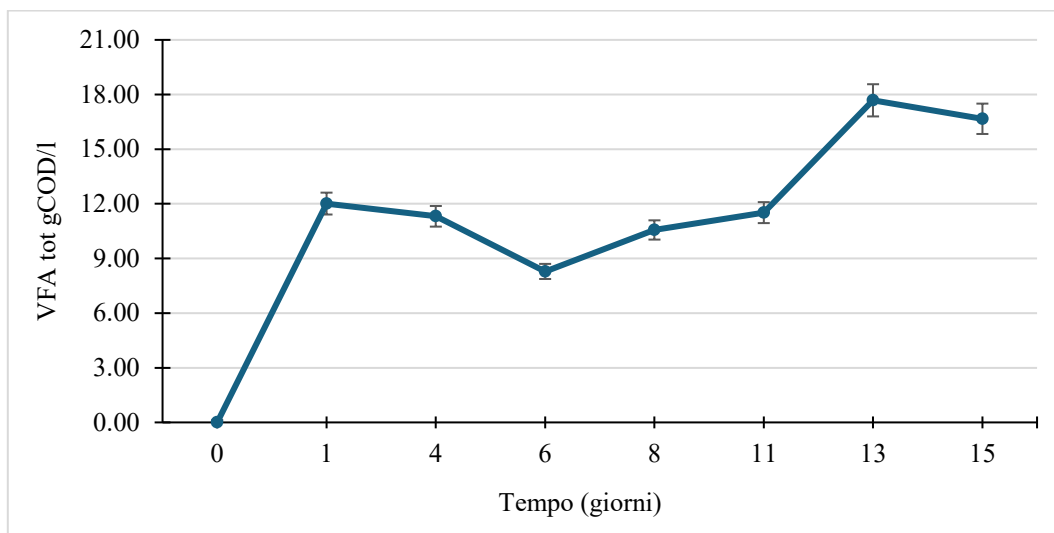


Figura 35: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento della trebbia pretrattata con soluzione alcalina

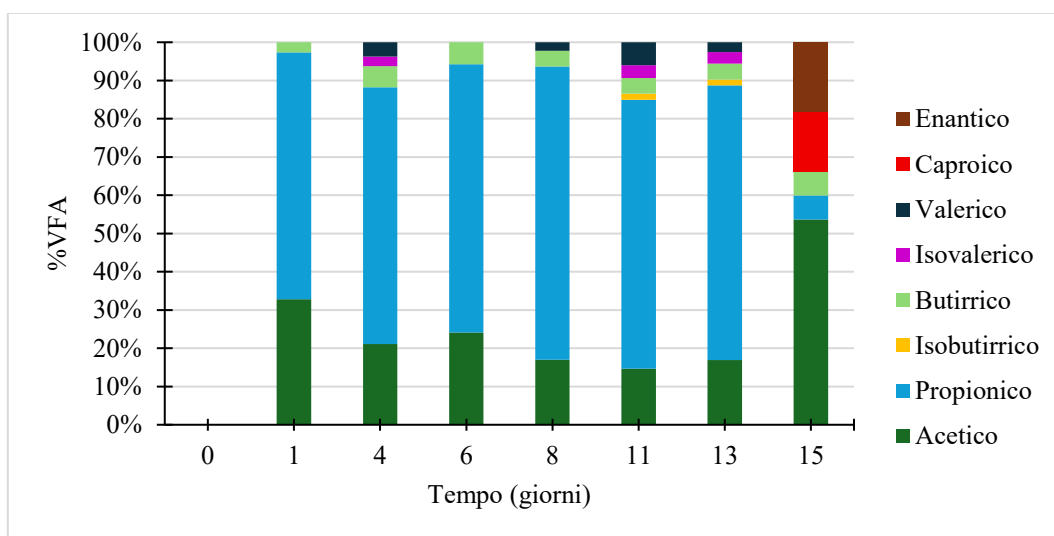


Figura 36: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento della trebbia pretrattata con soluzione alcalina

Il pretrattamento della trebbia in condizioni alcaline ha permesso una proficua produzione di acidi grassi volatili rispetto ai dati ottenuti con trebbia grezza (**Fig. 31** e **Fig. 35**). Infatti, rispetto alla trebbia non pretrattata, in cui la concentrazione massima di 12.94 ± 0.65 gCOD/l è stata ottenuta al settimo giorno di fermentazione (**Fig. 31**), con il trattamento alcalino un risultato simile (12.01 ± 0.60 gCOD/l di cui 70% di acido propionico) è stato raggiunto già dopo 24h dall'inizio del processo denotando una significativa efficienza del pretrattamento nell'incrementare la biodisponibilità e biodegradabilità

del substrato (**Fig. 35**). Anche in questo caso, la prevalenza dell'acido propionico evidenzia come le principali vie metaboliche fermentative siano state orientate verso la produzione di propionato, che ha rappresentato circa il 70% della produzione totale di acidi grassi volatili su base COD. La sintesi di acido propionico su trebbia pretrattata in ambiente alcalino è risultata essere la più elevata tra i test effettuati, con picco di quasi 13.00 gCOD/l ottenuto al tredicesimo giorno di processo (**Fig. 36**). La produzione petrolchimica di acido propionico è di 770 milioni di libbre l'anno (circa 350 milioni di kg/anno) in quanto vanta numerose applicazioni industriali, tra cui la produzione di erbicidi e fungicidi, viene utilizzato come intermedio chimico e come conservante per alimenti, mangimi per animali e cereali. Per tali motivi, è recentemente cresciuta l'attenzione della comunità scientifica per la produzione biologica di questa molecola mediante processi fermentativi da matrici di scarto in quanto processo più ecocompatibile (Bhatia et al., 2017) (Zhou et al., 2018).

Al quindicesimo giorno di fermentazione in condizioni mesofile (**Fig. 36**) è emerso un profilo di acidi grassi volatili che potrebbe essere stato caratteristico dello sviluppo di processi di *chain elongation*. Infatti, in tal contesto l'acido propionico è stato drasticamente consumato a favore di un incremento del 20% sul totale di acido enantico (C7). Inoltre, si è osservata la presenza di acido caproico (circa 15%) e si è assistito, rispetto al campionamento precedente, ad un incremento di acido acetico. La tendenza osservata è in linea con quanto riportato da Han et al., (2018) nel cui lavoro si evidenzia che la produzione di acidi grassi a catena media (MCFA) si attuava dopo dieci giorni di produzione costante e sostenuta di acidi grassi volatili a catena corta (SCFA). Inoltre, come riportato nello studio Liang et al., (2015) aver mantenuto un pH neutro durante il test fermentativo con trebbie di birra potrebbe aver incentivato il processo di allungamento delle catene carboniose.

Pertanto, se l'obiettivo è quello di produrre acidi grassi volatili a catena corta è evidente che protrarre il processo per quindici giorni potrebbe non essere conveniente.

4.5.1.5 Fermentazione della feccia non pretrattata in regime mesofilo

I seguenti grafici (**Fig. 37**, **Fig. 38**) riportano i dati relativi al processo fermentativo sostenuto in condizioni termiche mesofile con substrato la feccia non pretrattata.

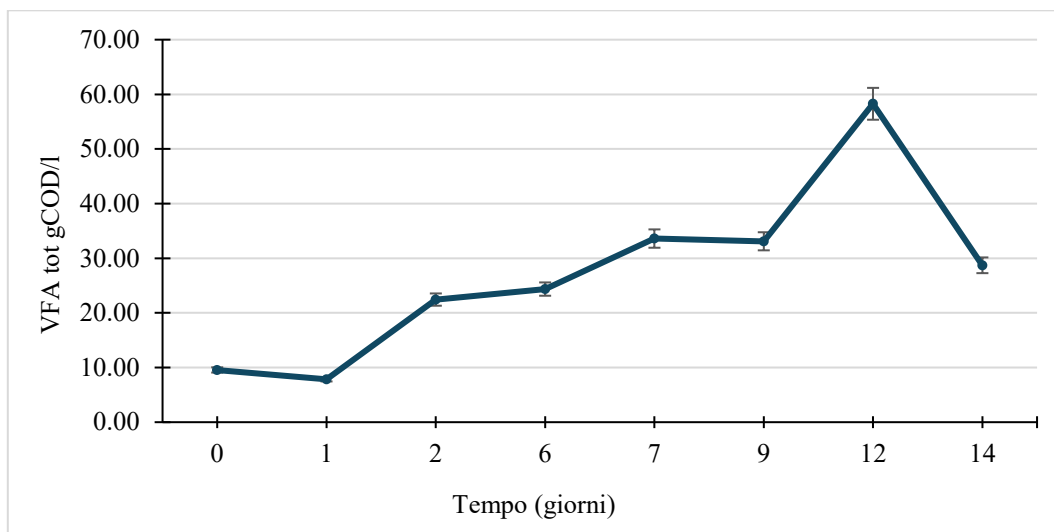


Figura 37: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento della feccia grezza

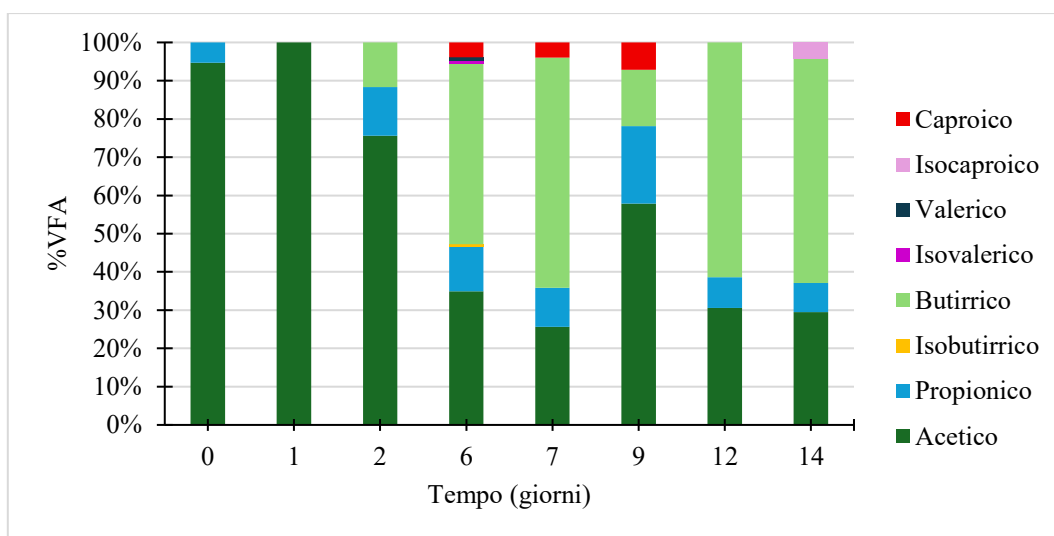


Figura 38: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento della feccia grezza

Al momento di inoculo del reattore, con la feccia di vino come substrato del test fermentativo in questione, è stata rilevata una concentrazione di acidi grassi volatili pari a 9.56 ± 0.48 gCOD/l (**Fig. 37**). La presenza di queste molecole era del tutto attesa in quanto, in accordo con quanto riportato nel lavoro di Caminiti et al., (2025), le fecce sono caratterizzate da un naturale contenuto di acidi grassi volatili essendo questi il prodotto dell'attività microbica fermentativa che è cuore del processo di vinificazione. Nelle prime 48h, il processo risultava dominato dall'acido acetico con una minima produzione di acido propionico e acido butirrico che assieme rappresentavano il 25% del totale (**Fig.38**). Inoltre, la concentrazione totale di acidi grassi volatili (VFA) (**Fig. 37**) è risultata più che

raddoppiata tra il primo e secondo giorno di fermentazione raggiungendo un valore di 22.44 ± 1.12 gCOD/l.

La tendenza osservata, dal sesto giorno di fermentazione, nella distribuzione di acidi grassi volatili potrebbe essere stata coerente con l'instaurarsi di processi di *chain elongation*, come è stato descritto nello studio Lanfranchi et al., (2024). Tale supposizione è stata avvalorata dal fatto che, come è stato riportato nello studio Kucek et al., (2016), le fecce di vino sono un substrato che è caratterizzato da intrinseca, a volte elevata, concentrazione di etanolo. Pertanto, è stato ragionevole supporre almeno una minima presenza anche nelle fecce utilizzate nel presente lavoro, la quale avrebbe potuto giustificare la distribuzione osservata degli acidi grassi volatili (VFA) durante il processo fermentativo. Infatti, in tal contesto, l'acido acetico è stato progressivamente consumato ed è aumentata la concentrazione di acido butirrico (**Fig. 38**). Quest'ultimo ha raggiunto il valore di 20.22 ± 1.01 gCOD/l al settimo giorno di processo, rappresentando circa il 50% del totale e sostituendosi all'acido acetico come componente predominante. Inoltre, pur costituendo una frazione minoritaria, si è osservata la presenza di acido caproico, che è perdurata fino al nono giorno di fermentazione (**Fig. 38**).

Tra il settimo e il nono giorno, la concentrazione totale di acidi grassi volatili (VFA) si è mantenuta pressoché costante, pari a circa 33.00 gCOD/l (**Fig. 37**); tuttavia, si è osservato un riarrangiamento della composizione relativa dei diversi composti, con l'acido acetico che è ritornato a rappresentare la frazione predominante, superiore al 50% del totale su base COD (**Fig. 38**). Successivamente a questo plateau produttivo è stata raggiunta, al dodicesimo giorno, la concentrazione massima di VFA pari a 58.25 ± 2.91 gCOD/L, costituita principalmente da acido butirrico (55%) e acido acetico (30%), con una frazione minore di acido propionico (15%) (**Fig. 37, Fig. 38**).

Infine, al quattordicesimo e ultimo giorno di fermentazione, le proporzioni tra i componenti si sono mantenute sostanzialmente stabili ma è stata registrata una marcata diminuzione della concentrazione totale verosimilmente associata alla ridotta disponibilità di nuovo substrato per il metabolismo microbico.

4.5.1.6 Fermentazione della feccia pretrattata con Reagente Fenton in regime mesofilo

I dati riportati nei seguenti grafici (**Fig. 39**, **Fig. 40**) descrivono il processo fermentativo svolto in condizioni mesofile con substrato la feccia pretrattata con Reagente Fenton. In questo paragrafo viene discusso il confronto tra le prove di fermentazione effettuate con feccia grezza e feccia pretrattata.

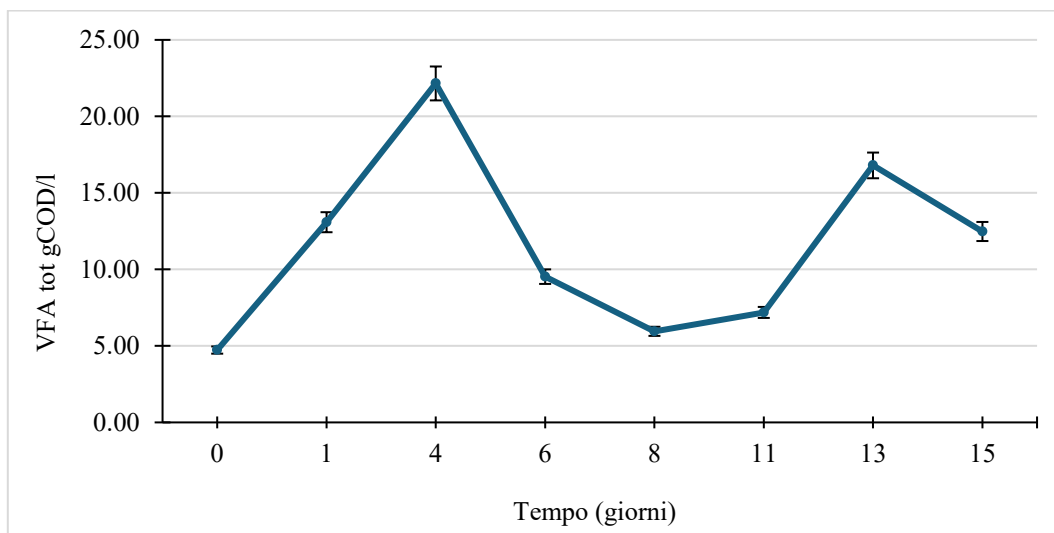


Figura 39: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento della feccia pretrattata con Reagente Fenton

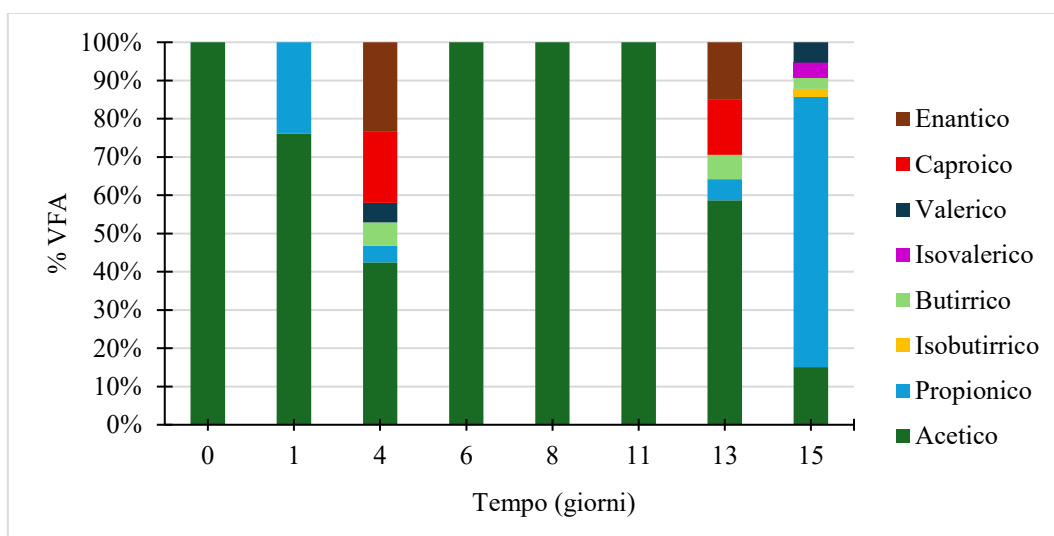


Figura 40: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento della feccia pretrattata con Reagente Fenton

Il profilo produttivo di VFA del processo fermentativo, avente come substrato la feccia pretrattata con Reagente Fenton (**Fig. 40**), è risultato particolarmente complesso. La distribuzione iniziale di VFA è risultata comparabile a quanto osservato nel test con feccia grezza in cui il processo, in un primo momento, è stato caratterizzato da solo acido acetico e successivamente dalla produzione di una minima concentrazione di acido propionico (**Fig. 38**, **Fig. 40**). Tuttavia, superato il primo giorno di fermentazione, nel test con feccia pretrattata è stata raggiunta la concentrazione di 13.08 ± 0.65

gCOD/l di acidi grassi volatili totali (**Fig. 39**). Tale valore è risultato essere quasi raddoppiato rispetto a quanto ottenuto dalla fermentazione con feccia grezza (7.84 ± 0.39 gCOD/l **Fig. 37**) nel medesimo arco di tempo, evidenziando una biodegradabilità più rapida del substrato pretrattato rispetto al non trattato.

Al quarto giorno, il brodo di reazione risultava costituito da una peculiare distribuzione di acidi grassi volatili in quanto, circa il 45% su base COD, era rappresentato da acidi grassi a catena media (MCFA) (**Fig. 40**). È possibile che, tra le diverse vie metaboliche instauratesi nell' ambiente di reazione, si siano verificati anche processi di allungamento delle catene carboniose sia su acidi grassi a numero pari di atomi di carbonio, con produzione di acido caproico, sia su acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio, con produzione di acido valerico ed acido eptanoico (**Fig. 40**). Il fatto che si sia formato circa un 20% di acido eptanoico è risultato peculiare in quanto, come citato nello studio Kucek et al., (2016), tendenzialmente le rese produttive di MCFA a catena dispari, quindi a partire dall'acido propionico, sono più basse rispetto alla produzione di MCFA a catena pari. Inoltre, in tal contesto, è stata registrata la massima produzione di VFA, con valore pari a 22.15 ± 1.10 gCOD/l, che è risultato in linea con quanto riportato dal medesimo campionamento del brodo di fermentazione della feccia grezza (**Fig. 37, Fig. 39**).

Tra il sesto e l'undicesimo giorno è stata registrata una decrescita della concentrazione di VFA totali, in cui l'acido acetico è tornato esclusivamente a dominare l'ambiente di reazione (**Fig. 40**). Tuttavia, la concentrazione di tale molecola si è dimostrata avere un andamento altalenante, caratterizzata dapprima dalla riduzione di circa 4.00 gCOD/l (da 9.53 ± 0.48 gCOD/l a 5.95 ± 0.30 gCOD/l), e da un successivo incremento fino al valore di 7.19 ± 0.36 gCOD/l analizzato all'undicesimo giorno (**Fig. 40**).

Il processo è proseguito riportando un ulteriore aumento di acidi grassi volatili totali (VFA), la cui concentrazione è risultata raddoppiata in corrispondenza del tredicesimo giorno di fermentazione rispetto al campionamento precedente, raggiungendo il valore di 16.88 ± 0.84 gCOD/l (**Fig. 39**). In tal contesto, si è assistito alla "ripartenza" di processi metabolici che hanno instaurato, nel brodo di reazione, un nuovo assetto di VFA in cui l'acido acetico è stato progressivamente consumato. Contestualmente si è verificata la produzione di acidi grassi a catena media come l'acido caproico e l'acido eptanoico, con incidenza del 30% sul totale, al tredicesimo giorno di processo fermentativo (**Fig. 40**).

All'ultimo giorno di fermentazione la concentrazione totale di acidi grassi volatili (VFA) si è ridotta a 12.48 ± 0.62 gCOD/l ed è comparsa una cospicua concentrazione di acido propionico, rappresentando il 70% della totalità dei VFA prodotti (**Fig. 39, Fig. 40**). È probabile che la decrescita

verificatasi tra il sesto ed undicesimo giorno, abbia costituito uno spartiacque che ha caratterizzato il processo fermentativo ed ha avuto come esito il riarrangiamento della comunità microbica e l'attivazione di vie metaboliche diverse. In questo caso, valutando la produzione di acidi grassi totali al quarto giorno di fermentazione, è possibile constatare che il pretrattamento con Reagente Fenton non è stato significativo nell'incrementare le cinetiche di bioconversione del substrato, in quanto un risultato analogo è stato ottenuto, a pari durata di processo, con feccia non trattata.

4.5.1.7 Fermentazione della feccia pretrattata in ambiente alcalino in regime mesofilo

I seguenti grafici (**Fig. 41**, **Fig. 42**) riportano i dati relativi al processo fermentativo con substrato la feccia pretrattata con soluzione alcalina. In questo paragrafo viene discusso il confronto tra i test di fermentazione svolti con matrice grezza e pretrattata.

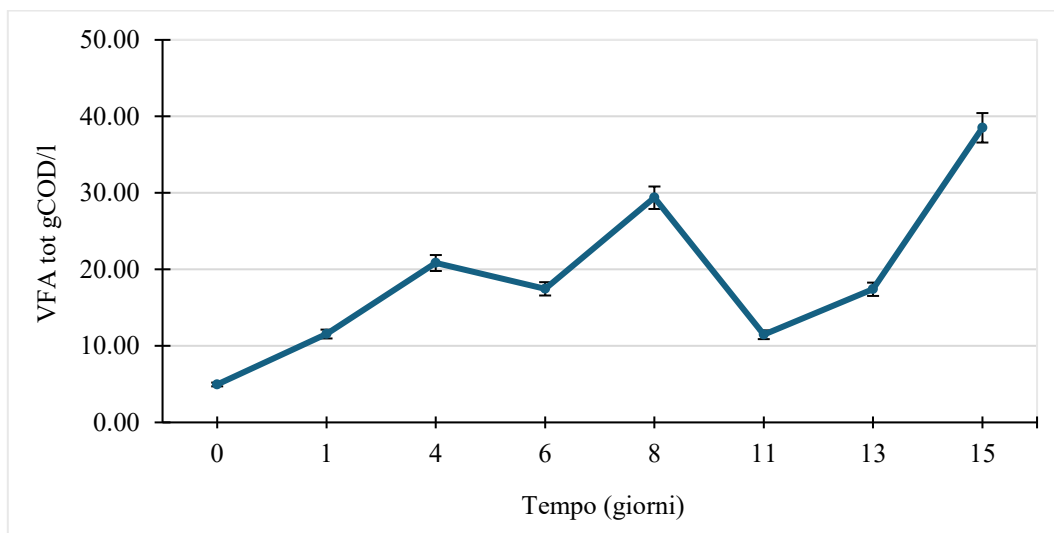


Figura 41: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento della feccia pretrattata con soluzione alcalina

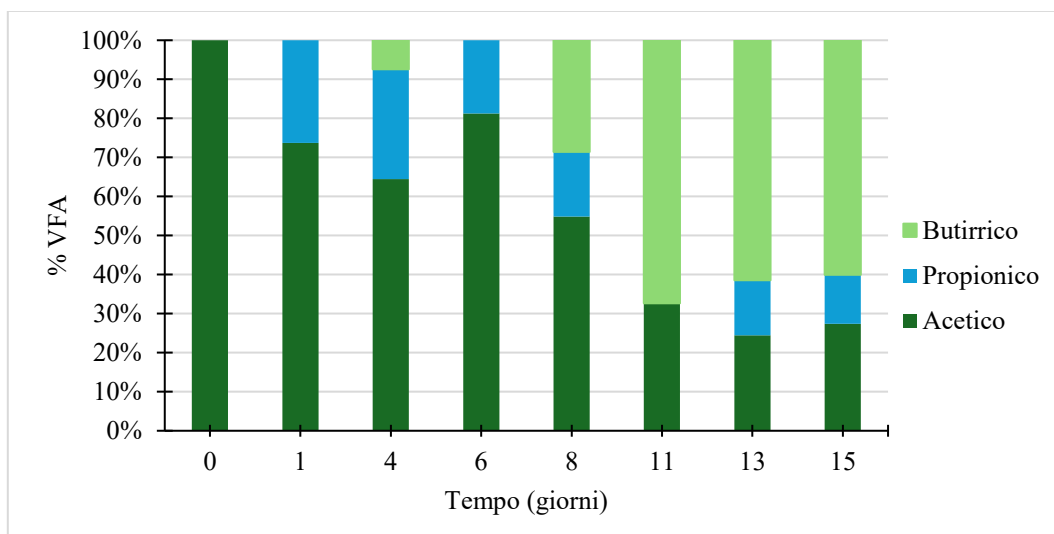


Figura 42: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento della feccia pretrattata con soluzione alcalina

Qualitativamente, la situazione iniziale del test con feccia pretrattata in ambiente alcalino (**Fig. 42**) non è risultata dissimile rispetto a quanto era emerso nella prova con substrato grezzo (**Fig.38**). Infatti, al momento dell'inoculo (t_0), entrambi gli ambienti di reazione sono stati caratterizzati dall'acido acetico ma la concentrazione totale di VFA, nel test con feccia pretrattata, è risultata più bassa di circa 5.00 gCOD/l rispetto a quanto era stato osservato nella prova con matrice non trattata (**Fig. 37**, **Fig 41**). Le cinetiche di produzione di acidi grassi volatili (**Fig. 41**) sono risultate rallentate, nel test con

feccia pretrattata, rispetto all'utilizzo del substrato grezzo in cui la concentrazione di circa 20.00 gCOD/l era già stata raggiunta al secondo giorno di fermentazione (**Fig. 37**); nel reattore con matrice pretrattata, invece, tale dato è stato osservato al quarto giorno di processo (**Fig. 41**). Tuttavia, nella prova in questione (**Fig. 41**), è risultata più marcata la produzione di acido propionico che, nella prima settimana, mediamente ha ricoperto il 20% su base COD del totale di acidi grassi volatili prodotti.

All'ottavo giorno, il processo fermentativo ha manifestato un incremento produttivo di VFA di circa 12.00 gCOD/l (**Fig. 41**), passando da una concentrazione di 17.46 ± 0.87 gCOD/l a 29.37 ± 1.47 gCOD/l, ed il processo è risultato caratterizzato dal consumo di acido acetico e dalla produzione di acido butirrico (**Fig. 42**). Tale tendenza si è protratta anche all'undicesimo giorno, dove i due acidi risultavano in proporzione al 30% di acetico e 70% di butirrico ma contestualmente si è assistito ad un dimezzamento della concentrazione totale osservata (**Fig. 41, Fig. 42**).

Dall'undicesimo al quindicesimo e ultimo giorno di fermentazione con feccia pretratta si è verificata una ripresa produttiva di VFA, con la ricomparsa dell'acido propionico, in cui le proporzioni tra acido acetico, acido butirrico e acido propionico si sono mantenute praticamente costanti fino alla fine del processo. Nell'ultimo giorno della prova fermentativa, è stata registrata la concentrazione più elevata di VFA, pari a 38.51 ± 1.96 gCOD/l, che ha rappresentato un incremento di circa 22.00 gCOD/l avvenuto tra gli ultimi due campionamenti del brodo di reazione (**Fig. 41**). Il medesimo picco produttivo era però emerso con più anticipo, già al settimo giorno, nel processo con feccia grezza (**Fig. 37**) seppur caratterizzato da un simile rapporto di acidi grassi volatili (**Fig. 38**).

Tuttavia, nel complesso, il processo avente come substrato la feccia di vino pretrattata ha evidenziato una peculiare tendenza fermentativa, contraddistinta da un profilo oscillatorio della concentrazione totale di acidi grassi volatili (**Fig. 41**).

4.5.2 Fermentazione acidogenica in regime termico termofilo

I dati riguardanti le prove di fermentazione in regime termofilo di trebbia di birra e feccia di vino (per entrambi i substrati sono stati valutati il test con materiale grezzo, pretrattato alcalino e pretrattato Fenton) sono stati ottenuti mantenendo il processo in regime termofilo (55°C) e con durata del test di due settimane.

La produzione di acidi grassi volatili è stata corretta al netto di quella dell'inoculo (bianco)

4.5.2.1 Controllo in bianco in regime termofilo

I dati descritti dai seguenti grafici (**Fig. 43**, **Fig. 44**) riguardano i processi svolti dall'inoculo senza aggiunta di substrato in condizioni termiche termofile. Nel presente paragrafo viene discusso il confronto tra condizioni reattoristiche mesofile e termofile.

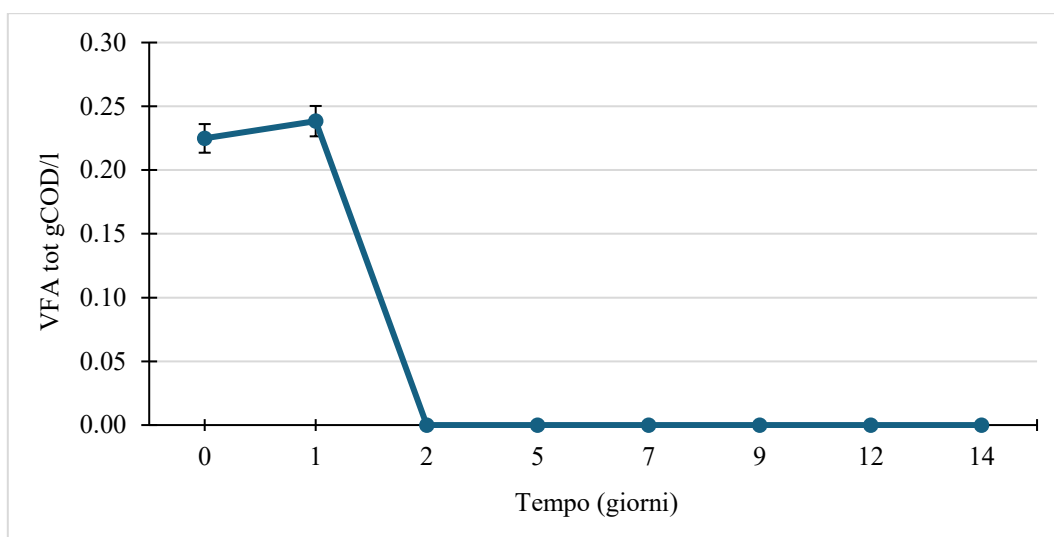


Figura 43: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento del bianco

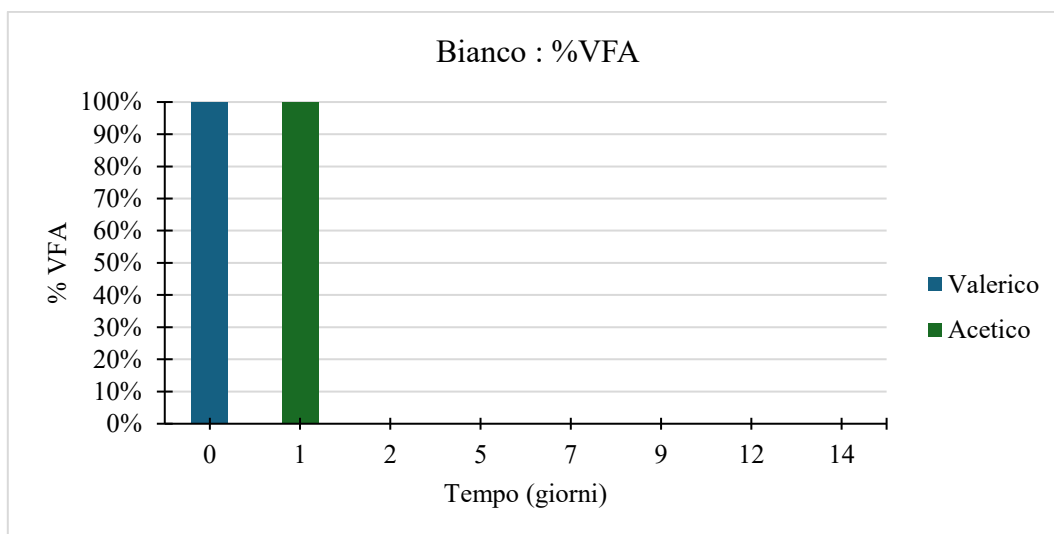


Figura 44: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento del bianco

I dati riportati in **Fig. 43** e **Fig. 44** rappresentano, come per il medesimo test svolto in regime termico mesofilo, il lavoro in “endogeno” della comunità microbica utilizzata come inoculo nei test fermentativi. Non essendo stato aggiunto substrato esogeno, i microrganismi hanno degradato la scarsa quantità di materiale organico presente per poi arrestare, già al secondo giorno di processo, l’attività metabolica. Al momento dell’inoculo del reattore era presente una concentrazione di appena 0.22 ± 0.01 gCOD/l di acido valerico che è stata prontamente consumata per produrre acido acetico (0.24 ± 0.01 gCOD/l) nelle prime 24h di fermentazione (**Fig. 43**). Confrontando le composizioni dei brodi di reazione, tra condizioni mesofile (**Fig. 29, Fig. 30**) e termofile (**Fig. 43, Fig. 44**), è stato possibile constatare che il consumo degli acidi grassi volatili (VFA) sia stato molto più rapido a temperature elevate. Tale risultato può essere attribuito all’effetto della temperatura sul processo fermentativo, poiché a temperature più elevate possono verificarsi cinetiche microbiche più rapide e, di conseguenza, un consumo più veloce degli acidi grassi volatili disponibili.

4.5.2.2 Fermentazione della trebbia non pretrattata in regime termofilo

I dati riportati nei grafici (**Fig. 45**, **Fig. 46**) descrivono il processo fermentativo in condizioni termiche termofile con substrato la trebbia di birra grezza. Nel presente paragrafo viene discusso il confronto tra il medesimo processo svolto in regime termico mesofilo e termofilo.

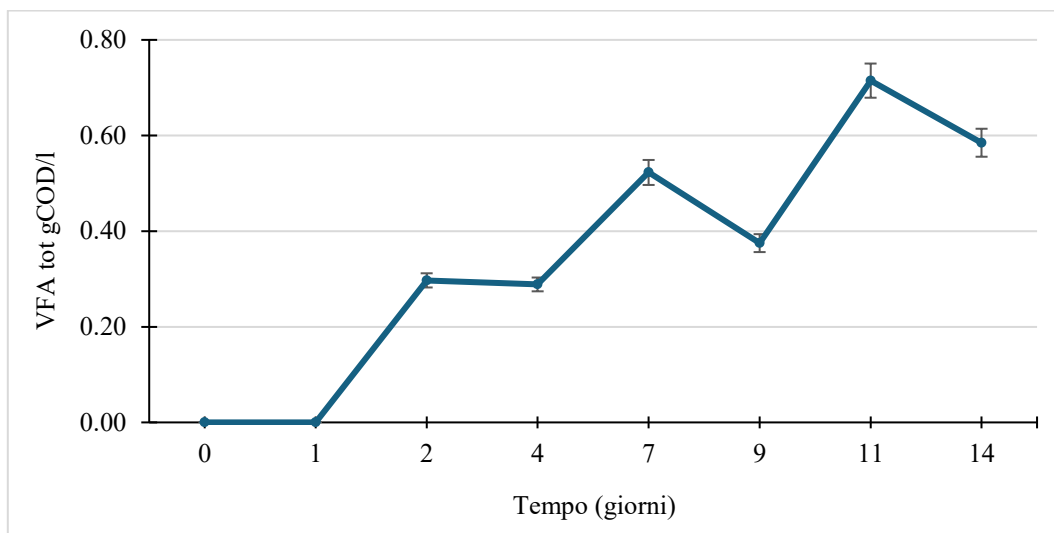


Figura 45: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento della trebbia grezza

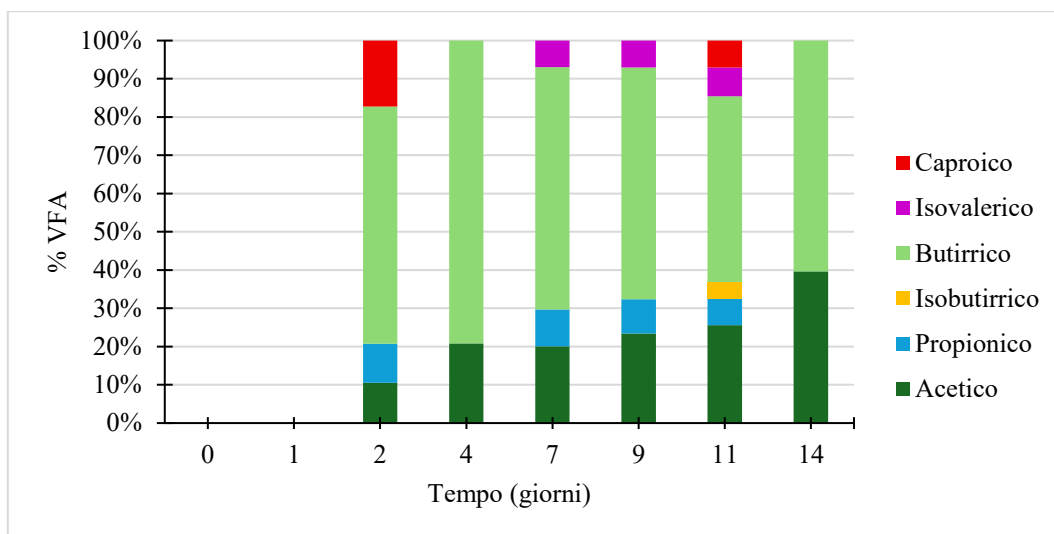


Figura 46: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento della trebbia grezza

Nel complesso, la quantità di acidi grassi volatili totali prodotta è stata marginale e la concentrazione più elevata è stata rilevata all'undicesimo giorno di fermentazione con valore di 0.71 gCOD/l (**Fig. 45**). Inoltre, la produzione di VFA ha avuto inizio dopo 48h dall'inizio del test evidenziando la presenza di un *lag time*. Il profilo di VFA si è mantenuto abbastanza costante per l'intera durata del processo, risultando caratterizzato prevalentemente dalla presenza dominante dell'acido butirrico ed in quantità minoritaria dall'acido acetico (**Fig. 46**). La quantità di acidi grassi volatili prodotti è risultata nettamente inferiore a quanto osservato, con il medesimo substrato, in regime termico

mesofilo; in quest'ultimo, infatti, già nelle prime 24h di processo era stata riscontrata una concentrazione totale di 5.40 ± 0.27 gCOD/l, raggiungendo al settimo giorno il valore massimo di 12.94 ± 0.65 gCOD/l (**Fig. 31**).

Pertanto, è possibile dedurre che le condizioni termiche adottate (55°C) non siano state ottimali nel supportare lo sviluppo fermentativo acidogenico con trebbia grezza il quale, invece, è risultato maggiormente favorito da un regime termico mesofilo (37°C).

4.5.2.3 Fermentazione della trebbia pretrattata con Reagente Fenton in regime termofilo

I seguenti grafici (**Fig. 47**, **Fig. 48**) riportano i dati relativi al processo fermentativo con substrato la trebbia pretrattata con Reagente Fenton. Nel presente paragrafo, viene discusso il confronto tra le prove svolte con trebbia grezza, con trebbia pretrattata e con il medesimo test svolto in regime mesofilo.

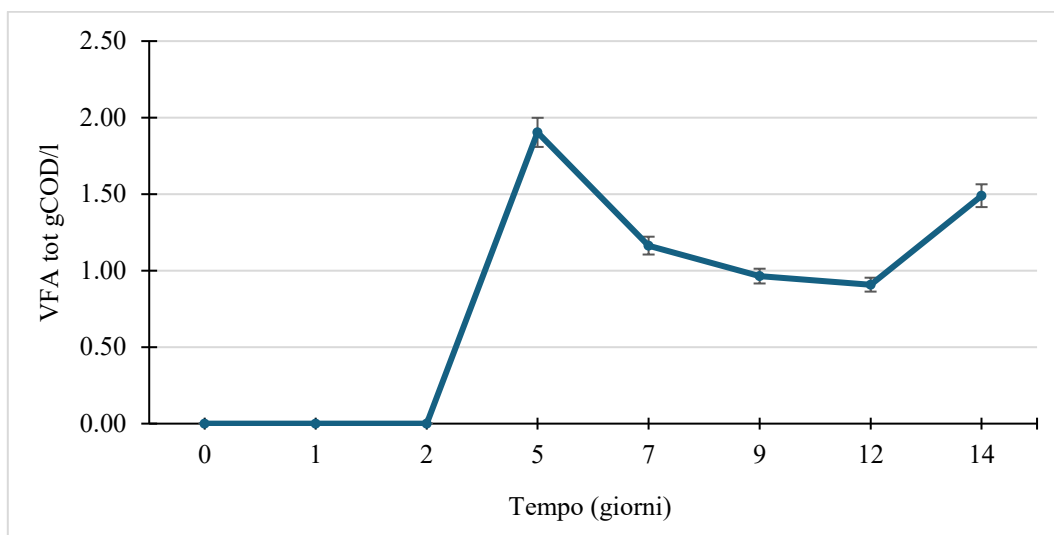


Figura 47: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento della trebbia pretrattata con Reagente Fenton

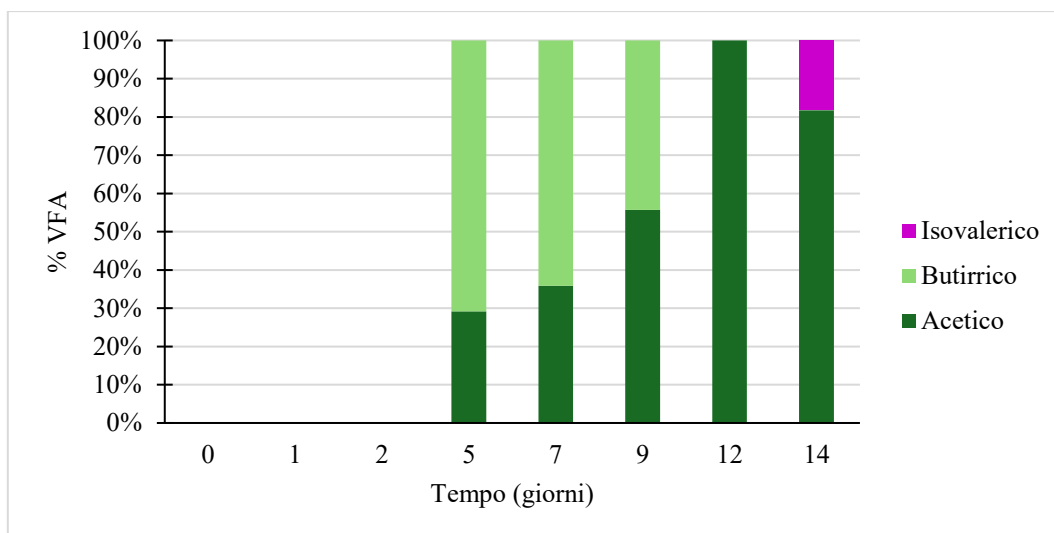


Figura 48: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento della trebbia pretrattata con Reagente Fenton

La fermentazione con trebbia pretrattata con Reagente Fenton ha riportato un *lag time* prolungato in cui la produzione di VFA è stata rilevata solo al quarto campionamento del brodo di reazione (t5) (**Fig. 48**). Inoltre, in tal contesto, è stata registrata la concentrazione massima di VFA prodotta pari a 1.90 ± 0.09 gCOD/l (**Fig. 47**) caratterizzata principalmente da acido butirrico (70%) ed in minima parte da acido acetico (30%).

Durante la seconda settimana di processo fermentativo, si è assistito ad una graduale riduzione del contenuto totale degli acidi grassi volatili, l'acido butirrico è stato sostituito dall'acido acetico che ha cominciato a dominare l'ambiente di reazione, a partire dal dodicesimo giorno, con una concentrazione di 0.91 ± 0.02 gCOD/l (**Fig. 48**).

Nell'ultimo campionamento, si è verificato un incremento della concentrazione di acidi grassi volatili totali rispetto alle analisi precedenti, caratterizzato dalla produzione, seppur minima, di acido isovalerico (20% sul totale), fenomeno che ha probabilmente presupposto l'avvio di nuovi processi metabolici (**Fig. 48**).

Nel complesso, il processo è risultato dominato da lente cinetiche di bioconversione del substrato. Anche in regime mesofilo (37°C), nel complesso, era stata constatata una certa "lentezza fermentativa" ma la produttività già dalle prime ore di processo era risultata maggiore, raggiungendo la concentrazione di 2.78 ± 0.14 gCOD/l di acidi grassi totali (VFA) (**Fig. 33**).

Inoltre, dato che la concentrazione massima di VFA (1.90 ± 0.09 gCOD/l) è stata registrata solo al quinto giorno di fermentazione non è ragionevole considerare che, in condizioni termofile, il pretrattamento della trebbia con Reattivo Fenton abbia apportato un significativo incremento produttivo rispetto al substrato grezzo (**Fig. 47**, **Fig. 45**). Essendo che, il *lag time* iniziale è risultato più prolungato, rispetto al test con substrato non pretrattato, è ragionevole constatare che le condizioni di reazione non siano state ottimali per bioconvertire la trebbia di birra in acidi grassi volatili.

4.5.2.4 Fermentazione della trebbia pretrattata in ambiente alcalino in regime termofilo

I dati riportati nei seguenti grafici (**Fig. 49**, **Fig. 50**) descrivono il processo fermentativo in condizioni termofile con substrato la trebbia pretrattata con soluzione alcalina. Nel presente paragrafo viene discusso il confronto tra le prove di fermentazione svolte con trebbia grezza, con trebbia pretrattata e con il medesimo test effettuato in regime termico mesofilo.

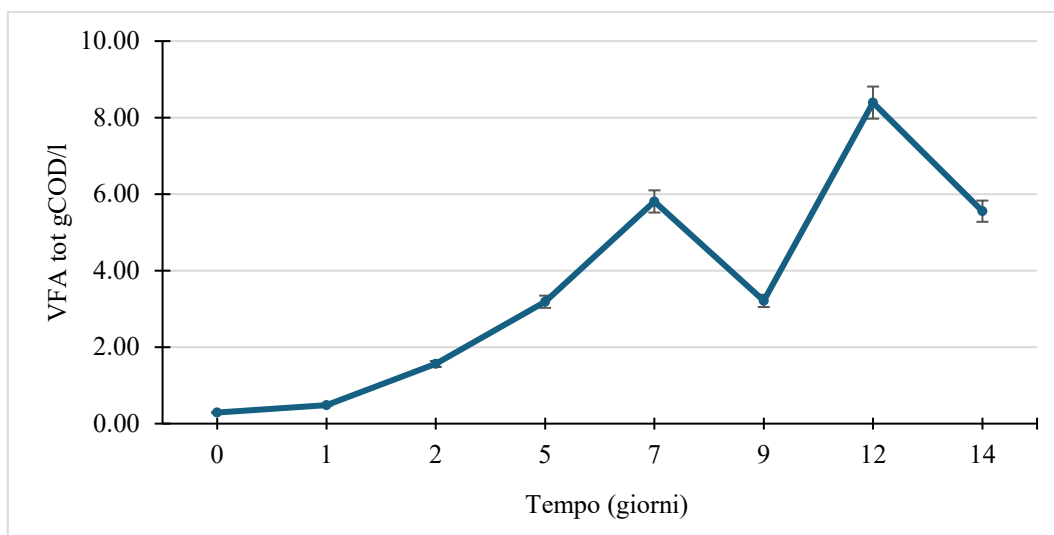


Figura 49: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento della trebbia pretrattata con soluzione alcalina

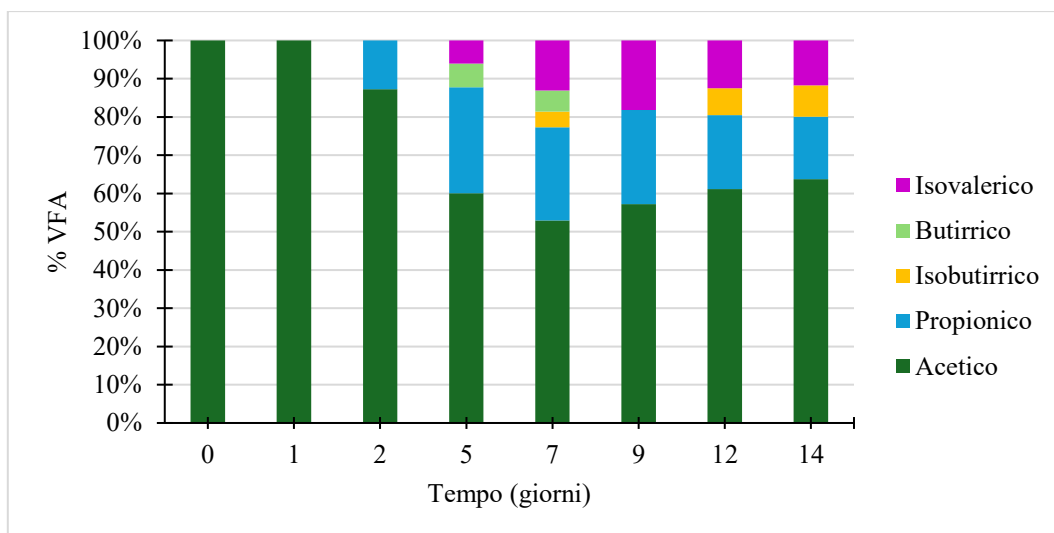


Figura 50: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento della trebbia pretrattata con soluzione alcalina

Il profilo di VFA (**Fig. 50**) ottenuto dal test con substrato la trebbia pretrattata con soluzione alcalina, è risultato dominato dall'acido acetico contrariamente a quanto osservato nel test su trebbia grezza (**Fig. 46**). Durante i primi giorni di fermentazione è stata osservata una lenta produzione di acidi grassi volatili; tuttavia, a differenza di quanto riscontrato in altri test, non è stata evidenziata una marcata fase di latenza iniziale. Già al secondo giorno di processo, infatti, la concentrazione totale di VFA

risultava pari a 1.56 ± 0.08 gCOD/l (**Fig. 49**), valore superiore rispetto a quello massimo osservato nella prova condotta con trebbia non trattata (**Fig. 45**).

Nella prima settimana di processo fermentativo si è assistito ad un graduale consumo di acido acetico che è stato sostituito inizialmente dall'acido propionico e successivamente anche dall'acido butirrico ed isovalerico. Infatti, al quinto campionamento (t7) del brodo di reazione, il reattore era caratterizzato principalmente da 50% di acido acetico, 25% di acido propionico, 15% di acido isovalerico e la restante parte minoritaria da acido butirrico ed isobutirrico (**Fig. 50**), con una concentrazione totale di 5.81 ± 0.29 gCOD/l (**Fig. 49**).

Tuttavia, nel campionamento successivo (t9) si è verificato il consumo di acidi grassi volatili e la concentrazione è stata ridotta a 3.21 ± 0.16 gCOD/l. A questo evento, è susseguito un ulteriore incremento fino al valore massimo ottenuto, al dodicesimo giorno, pari a 8.39 ± 0.42 gCOD/l (**Fig. 49**).

Nell'ultimo periodo di fermentazione (t12 e t14) il profilo degli acidi grassi volatili si è mantenuto abbastanza costante caratterizzato da acido acetico (60%), acido propionico (20%), acido valerico (10%) e acido isobutirrico (10%) (**Fig. 50**). Tuttavia, nell'ultimo giorno di processo la concentrazione è tornata ad un valore di 5.55 gCOD/l evidenziando una tendenza al consumo di VFA prodotti (**Fig. 49**).

È evidente che rispetto alla prova con trebbia grezza, in cui la quantità massima di VFA ottenuta è stata di 0.71 ± 0.04 gCOD/l osservata all'undicesimo giorno di processo (**Fig. 45**), il pretrattamento con soluzione alcalina abbia incrementato la solubilità e la biodisponibilità della trebbia ottimizzando la produzione di acidi grassi volatili. Nonostante ciò, il processo con substrato pretrattato condotto ad elevate temperature (55°C), ha evidenziato lente cinetiche di bioconversione riportando un massimo di produzione pari a 8.39 ± 0.42 gCOD/l raggiunto al dodicesimo giorno (**Fig. 49**), che è risultato quantitativamente inferiore rispetto a quanto ottenuto nel corrispondente test in regime mesofilo (**Fig. 35**); in tal contesto, già dopo poche ore dall'avvio del reattore (t1) la concentrazione osservata di acidi grassi volatili totali è stata pari a 12.01 ± 0.60 gCOD/l (**Fig. 35**). Inoltre, il profilo di VFA ottenuto con il medesimo trattamento in regime mesofilo (**Fig. 36**) è risultato peculiare e più promettente, in termini di quantità di acido propionico prodotto, rispetto a quanto riscontrato nel regime termico termofilo (**Fig. 50**).

4.5.2.5 Fermentazione della feccia non pretrattata in regime termofilo

I seguenti grafici (**Fig. 51**, **Fig. 52**) riportano i dati relativi al processo fermentativo in condizioni termofile con substrato la feccia non pretrattata. Nel presente paragrafo viene descritto il confronto tra i test fermentativi svolti con feccia grezza in regime termofilo e mesofilo.

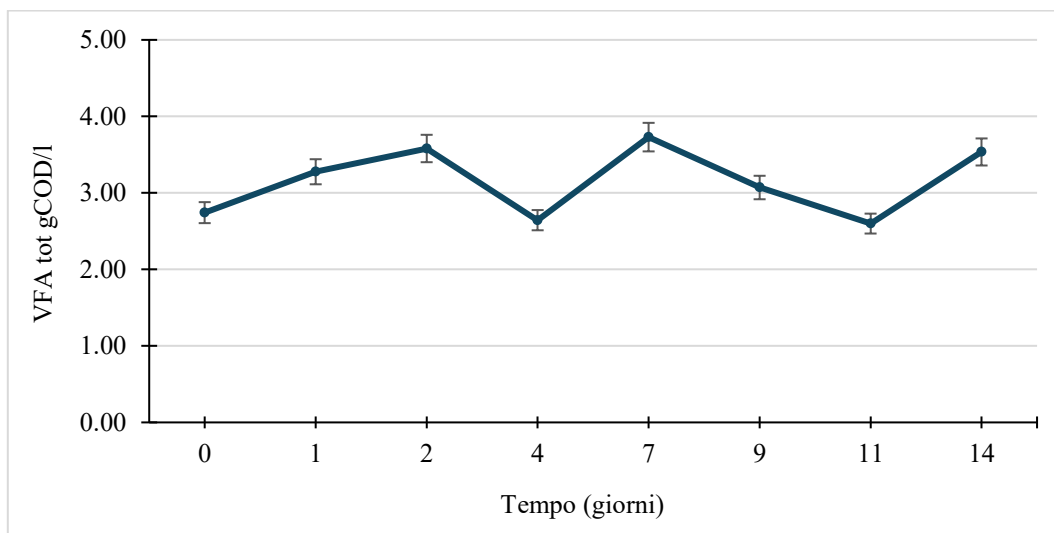


Figura 51: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento della feccia grezza

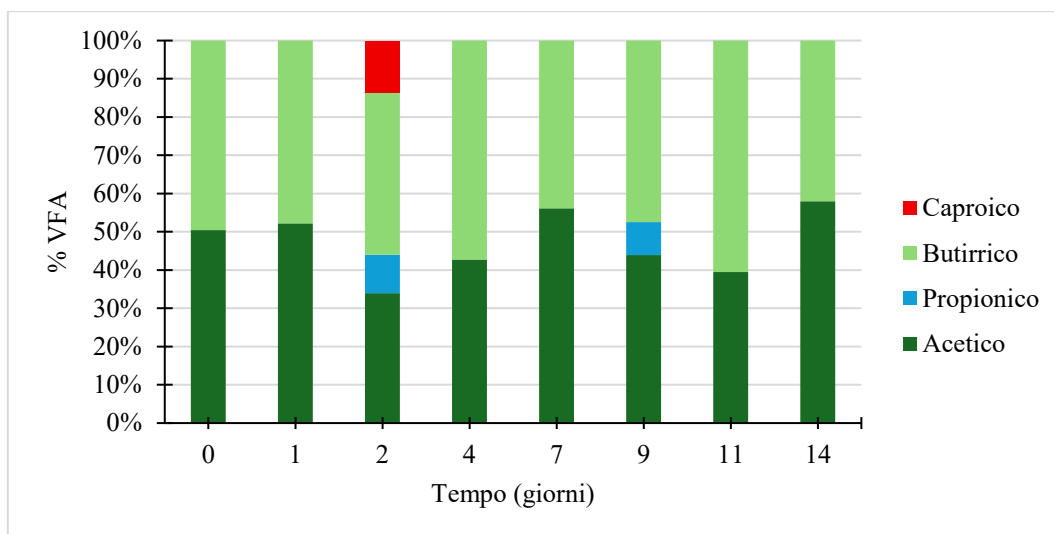


Figura 52: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento della feccia grezza

La composizione di VFA del processo fermentativo svolto in regime termofilo con feccia grezza (**Fig. 52**) è risultata analoga a quanto osservato nel corrispondente test condotto condizioni mesofile (**Fig. 38**). In entrambi i casi il profilo è stato dominato dall'acido acetico e dall'acido butirrico e, nel regime termofilo, sono risultati in un rapporto pressoché costante (circa 1:1). Tuttavia, nel complesso, la concentrazione di acidi grassi volatili totali si è mantenuta abbastanza costante confermando una scarsa attività metabolica nel reattore. Infatti, il massimo contenuto di VFA, pari a 3.73 ± 0.18 gCOD/l, è stato analizzato al settimo giorno di campionamento del brodo di fermentazione

evidenziando un incremento della concentrazione di solo 0.99 ± 0.05 gCOD/l rispetto al dato analizzato al momento dell'inoculo (2.74 ± 0.14 gCOD/l al t_0) (**Fig. 51**).

Considerando che, nel medesimo arco di tempo, il test svolto in condizioni mesofile con feccia grezza presentava già una produzione di acidi grassi volatili pari a 33.60 ± 1.68 gCOD/l e che la concentrazione massima raggiunta è stata di 58.27 ± 2.91 gCOD/l (**Fig. 37**), è risultato evidente che le temperature più elevate non sono state ottimali per favorire il processo fermentativo della matrice non pretrattata.

4.5.2.6 Fermentazione della feccia pretrattata con Reagente Fenton in regime termofilo

I dati riportati nei seguenti grafici (**Fig. 53**, **Fig. 54**) descrivono il processo fermentativo in condizioni termofile con substrato la feccia pretrattata con Reagente Fenton. Nel presente paragrafo viene discusso il confronto tra la prova di fermentazione svolta con feccia grezza, con feccia pretrattata e con il medesimo test effettuato in regime termico mesofilo.

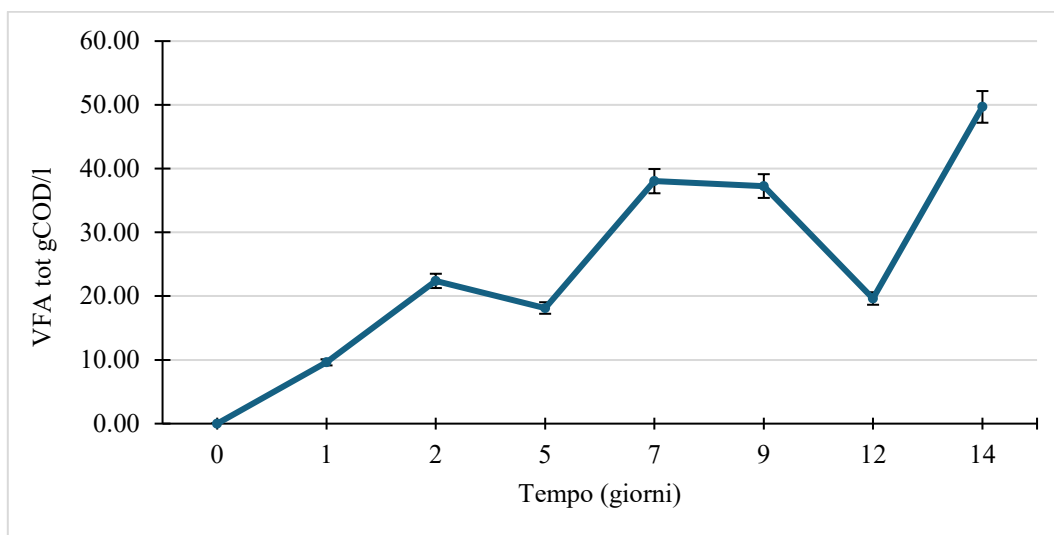


Figura 53: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento della feccia pretrattata con Reagente Fenton

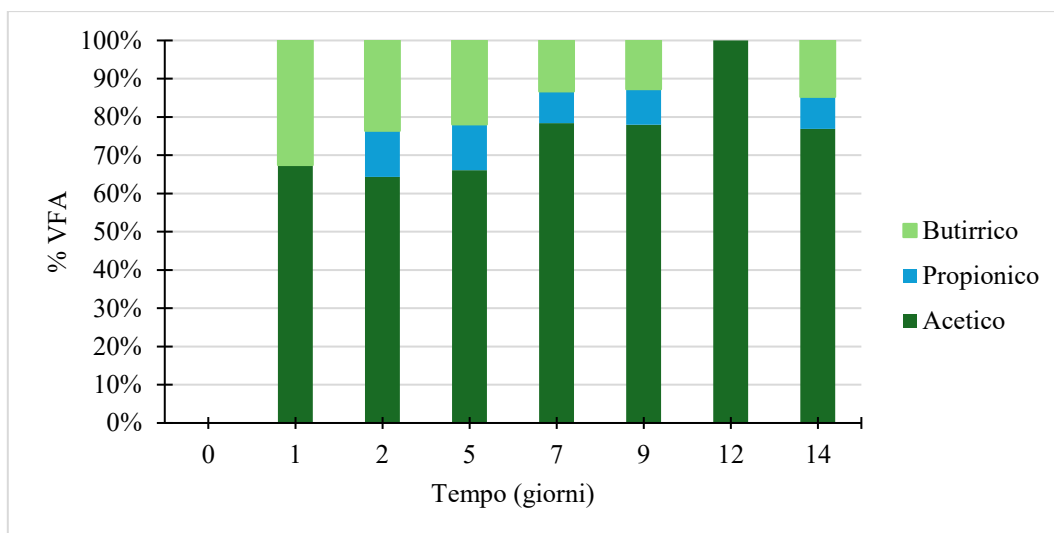


Figura 54: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento della feccia pretrattata con Reagente Fenton

Nel processo fermentativo in regime termofilo della feccia di vino pretrattata con Reagente Fenton, la produzione di acidi grassi volatili (VFA) è iniziata dopo 24h dall'inoculo del reattore (**Fig. 53**). Nel complesso, il profilo è risultato dominato dall'acido acetico, che ha mantenuto una proporzione sul totale di circa il 70% - 80%, ed in parti minoritarie da acido butirrico e acido propionico (**Fig. 54**).

Già nei primi giorni di processo è stata evidenziata una produzione più elevata di VFA rispetto a quanto è stato riscontrato nel test con substrato non pretrattato (**Fig. 51**), raggiungendo una concentrazione di 22.39 ± 1.12 gCOD/l dopo 48 ore dall'avvio del reattore (**Fig. 53**). Inoltre, un risultato simile, pari a 22.15 ± 1.11 gCOD/l, era stato raggiunto solo al quarto giorno di processo nel medesimo test effettuato in regime mesofilo (**Fig. 39**), il quale rappresentava la massima concentrazione di VFA ottenuta. Tali evidenze hanno dimostrato che temperature maggiori (55°C) siano state più efficaci nell'incrementare la produzione di acidi grassi volatili nel breve periodo. Infatti, in tal contesto, tra settimo e nono giorno di fermentazione la concentrazione totale di VFA si è assestata ad un valore di circa 38.00 gCOD/l (**Fig. 53**), dato che è risultato maggiore di oltre sei volte il valore ottenuto, nel medesimo arco di tempo, nel processo in condizioni mesofile con feccia pretrattata (5.95 ± 0.30 gCOD/l al t8) (**Fig. 39**). Tuttavia, la concentrazione massima, pari a 46.68 ± 2.33 gCOD/l, è stata analizzata al quattordicesimo e ultimo giorno nel test svolto in regime termofilo (**Fig. 53**), risultando composta dall'acido acetico (75 %), acido propionico (10 %) e butirrico (15 %) (**Fig. 54**).

La concentrazione totale di VFA misurata durante la prova in regime termofilo con feccia pretrattata con Reagente Fenton (**Fig. 53**) è risultata mediamente superiore rispetto a quella osservata nel corrispondente test mesofilo (**Fig. 39**), suggerendo un effetto positivo della temperatura sulla produzione complessiva di VFA per questa specifica condizione sperimentale. Tuttavia, durante la prima settimana di processo, tale produzione è risultata confrontabile con quella ottenuta dalla feccia grezza in regime mesofilo (**Fig. 37**). Di conseguenza, la necessità di combinare pretrattamento Fenton e condizioni termofile appare poco giustificata, poiché la matrice non trattata in regime mesofilo ha permesso di raggiungere prestazioni analoghe evitando l'impiego di reagenti chimici e maggiori costi energetici.

4.5.2.7 Fermentazione della feccia pretrattata in ambiente alcalino in regime termofilo

I seguenti grafici (**Fig. 55**, **Fig. 56**) riportano i dati relativi al processo fermentativo con substrato la feccia pretrattata con soluzione alcalina. Nel presente paragrafo viene discusso il confronto tra i test di fermentazione svolti con feccia grezza, con feccia pretrattata e con il medesimo test effettuato in regime mesofilo.

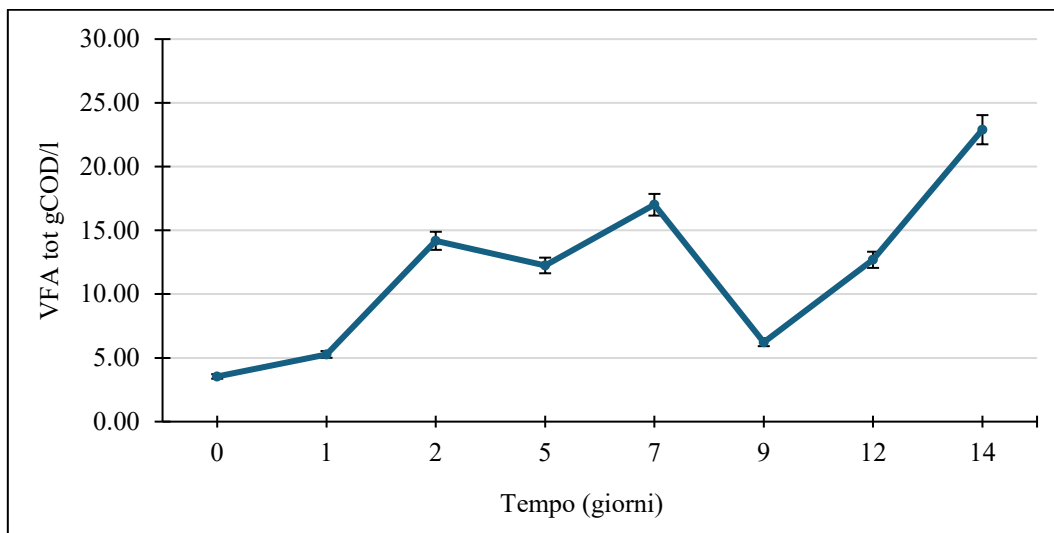


Figura 55: Grafico descrittivo del contenuto totale di VFA presente ad ogni campionamento della feccia pretrattata con soluzione alcalina

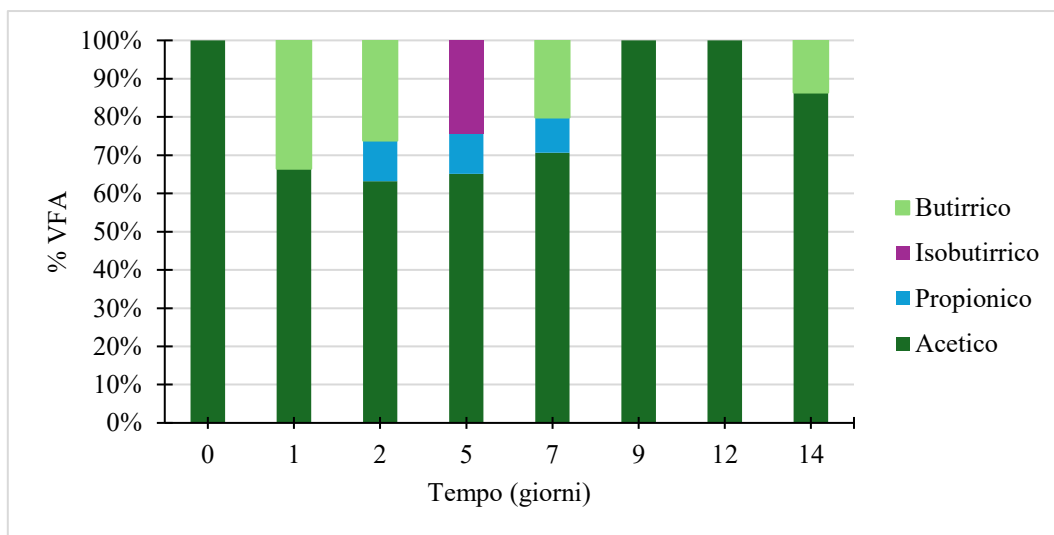


Figura 56: Distribuzione in percentuale sul totale dei diversi acidi grassi volatili presenti ad ogni campionamento della feccia pretrattata con soluzione alcalina

Il profilo della curva riportata in **Fig. 55** è risultato comparabile a quanto ottenuto per il regime termico mesofilo (**Fig. 41**), mostrando in entrambi i casi un andamento oscillatorio. Nonostante le concentrazioni ottenute di acidi grassi volatili totali in regime termofilo non siano state paragonabili a quanto analizzato nelle condizioni di mesofilia, si è potuto notare un primo picco ottenuto tra il

settimo e ottavo giorno in entrambi i processi, al quale è susseguito un drastico consumo delle biomolecole prodotte (**Fig. 55, Fig. 41**). Dopodiché, in entrambi i regimi termici, si è assistito ad un ulteriore incremento produttivo fino al raggiungimento della concentrazione massima, ottenuta all'ultimo giorno di campionamento del brodo di reazione, con valori pari a 22.89 ± 1.14 gCOD/l (55 °C) e 38.51 ± 1.90 gCOD/l (37 °C).

La composizione chimica in VFA instauratasi nella prova in condizioni termofile (**Fig. 56**) è risultata differente rispetto a quanto riscontrato nella corrispondente fermentazione in regime mesofilo (**Fig. 42**). In tal contesto, l'acido acetico era stato gradualmente sostituito dall'acido butirrico, che si era assestato come componente maggioritaria durante gli ultimi giorni di processo. Infatti, la concentrazione massima di 38.51 ± 1.93 gCOD/l risultava composta da 60% di acido butirrico, 25% di acido acetico e 15% di acido propionico (**Fig. 42, Fig. 43**) ottenuta alla fine del test. Invece, nel reattore in condizioni termofile (**Fig. 55**) nell'ultimo giorno di fermentazione, in corrispondenza della massima quantità di VFA rilevata (22.89 gCOD/l), la distribuzione di acidi grassi volatili è stata rappresentata dall'acido acetico (85%) e dall'acido butirrico (15%) (**Fig. 56**). Tutto ciò porta ad ipotizzare che, nei brodi di reazione, si siano affermati i processi metabolici differenti in relazione alla temperatura di processo.

Il pretrattamento con soluzione alcalina è risultato efficace nell'incrementare la degradabilità del substrato organico ed a promuovere la bioconversione in acidi grassi volatili; infatti, già nelle prime 48h di processo fermentativo, la concentrazione osservata (14.18 ± 0.70 gCOD/l) (**Fig. 55**) è apparsa di quattro volte maggiore rispetto a quanto ottenuto con la feccia grezza (3.58 ± 0.18 gCOD/l) (**Fig. 51**). Nonostante ciò, la prova svolta in condizioni termiche mesofile con feccia pretrattata è stata caratterizzata da produttività maggiori nel breve periodo, in cui è stata ottenuta la concentrazione di 20.83 ± 1.04 gCOD/l (**Fig. 41**) già al quarto giorno di processo, rispetto a quanto è stato osservato a temperature più elevate (**Fig. 55**). Per poter raggiungere un risultato analogo in condizioni di termofilia sono stati necessari 14 giorni di fermentazione, dimostrando che temperature elevate non sono state ottimali per garantire, nel breve periodo, un incremento produttivo con questo substrato.

5. Conclusioni

Lo scopo del presente studio è stato quello di valorizzare, in un'ottica di circolarità e di sviluppo sostenibile, matrici di scarto provenienti dalla filiera agroalimentare, quali fecce di vino e trebbie di birra, mediante il loro utilizzo in processi fermentativi finalizzati alla produzione di acidi grassi volatili. Considerata la complessità di tali substrati, in particolare delle trebbie di birra, caratterizzate da una componente lignocellulosica recalcitrante all'attività microbica, sono state testate diverse tipologie di pretrattamento con l'obiettivo di incrementare la biodisponibilità della sostanza organica e favorire il successivo processo fermentativo.

Sulla base dei risultati ottenuti nella fase di pretrattamento, le matrici selezionate sono state sottoposte a fermentazione acidogenica in regime mesofilo e termofilo, allo scopo di valutare l'effetto della temperatura sulla produzione di VFA. L'obiettivo ultimo è stato quello di individuare la combinazione più idonea tra tipologia di pretrattamento e temperatura di fermentazione, in grado di favorire la produzione di acidi grassi volatili nel breve periodo rispetto all'utilizzo dei substrati non pretrattati.

Per quanto riguarda le trebbie di birra, i risultati più promettenti sono stati ottenuti pretrattando la matrice in ambiente alcalino e conducendo la successiva fermentazione in condizioni termiche mesofile. In tale configurazione, già nelle prime ore di processo, è stata raggiunta una concentrazione di VFA totali pari a 12.01 ± 0.60 gCOD/l, costituita per circa il 70% da acido propionico. Un risultato analogo è stato ottenuto anche nella prova condotta con trebbia grezza, ma solo in una fase più avanzata del processo, evidenziando l'efficacia del pretrattamento alcalino nel rendere più rapidamente biodisponibile il materiale organico. Inoltre, il processo fermentativo con trebbia pretrattata in ambiente alcalino ha favorito un metabolismo fermentativo orientato verso la produzione di acido propionico, che ha rappresentato la frazione prevalente della miscela di VFA. Infine, il prolungamento del processo oltre il tredicesimo giorno non sembra ottimale qualora l'obiettivo sia la produzione di acidi grassi a catena corta, poiché al termine della fermentazione è stata osservata una maggiore incidenza di acidi grassi a catena media, pari a circa il 35% del totale.

Non è stato invece osservato un miglioramento significativo nella produzione di VFA nel test condotto in condizioni mesofile con trebbia pretrattata mediante Reagente Fenton rispetto a quanto ottenuto con la trebbia grezza. In tale prova, infatti, la produzione di VFA è risultata mediamente pari a circa 5.00 gCOD/l, valore inferiore rispetto a quello osservato nel test con trebbia pretrattata in ambiente alcalino.

Le fermentazioni condotte in regime termofilo sulle trebbie di birra, sia grezze sia pretrattate, non hanno confermato le aspettative iniziali. Sebbene temperature più elevate possano favorire cinetiche

microbiche più rapide, nelle condizioni sperimentali adottate non è stato osservato un incremento della produzione di acidi grassi volatili nel breve periodo rispetto ai corrispondenti test mesofili. Pertanto, per questa matrice, il mantenimento del processo in condizioni termofile non appare giustificato alla luce dei risultati ottenuti, soprattutto considerando il maggiore dispendio energetico richiesto.

Per quanto concerne le fecce di vino, i test fermentativi condotti in condizioni mesofile con matrici pretrattate, sia in ambiente alcalino sia mediante Reagente Fenton, non hanno evidenziato incrementi significativi nella produzione di acidi grassi volatili rispetto alla prova condotta con feccia grezza. Quest'ultima ha permesso di raggiungere, al dodicesimo giorno di fermentazione, una concentrazione massima di VFA pari a 58.27 ± 2.91 gCOD/l. Tale risultato conferma l'elevata attitudine della feccia di vino non pretrattata alla produzione di VFA in condizioni mesofile.

Tra le prove condotte in regime termofilo con fecce di vino, il test con matrice pretrattata mediante Reagente Fenton è risultato il più promettente, raggiungendo una concentrazione di VFA pari a 38.04 ± 1.90 gCOD/l già al settimo giorno. Tuttavia, tale evidenza sembrerebbe non giustificare i costi sostenuti per pretrattare la matrice con Reagente Fenton e mantenere il processo fermentativo al regime termofilo, in quanto un risultato confrontabile, pari a 33.01 ± 1.65 gCOD/l, è stato ottenuto nelle medesime tempistiche con feccia grezza in condizioni mesofile.

Nel complesso, è stato possibile constatare che i pretrattamenti effettuati su feccia di vino non siano stati decisivi nell'incrementare la produzione di VFA rispetto alla matrice non pretrattata. Le condizioni mesofile si sono dimostrate le più indicate per operare con tale substrato, consentendo di ottenere concentrazioni elevate di VFA senza la necessità di applicare trattamenti preliminari. Nei test condotti con fecce pretrattate, sia in mesofilia sia in termofilia, è stato osservato, inoltre, un andamento oscillatorio della concentrazione totale di VFA, caratterizzato dal raggiungimento di un primo massimo, seguito da una fase di consumo e da una successiva ripresa della produzione. Tale comportamento potrebbe essere riconducibile alla presenza di frazioni organiche con diversa biodegradabilità, la cui conversione potrebbe avvenire con cinetiche differenti. Studi futuri potrebbero quindi approfondire il ruolo di tali frazioni mediante analisi qualitative e quantitative della sostanza organica residua, condotte parallelamente al monitoraggio degli acidi grassi volatili.

In conclusione, il presente studio rappresenta un'indagine preliminare sulle potenzialità dei pretrattamenti nella valorizzazione di sottoprodotti agroalimentari mediante fermentazione acidogenica. Tra le condizioni testate, la combinazione più promettente per le trebbie di birra è risultata il pretrattamento alcalino seguito da fermentazione in regime mesofilo, con particolare interesse per la produzione di acido propionico. Per le fecce di vino, invece, la fermentazione della

matrice grezza in condizioni mesofile ha confermato l'elevata attitudine di questo substrato alla produzione di VFA, rendendo non indispensabile l'applicazione dei pretrattamenti valutati. Infine, il confronto tra i due regimi termici ha evidenziato che, nelle condizioni sperimentali adottate, la termofilia non ha fornito vantaggi tali da giustificare il maggiore costo energetico del processo. Pertanto, le condizioni mesofile risultano complessivamente più adeguate alla valorizzazione fermentativa delle matrici considerate.

6. Bibliografia

- Adolore, S.R., Jaiswal, S. & Jaiswal, K.A. (2024). Green and sustainable pretreatment methods for cellulose extraction from lignocellulosic biomass and its applications: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 7, 100396.
- Agnihotri, S., Yin, D.M., Mahboubi, A., Sapmaz, T., Varjani, S., Qiao, W., Koseoglu-Imer, Y.D. & Taherzadeh, M.J., (2022). A glimpse of the world of volatile fatty acids production and application: A review. *Bioengineered*, 13(1), pp. 1249–1275.
- Agraso-Otero, A., Tehseen, A., Rebolledo-Leiva, R. and González-García, S. (2025). Turning wine waste into value: A techno-economic and environmental study of phenolics, syngas and biochar production. *Industrial Crops and Products*, 232, 121290.
- Albinelli, I., San Juan, G.M., Lester, G., Nijmeijer, M. & Neretin, L. (2024). *Bioeconomy for Sustainable Food and Agriculture: A Global Stocktaking Study*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Almendinger, M., Rohn, S. and Pleissner, D. (2020). Malt and beer-related by-products as potential antioxidant skin-lightening agents for cosmetics. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17, 100282.
- Alnafrh, I., Alqararah, K. and Aljaradin, M. (2025). From linear to circular: Evaluating the effects of circular economy on sustainable development progress in the EU economies. *Journal of Environmental Management*, 382, 125383.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, M.K., Noreen, A., Anjum, N.M. and Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, pp. 161–174.
- APAT – Agenzia per la Protezione dell’Ambiente e per i Servizi Tecnici. (2005). *Digestione anaerobica della frazione organica dei rifiuti solidi: aspetti fondamentali, progettuali, gestionali, di impatto ambientale ed integrazione con la depurazione delle acque reflue*. Manuali e Linee Guida, pp. 8–10.
- Archilla, C.J., Papirio, S. and Lens, P.N.L. (2021). Two-step process for volatile fatty acid production from brewery spent grain: Hydrolysis and direct acidogenic fermentation using anaerobic granular sludge. *Process Biochemistry*, 100, pp. 272–283.
- Atasoy, M., Agyeman, O.I., Plaza, E. and Cetecioglu, Z. (2018). Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. *Bioresource Technology*, 268, pp. 773–786.
- Atelge, M.R., Atabani, A.E., Banu, J.R., Krisa, D., Kaya, M., Eskicioglu, C., Kumar, G., Lee, C., Yildiz, Y.S., Unalan, S., Mohanasundaram, R. and Duman, F. (2020). A critical review of

- pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. *Fuel*, 270, 117494.
- Babuponnusami, A. & Muthunukumar, K. (2014). A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), pp. 557–572.
 - Bahri, M., Mahdavi, A., Mirzaei, A., Mansouri, A. and Haghghat, F. (2018). Integrated oxidation process and biological treatment for highly concentrated petrochemical effluents: A review. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 125, pp. 183–196.
 - Bano, S., Aslam, A.A., Khan, A., Shabbir, A., Qayyum, F., Wahab, N., Jabar, A., Islam, U.I. & Ng Ling, S. (2024). A mini-review on polyhydroxyalkanoates: Synthesis, extraction, characterization, and applications. *Process Biochemistry*, 146, pp. 250–261.
 - Bastidas-Oyanedel, J.R., Bonk, F., Thomsen, M.H. and Schmidt, J.E. (2015). Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio)chemical industry. *Environmental Science and Biotechnology*, 14, pp. 473–498.
 - Battista, F., Frison, N., Pavan, P., Cavinato, C., Gottardo, M., Fatone, F., Eusebi, A., Majone, M., Zeppilli, M., Valentino, F., Fino, D., Tommasi, T. and Bolzonella, D. (2019). Food waste and sewage sludge as feedstock for an urban biorefinery producing biofuels and added-value bioproducts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(2), pp. 328–338.
 - Bhatia, K.S. and Yang, H.Y. (2017). Microbial production of volatile fatty acids: current status and future perspectives. *Environmental Science and Biotechnology*, 16, pp. 327–345.
 - BIT, la Bioeconomia in Italia. (2017). Un’opportunità unica per riconnettere Ambiente, Economia e Società.
 - Bolaji, O.I., Dionisi, D. (2017). Acidogenic fermentation of vegetable and salad waste for chemicals production: Effect of pH buffer and retention time. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(6), pp. 5933-5943
 - Boscolo Bomba, M. (2024). *Poliidrossialcanoati: sintesi e caratteristiche*. Elaborato del Corso di Laurea in Chimica, Università degli Studi di Padova.
 - Caminiti, V., Gupte, P.A., Favaro, L., Casella, S. and Basaglia, M. (2025). Valorization of prosecco wine lees for sustainable polyhydroxyalkanoates production by *Cupriavidus necator* DSM 545 and *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM 1034. *New Biotechnology*, 88, pp. 73–82.
 - Candry, P., Ulcar, B., Petrognani, C., Rabey, K. & Ganigué, R. (2020). Ethanol: propionate ratio drives product selectivity in odd-chain elongation with *Clostridium kluyveri* and mixed communities. *Bioresource Technology*, 313, Article 123651.

- Capitani, G. (2017). Produzione di miscele di acidi grassi volatili ad alto contenuto di acido caproico mediante fermentazione acidogenica di vinacce rosse. Tesi di laurea Magistrale in Microbiologia per il disinquinamento, Università di Bologna, pp. 5-6
- Casalatina, I. (2013). *Processi di degradazione ossidativa con metodologia Fenton per applicazioni superficiali*. Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali, Università degli Studi di Padova.
- Chan, E. & Epelle, I.E. (2025). Advanced oxidation for optimising biomass-to-biofuel conversion. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(5), 118517.
- Chetrariu, A., Dabija, A., Caisin, L., Agapii, V. and Avramia, E. (2025). Sustainable valorization of wine lees: From waste to value-added products. *Applied Sciences*, 15(7), 3648.
- Chew, R.K., Leong, Y.H., Khoo, S.K., Vo, D.V.N., Anjum, H., Chang, C.K. & Loke, P.S. (2021). Effects of anaerobic digestion of food waste on biogas production and environmental impacts: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, pp. 2921–2939.
- Commissione Europea. (2020). *Un nuovo piano d'azione per l'economia circolare. Per un'Europa più pulita e più competitiva*. Bruxelles: Commissione Europea.
- Commissione Europea. (2025). *A Strategic Framework for a Competitive and Sustainable EU Bioeconomy*. Bruxelles: Commissione Europea.
- Creo, C., Ansanelli, G., Buttol, P., Chiavetta, C., Cortesi, S., Cutaia, L., Nobili, P. and Sposato, P. (2018). *Uso efficiente delle risorse nelle imprese vitivinicole*. Roma: ENEA.
- Da Ros C, Cavinato C, Pavan P, Bolzonella D. (2014). Winery waste recycling through anaerobic codigestion with waste activated sludge. *Waste Manage.* 34(11), pp. 2028-2035.
- Da Ros, C., Cavinato, C., Pavan, P. & Bolzonella, D. (2017). Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of winery wastewater sludge and wine lees: An integrated approach for sustainable wine production. *Journal of Environmental Management*, 203, pp. 745–752.
- Da Ros, C., Micolucci, F., Gottardo, M., Cavinato, C., Bolzonella, D. & Pavan, P. (2017). Development and application of an automatic feeding control to manage anaerobic co-digestion of winery wastes. *Journal of Cleaner Production*, 161, pp. 75–83.
- DEFRA – Department for Environment, Food & Rural Affairs. (2011). *Guidance on Applying the Waste Hierarchy*. London: DEFRA.
- European Environment Agency (EEA). (2015). *The European Environment – State and Outlook 2015*. European Briefings. Copenhagen: EEA.
- El Achkar, H.L., Lendormi, T., Salameh, D., Louka, N., Maroun, R.G., Lanoisellé, J.L. and Hobaika, Z. (2018). Influence of pretreatment conditions on lignocellulosic fractions and methane production from grape pomace. *Bioresource Technology*, 247, pp. 881–889.

- Fava, F., Totaro, G., Diels, L., Reis, M., Duarte, J., Carioca, B.O., Poggi-Varaldo, H.M. and Ferreira, B.S. (2015). Waste biorefinery in Europe: Opportunities and research and development needs. *New Biotechnology*, 32(1), pp. 100–108.
- Finesso, A. (2014). *Valorizzazione di scarti vinicoli per il recupero di prodotti ad alto valore aggiunto ed energia*. Tesi di Laurea Magistrale in Scienze Ambientali. Università Ca' Foscari Venezia, pp. 37–38.
- Francescin, L. (2021). *Studio del processo di fermentazione anaerobica per la produzione di bio-idrogeno e acidi grassi volatili da matrici di scarto derivanti da processi di produzione del vino*. Tesi di Laurea Magistrale in Biotecnologie per l'Ambiente e lo Sviluppo Sostenibile. Università Ca' Foscari Venezia, pp. 26–27.
- Grazioli, C. (2015). Le transizioni demografiche nel mondo e nel Mediterraneo. *Novecento.org*, 4.
- Han, W., He, P., Shao, L. & Lu, F. (2018). Metabolic interactions of a chain elongation microbiome. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22), e01614-18.
- Hejna, A. (2021). More than just a beer—The potential applications of by-products from beer manufacturing in polymer technology. *Emergent Materials*, 5(1-2), pp. 1-19.
- Hu, Y.S., Karthikeyan, O.P., Selvam, A. and Wong, J.W.C. (2012). Effect of inoculum to substrate ratio on the hydrolysis and acidification of food waste in a leach bed reactor. *Bioresource Technology*, 126, pp. 425–430.
- Jankowska, E., Chwiałkowska, J., Stodolny, M. and Popiel, P.O. (2017). Volatile fatty acids production during mixed-culture fermentation: The impact of substrate complexity and pH. *Chemical Engineering Journal*, 326, pp. 901–910.
- Jasko, J., Skripsts, E. and Dubrovskis, V. (2012). Biogas production of winemaking waste in anaerobic fermentation process. *Engineering for Rural Development*, 11, pp. 576–579.
- Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C. and Li, M. (2013). Volatile fatty acids production from food waste: Effects of pH, temperature and organic loading rate. *Bioresource Technology*, 143, pp. 525–530.
- Jönsson, L.J. and Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199, pp. 103–112.
- Karthikeyan, H.P., Iza, F., Chaminda, H., Bandulasena, H.C.H. & Radu, T., (2026). Enhanced biogas production from lignocellulosic biomass via integrated Fenton and plasma treatment. *Biomass and Bioenergy*, 208, Article 108812.

- Khan, M.A., Ngo, H.H., Guo, W.S., Liu, Y., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Deng, L.J., Wang, J. & Wu, Y. (2016). Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 219, pp. 738–748.
- Kondusamy, D. & Kalamdhad, A.S., (2014). Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high-rate methane production: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(3), pp. 1821–1830.
- Kucek, L.A., Xu, J., Nguyen, M. & Angenent, L.T. (2016). Waste conversion into n-caprylate and n-caproate: Resource recovery from wine lees using anaerobic reactor microbiomes and in-line extraction. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1892.
- Lanfranchi, A., Quémener, E.D., Magdalena, J.A., Cavinato, C. & Trably, E. (2024). Conversion of wine lees and waste activated sludge into caproate and heptanoate: Thermodynamic and microbiological insights. *Bioresource Technology*, 408, 131126.
- Lao, J.E., Dimoso, N., Raymond, J. & Mbega, E. (2020). The prebiotic potential of brewers' spent grain on livestock health: A review. *Tropical Animal Health and Production*, 52(4), pp. 1–12.
- Lee, W.S., Chua, A.S.M., Yeoh, H.K. & Ngoh, G.C. (2014). A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*, 235, pp. 83–99.
- Lemos, C. P., Serafim, S. L., Reis, M.A.M. (2006). Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *Journal of Biotechnology*, 122(2), pp- 226-238
- Li, Y., Park, S.Y. & Zhu, J. (2011). Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), pp. 821–826.
- Li, Y., Xu, H., Zhao, B., Mu, H., Jin, F., Meng, G. & Fang, X. (2020). Two-phase anaerobic digestion of lignocellulosic hydrolysate: Focusing on the acidification with different inoculum-to-substrate ratios and inoculum sources. *Science of the Total Environment*, 699, 134226.
- Liang, S. & Wan, C. (2015). Carboxylic acid production from brewer's spent grain via mixed culture fermentation. *Bioresource Technology*, 182, pp. 179–183.
- Lopez, A., Pagano, M., Volpe, A. & Di Pinto, A.C. (2004). Fenton's pre-treatment of mature landfill leachate. *Chemosphere*, 54, pp. 1005–1010.

- Lukitawesa, Patinvoh, R.J., Millati, R., Horváth, I.S. & Taherzadeh, M.J. (2020). Factors influencing volatile fatty acids production from food wastes via anaerobic digestion. *Bioengineered*, 11(1), pp. 39–52.
- Lynch, M.K., Steffen, J.E., Arendt, K.E. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 10.002/jib.363
- LaoMárquez, P.D.C., Jasso, R.M.R., Araújo, G.R., Treviño, L.A., Nabarlatz, D., Gullón, B. & Ruiz, H.A. (2021). Circular bioeconomy and integrated biorefinery in the production of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A review. *Industrial Crops and Products*, 162, 113274.
- Meegoda, N.J., Li, B., Patel, K. & Wang, L.G. (2018). A review of the processes, parameters and optimization of anaerobic digestion. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10), 2224.
- Miele, S., Foschi, L. & Bargiacchi, E., (2007). Nelle bioraffinerie i processi integrati di produzione di combustibili, energia e prodotti chimici. *Rivista Italiana di Agronomia*, 2(4), pp. 409–439.
- Mikulski, D. & Kłosowski, G. (2018). Efficiency of dilute sulfuric acid pretreatment of distillery stillage in the production of cellulosic ethanol. *Bioresource Technology*, 268, pp. 424–433.
- Millati, R., Wikandari, R., Ariyanto, T., Hasniah, N. & Taherzadeh, M.J. (2023). Anaerobic digestion biorefinery for circular bioeconomy development. *Bioresource Technology Reports*, 21, 101315.
- Ministero dell'agricoltura, della sovranità alimentare e delle foreste, Decreto n. 7407 del 4 agosto 2010, *Modifiche all'articolo 5 del decreto ministeriale 27/11/2008, n. 5396, concernente "Disposizioni di attuazione dei regolamenti (CE) n. 479/2008 e n. 555/2008 per quanto riguarda l'applicazione della misura della distillazione dei sottoprodotti della vinificazione"*, in G.U 4 agosto 2010, n. 0007407
- Monlau, F., Barakat, A., Steyer, J.-P. & Carrère, H. (2012). Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresource Technology*, 120, pp. 241–247.
- Montgomery, L.F.R. & Bochmann, G. (2014). *Pretreatment of Feedstock for Enhanced Biogas Production*. IEA Bioenergy.
- Mussatto, S.I., Dragone, G. & Roberto, I.C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43(1), pp. 1–14.

- Organizzazione delle Nazioni Unite (ONU) (2015). *Trasformare il nostro mondo: l'Agenda 2030 per lo sviluppo sostenibile*. New York: United Nations.
- Pacheco, D.A.J., Rampasso, I.S., Michels, G.S., Ali, S.M. & Hunt, J.D. (2024). From linear to circular economy: The role of BS 8001:2017 for green transition in small business in developing economies. *Journal of Cleaner Production*, 439, 140787.
- Pandey, A.K., Pilli, S., Bhunia, P., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Zhang, T.C., Kim, S.H. & Pandey, A. (2022). Dark fermentation: Production and utilization of volatile fatty acids from different wastes – A review. *Chemosphere*, 288(1), 132444.
- Paneti, R., Begum, S. & Anupaju, G.R. (2026). Evaluation of impact of pretreatment strategies on structural deconstruction, biodegradability, and solubility of agricultural biomass for enhanced biohydrogen production via high-solids anaerobic fermentation (HSAF). *Renewable Energy*, 263, 125521.
- Papargyropoulou, E., Lozano, R., Steinberger, J.K., Wright, N. & Ujang, Z.B. (2014). The food waste hierarchy as a framework for the management of food surplus and food waste. *Journal of Cleaner Production*, 76, pp. 106–115.
- Pappaletta, F. (2024). *Valorizzazione di scarti dell'industria agroalimentare per la produzione di biogas e biofertilizzanti e valutazione degli effetti agronomici*. Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica dei Processi Sostenibili, Politecnico di Torino, pp. 1–2.
- Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea. (2008). *Direttiva 2008/98/CE del 19 novembre 2008 relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive*.
- Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea. (2018). *Direttiva (UE) 2018/851 del 30 maggio 2018 che modifica la direttiva 2008/98/CE relativa ai rifiuti*.
- Paula, M., Latorres, M.J. & Martins, G.V. (2023). Potential valorization opportunities for brewer's spent grain. *European Food Research and Technology*, 249, pp. 2471–2483.
- Pérez-Barragán, J., Martínez-Fraile, C., Quijano, G., Munoz, R., Maya-Yescas, R., León-Becerril, E., Castro-Munoz, R., García-Depraet, O. (2024). Brewery spent grain valorization through fermentation: Targeting biohydrogen, carboxylic acids and methane production. *Process Safety and Environmental Protection*, 191, pp. 206-217
- Priyadarshini, M., Das, I., Ghangrekar, M.M. & Blaney, L. (2022). Advanced oxidation processes: Performance, advantages, and scale-up of emerging technologies. *Journal of Environmental Management*, 316, 115295.
- Puligundla, P. & Mok, C. (2021). Recent advances in biotechnological valorization of brewers' spent grain. *Food Science and Biotechnology*, 30, pp. 341–353.

- Qin, W., Han, S., Meng, F., Chen, K., Gao, Y., Li, J., Lin, L., Hu, E. & Jiang, J. (2024). Impacts of seasonal variation on volatile fatty acids production of food waste anaerobic fermentation. *Science of the Total Environment*, 912, 168764.
- Qin, W., Chen, K., Gao, Y., Li, J., Lin, L., Hu, E. & Jiang, J. (2025). Bridging waste stream complexity and VFAs applications: A review of recovery technologies. *Separation and Purification Technology*, 374, 133690.
- Repubblica Italiana, (2006). *Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale*.
- Riboli, G. (2023). *Fermentazione acidogenica per la produzione di acidi grassi volatili da fanghi di depurazione: influenza del pretrattamento con carbonizzazione idrotermica (HTC)*. Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio, Politecnico di Milano, pp. 11–12.
- Rottanaporn, K., Tantayotai, P., Phusantisampan, T., Pornwongthong, P. & Sriariyanun, M. (2018). Organic acid pretreatment of oil palm trunk: effect on enzymatic saccharification and ethanol production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41, pp. 467–477.
- Sabarinathan, D., Chandrika, P.S., Venkatraman, P., Easwaran, M., Sureka, S.C. & Preethi, K. (2018). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Pseudomonas plecoglossicida* and its application towards cancer detection. *Informatics in Medicine Unlocked*, 11, pp. 61–67.
- Sarkar, O., Rova, U., Christakopoulos, P. & Matsakas, L. (2026). Acidogenic valorization of agricultural residues and industrial waste streams: substrate composition regulating the microbial community and metabolites. *Environmental Science: Advances*, 5(2), pp. 470–484.
- Shawaky, E., Gibbons, S. & Selim, A.D. (2025). Bio-sourcing from by-products: A comprehensive review of bioactive molecules in agri-food waste (AFW) streams for valorization and sustainable applications. *Bioresource Technology*, 431, 132640.
- Shinde, R., Hackula, A., Marcycz, M., Bose, A., O'Shea, R., Barth, S., Murphy, J.D. & Wall, D.M. (2025). Dynamic anaerobic digestion-based biorefineries for on-demand renewable energy and bioproducts in a circular bioeconomy. *Trends in Biotechnology*, 43(5), pp. 1140–1165.
- Spirito, C.M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A.J.M. & Angenent, L.T. (2014). Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, pp. 115–122.
- Steiner, J., Procopio, S. & Becker, T. (2015). Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *European Food Research and Technology*, 241, pp. 303–315.

- Strazzera, G., Battista, F., Garcia, N.H., Frison, N. & Bolzonella, D. (2018). Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. *Journal of Environmental Management*, 226, pp. 278–288.
- Suarez, R.M., Zhang, Y. & Outram, V. (2021). Current perspectives on acidogenic fermentation to produce volatile fatty acids from waste. *Environmental Science and Biotechnology*, 20, pp. 439–478.
- Jin, T., Hu, J., Song, X., Liu, Y., Zhang, J., Zhao, J., Wang, F., Yan, G., Xiao, L. and Zhang, H. (2026). Rapid production of volatile fatty acids (VFAs) through the co-fermentation of mixed vegetable waste liquid. *Bioresource Technology Reports*, 33, 102552.
- Sun, X., Wang, Z., Wu, W., Zhou, S., Li, J., Yan, B. & Chen, G. (2025). Dark fermentation of biomass for enhanced hydrogen production: A review of pretreatment strategies, microbial enhancement, and process regulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 175, 151546.
- Szacherska, K., Oleskowicz-Popiel, P., Ciesielski, S. & Możejko-Ciesielska, J. (2021). Volatile fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production. *Polymers*, 13(3), 390.
- Tan, Z., Liu, Y., Liu, H., Yang, C., Niu, Q. & Cheng, J.J. (2021). Effects of 5-hydroxymethylfurfural on removal performance and microbial community structure of aerobic activated sludge treating digested swine wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 106104.
- Tao, X., Liu, S., Lv, L., Sun, L., Zhang, G., Liang, J. & Zou, W. (2025). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production from volatile fatty acids derived from food waste fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 16, 103389.
- Teixeira, R.M., Guarda, E.A., Freitas, B.E., Galinha, C.F., Duque, A.F. & Reis, M.A.M. (2020). Valorization of raw brewers' spent grain through the production of volatile fatty acids. *New Biotechnology*, 57, pp. 4–10.
- Tian, L., Pan, L. & Wang, L. (2024). Effect of inoculum pretreatment and substrate/inoculum ratio on acidogenic fermentation of chemically enhanced primary treatment sludge. *Sustainability*, 16(8), 3347.
- Varghese, K.V., Poddar, J.B., Shah, P.M., Purohit, J.H. & Khardenavis, A.A. (2022). A comprehensive review on current status and future perspectives of microbial volatile fatty acids production as platform chemicals. *Science of the Total Environment*, 815, 152500.

- Venny, Gan, S. & Ng, H.K. (2012). Current status and prospects of Fenton oxidation for the decontamination of persistent organic pollutants (POPs) in soils. *Chemical Engineering Journal*, 213, pp. 295–317.
- Werker, A., Lorini, L., Villano, M., Valentino, F. & Majone, M. (2022). Modelling mixed microbial culture polyhydroxyalkanoate accumulation bioprocess towards novel methods for polymer production using dilute volatile fatty acid rich feedstocks. *Bioengineering*, 9(3), 125.
- Zalunardo, M. (2017). *Economia circolare: come lo spreco può diventare una risorsa. Circular economy: how waste can become a resource*. Tesi di Laurea in Economia Internazionale. Università degli Studi di Padova.
- Zamel, D., Etman, E.A., Ammar, M.M., Elsabagh, M.N. & Elmasry, M.A.D. (2026). Harnessing energy from food waste via anaerobic digestion: A comprehensive review. *Applied Food Research*, 6(1), 101914.
- Zanolungo, C. (2022). *Influenza dei parametri operativi sul processo di fermentazione acidogenica di fanghi di depurazione: monitoraggio del processo e modellazione matematica*. Tesi di Laurea Magistrale in Biotecnologie per l'Ambiente e lo Sviluppo Sostenibile. Università Ca' Foscari Venezia, pp. 12-13
- Zhou, M., Yan, B., Wong, J.W.C. & Zhang, Y. (2018). Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresource Technology*, 248, pp. 68–78.
- Zhou, W., Bergsma, S., Colpa, I.D., Euverink, G.J.W. & Krooneman, J. (2023). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. *Journal of Environmental Management*, 341, 118033.

Sitografia

- Consiglio dell'Unione Europea. *Green Deal europeo*.
Disponibile presso: www.consilium.europa.eu/it/policies/european-green-deal
- Global Footprint Network. *Earth Overshoot Day*.
Disponibile presso: www.overshoot.footprintnetwork.org
- Organizzazione delle Nazioni Unite (ONU). Crescita o contrazione le ultime tendenze sulla popolazione globale.
Disponibile presso: <https://unric.org/it/crescita-o-contrazione-le-ultime-tendenze-sulla-popolazione-globale/>
- Sustainable Development Goals (DGs).
Disponibile presso: www.un.org/sustainabledevelopment/what-is-sustainable-development

- Statista. Beer production worldwide from 1998 to 2024.

Disponibile presso: www.statista.com/statistics/worldwide-beer-production

Ringraziamenti

Prima di concludere questo lungo capitolo della mia vita, desidero esprimere la mia più sincera gratitudine al prof. Marco Gottardo per la fiducia datami, per la disponibilità e competenze offerte in questi mesi. Ringrazio di cuore il prof. Francesco Valentino e la dott.ssa Sara Danieli per la pazienza e per l'opportunità fornitami di ampliare il mio percorso di studi e le mie conoscenze, operando in un ambito per me nuovo.

Doverosi ringraziamenti vanno alla mia famiglia e ai miei amici. Un ringraziamento speciale va a mia mamma, per avermi insegnato a vedere il bello in ciò che ci circonda, ad essere rispettosa e amante della natura, e a mio papà, per avermi trasmesso il valore di portare a termine i miei obiettivi con impegno e dedizione. Nell'insieme, queste sono tutte qualità che mi hanno resa ciò che sono e senza le quali questo percorso non sarebbe mai stato intrapreso. Ringrazio Lisa per avermi sopportata e supportata in questi anni di studio come solo una sorella sa fare. Ringrazio Davide per essere un compagno di vita, per avermi sempre dato la forza di proseguire, per le innumerevoli ore passate ad ascoltarmi studiare e le mille ansie che ha dovuto sedare.

Ringrazio i miei amici Antonio e Stefania per essermi stati vicini, un esame dopo l'altro, in questo lungo percorso, sempre con il sorriso e la battuta pronta. Ringrazio Camilla per essere stata una spalla durante gli studi ed una preziosa amica, i cui destini si sono incrociati tra sassi ed esami.

Vi ringrazio tutti per la fiducia che avete sempre riposto in me, che mi è stata d'immenso aiuto nel perseguire e portare a termine questo obiettivo.

Infine, ringrazio me stessa, per la tenacia e la testardaggine di non arrendermi mai.