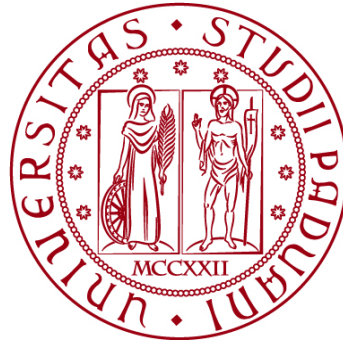


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

*Approcci biotecnologici per la produzione di  
biogas da residui agro-alimentari*

**Tutor:** Prof. Lorenzo Favaro

**Dipartimento:** DAFNAE (*Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente*)

**Co-tutor:** Dott.ssa Sara Agostini

**Dipartimento:** DAFNAE (*Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente*)

**Laureando:** Gianmarco Paloscia

ANNO ACCADEMICO 2021/2022



# Indice

1.	Riassunto .....	1
2.	Stato dell'Arte .....	2
2.1.	La digestione anaerobica e le sue applicazioni .....	2
2.2.	Produzione di biogas da residui agro-alimentari.....	3
2.3.	Il progetto di ricerca .....	5
3.	Approccio sperimentale.....	6
3.1.	Inoculo e miscele enzimatiche.....	6
3.2.	Preparazione dei reattori <i>batch</i> .....	7
3.3.	Analisi quantitativa e qualitativa del biogas prodotto .....	8
3.4.	Elaborazione dei dati.....	10
4.	Risultati e discussione .....	11
4.1.	BMP in presenza di tre miscele enzimatiche.....	11
4.2.	L'effetto inibente causato da elevate concentrazioni delle miscele enzimatiche adottate.....	14
4.3.	Impatto sulla metanogenesi delle miscele enzimatiche adottate .....	15
4.4.	Impatto sulla cinetica produttiva di metano da parte delle miscele enzimatiche adottate.....	16
5.	Conclusioni.....	17
6.	Bibliografia .....	19



## 1. Riassunto

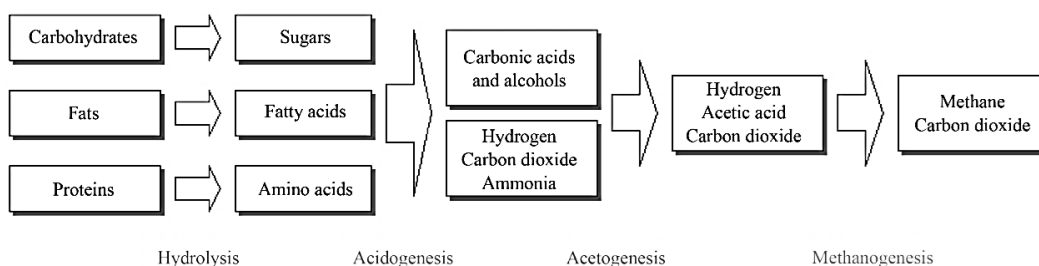
La scarsa degradabilità della matrice lignocellulosica rappresenta una complicazione rilevante allo sviluppo delle tecnologie per la produzione di biogas tramite digestione anaerobica di residui agro-alimentari. Per preservare la tecnologia e sfruttare le opportunità di investimento caratterizzanti questa epoca storica, sono stati sviluppati trattamenti enzimatici per agevolare la digestione della matrice lignocellulosica, migliorando la resa nonché la convenienza dell'intero processo. Questo esperimento è stato condotto in biodigestori *batch* in scala di laboratorio, alimentati da residui agro-alimentari con componente lignocellulosica e addizionati a tre miscele enzimatiche specificatamente sviluppate per ottimizzarne la digestione, nominate CG, C4, HC, a tre diluizioni differenti: 20%, 100%, 500% rispetto alla concentrazione raccomandata dal fornitore. Sono stati condotti dei test BMP (*Biochemical Methane Potential*) per valutare le miscele e stabilirne la più efficiente, secondo quattro parametri: produttività totale e specifica del biometano, la sua concentrazione finale e la velocità istantanea di produzione. I risultati ottenuti hanno stabilito il primato della soluzione 100% CG, dimostratasi più indicata per l'aumento della produzione di biogas piuttosto che l'incremento della frazione di biometano. Tuttavia, per tutte le miscele è stato identificato un effetto inibente che si suppone essere determinato dalla formulazione delle stesse, il quale richiede ulteriori studi per essere caratterizzato pienamente.

## 2. Stato dell'Arte

### 2.1. La digestione anaerobica e le sue applicazioni

La digestione anaerobica (AD) è un processo biologico di degradazione della materia organica che si svolge in condizioni di anaerobiosi grazie alla cooperazione sinergica tra batteri ed *Archaea*. L'insieme delle reazioni ossidoriduttive che costituiscono il *pathway* trasforma il carbonio organico in biogas: una miscela costituita prevalentemente da CH<sub>4</sub> (50% – 75%) e CO<sub>2</sub> (25% – 50%). A questi gas si aggiungono altre molecole presenti in tracce come H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, silossani, idrocarburi e particolato [1, 2]. Questo processo è particolarmente diffuso in natura in quanto tappa del ciclo biogeochimico del carbonio per il ricircolo dell'elemento all'interno degli ecosistemi. La digestione anaerobica, infatti, è responsabile della degradazione della materia organica da parte della flora enterica degli animali, nonché della produzione di biogas nelle paludi, risaie e nei sedimenti marini [3].

Il *pathway* è costituito da quattro step principali (*Figura 1*) che si susseguono sequenzialmente, suddivisi in due stadi: la fase acida e quella gassosa. Durante la prima fase avvengono i processi di idrolisi ed acidogenesi, i cui prodotti sono degradati nella fase successiva dalle reazioni di acetogenesi e metanogenesi [4]. Ciascuno di questi step è condotto da microrganismi differenti, talvolta specializzati in un'unica fase del processo, che elaborano i prodotti delle reazioni precedenti per alimentare quelle successive, definendo così una complessa cascata di reazioni interconnesse. Il primo step della digestione anaerobica consiste nella dissoluzione e liquefazione del materiale organico solido, tramite reazioni di idrolisi di macromolecole lipidiche, saccaridiche e proteiche che vengono convertite in prodotti solubili e quindi assimilabili dalle cellule [5]. I batteri idrolitici coinvolti dapprima colonizzano la superficie delle



**Figura 1.** Schematizzazione del *pathway* della digestione anaerobica. Tratta da "Handbook of Biogas", Al Seadi et al. (2008).

particelle solide e solo successivamente secernono enzimi degradativi extracellulari per la loro decomposizione [5]. I monomeri idrolizzati sono degradati successivamente da batteri fermentativi tramite le reazioni di acidogenesi, con la produzione di molecole più semplici come acidi grassi volatili, alcoli, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> [2, 3]. Prima di essere trasformate in metano, queste molecole vengono degradate ulteriormente dal metabolismo ossidativo anaerobio di batteri acetogenici che le converte in acetato, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> [5]. L'ultimo step della digestione anaerobica consiste nella produzione di metano da parte degli archei metanogeni, tramite tre vie distinte e alternative: metanogenesi idrogenotrofica, acetoclastica e metilotrofica. La prima converte CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> in CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O, mentre la seconda reazione prevede l'ossidazione del gruppo carbossilico dell'acetato in CO<sub>2</sub> e la riduzione del gruppo metilico in CH<sub>4</sub> [5]. La terza via, raramente impiegata dai microrganismi, consiste nella riduzione a CH<sub>4</sub> dei gruppi metilici di molecole organiche come metanolo e metilammina.

Da oltre un secolo l'uomo sfrutta la capacità naturale del metabolismo anaerobio su scala industriale per produrre fertilizzante dal digestato residuo, trattare acque reflue, rifiuti urbani, industriali e agricoli nonché per ricavare energia rinnovabile sottoforma di biogas [3]. Oggigiorno la tecnologia si sta espandendo verso la purificazione del biometano dal biogas (*upgrading*), impiegabile sia nella rete urbana che come combustibile per veicoli a motore e sostituto del gas naturale [3]. Le applicazioni della AD rappresentano quindi esempi di economia circolare, forme sostenibili di estrazione dell'energia che potrebbero subentrare rispetto alle fonti convenzionali, più impattanti sull'ambiente ed in via di deplezione ad un tasso sempre più accelerato [4]. Il settore del biogas in questa epoca storica è in forte crescita, tanto che l'Unione Europea con il piano di riconversione energetica *REPowerEU* (2022) ha come obiettivo per il 2030 la produzione di 35 miliardi di metri cubi di biometano all'anno tramite AD, pari al 9% del consumo totale di gas naturale del 2020 (*Document 52022SC0230 EUR-Lex, European Commission*), stabilendo un eccezionale potenziale per lo sviluppo e ampliamento del settore in Europa.

## **2.2. Produzione di biogas da residui agro-alimentari**

A livello industriale, la materia organica impiegata come substrato nei processi di digestione anaerobica proviene principalmente da tre fonti:

rifiuti domestici e industriali, fanghi residui dal trattamento delle acque reflue, produzioni agro-alimentari [6]. Negli ultimi anni si è manifestato un certo interesse da parte degli investitori nella conversione di prodotti agricoli in biogas, attratti sia dalle potenzialità tecnologiche che dall'aumento della richiesta energetica, concomitante ad una tendenza collettiva all'affrancamento dai combustibili fossili [2]. Lo sviluppo del settore si è inevitabilmente dovuto ridimensionare, adattandosi ad una necessità ugualmente imprescindibile: la fornitura alimentare, aggravata dalla continua deplezione delle aree coltivabili. Per risolvere il conflitto *food vs energy* si è investito nell'esplorazione del *2<sup>nd</sup> generation feedstock*, ovvero materia organica costituita da scarti non commestibili di colture destinate alla filiera alimentare [7, 2]. Questo rinnovamento scongiura la conversione dei terreni agricoli, riduce i danni all'approvvigionamento ed introduce circolarità nel settore agro-alimentare, aumentando la sostenibilità dell'intero processo produttivo [7].

Tuttavia, una difficoltà notevole nell'impiego di materia prima di seconda generazione è rappresentata dalla presenza di un'importante concentrazione di materiale lignocellulosico [7]. Difatti, il *cross-linking* della lignina alla cellulosa ed emicellulosa non è degradabile dai microrganismi fermentativi [8], quindi, tale materiale non contribuisce alla produzione di biogas ma anzi stratifica all'interno del biodigestore impedendo il corretto rimescolamento del digestante. I gradienti così stabiliti nel mix di fermentazione definiscono diverse disponibilità di nutrienti e di calore in funzione della localizzazione dei microrganismi nel vessel, pregiudicando globalmente la produzione di biogas. A questa difficoltà si aggiunge la complicazione rappresentata dalla struttura cristallina della cellulosa, la quale non essendo digerita impedisce ai microrganismi di insinuarsi nel materiale e quindi di accedere ai substrati degradabili [2]. Per migliorare la produzione di biogas sia in termini di resa che di velocità di reazione, si può ricorrere a trattamenti chimici e biologici [2] che facilitino la decomposizione del materiale lignocellulosico, garantendo l'omogeneità del mezzo. Di conseguenza, è nell'interesse del settore aumentare la competitività degli impianti, massimizzando la resa di produzione attraverso la selezione accurata delle migliori strategie di trattamento.

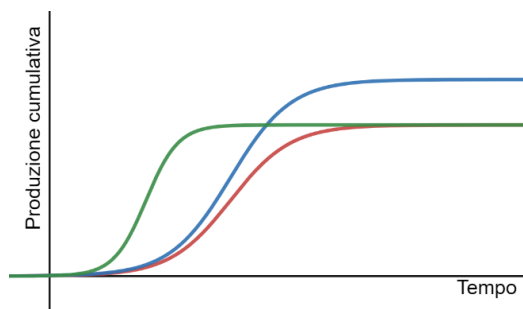


### 2.3. Il progetto di ricerca

Definita l'importanza dell'impiego di trattamenti nella digestione anaerobica, si delinea lo scopo di questa ricerca ovvero lo screening di tre differenti miscele degradative per la manipolazione della materia lignocellulosica in un campione di digestante alimentato con residui agro-alimentari. Per valutare gli effetti delle miscele sulla produzione di biogas, sono stati condotti dei test BMP (*Biochemical Methane Potential*) su riproduzioni in scala di laboratorio del biodigestore *batch* industriale.

I test BMP consistono nella misurazione del volume di biogas prodotto e nell'analisi della sua composizione, fintanto che la digestione anaerobica non si arresti per deplezione dei nutrienti. Tali test permettono di valutare il potenziale metanigeno o BMP del digestante, ovvero la quantità di metano che i microrganismi sono in grado di produrre mediante digestione anaerobica di un determinato substrato. I parametri monitorati per esprimere il BMP sono la produttività totale e specifica del biometano e la sua concentrazione nel biogas. Maggiore è la quantità, la concentrazione e la velocità di produzione e più favorevoli sono le condizioni di reazione, quindi, più efficiente è la miscela somministrata.

L'ipotizzato aumento della degradazione del materiale lignocellulosico, conseguente alla somministrazione della miscela, renderebbe disponibili dei nutrienti ulteriori rispetto alla condizione di controllo priva del trattamento. Ciò potrebbe determinare il verificarsi di due casi limite: si velocizza la cinetica di reazione a parità di produttività totale (*curva verde in Figura 2*); aumenta la produttività totale mantenendo la stessa cinetica di reazione (*curva blu in Figura 2*). Per stabilire l'effetto delle miscele sulla cinetica, un ulteriore parametro monitorato è la velocità di reazione istantanea.



**Figura 2.** Il grafico riporta, a fine puramente illustrativo, l'andamento teorico del volume cumulativo di biometano con il passare del tempo. In *rosso* è riportata la curva ipotizzata per i reattori di controllo; in *blu* il volume cumulativo nell'ipotesi dell'aumento della produzione totale; in *verde* la curva nell'ipotesi dell'aumento della cinetica, a parità di produzione.

### 3. Approccio sperimentale

#### 3.1. Inoculo e miscele enzimatiche

Il campione di digestante è stato prelevato dalla vasca di fermentazione di un impianto di produzione (non specificato per ragioni di riservatezza) appartenente all'azienda BTS Biogas s.r.l. con la quale DAFNAE collabora nell'ambito di questo progetto. La dieta del digestore è composta da pollina (deiezioni di galline ovaiole), liquame bovino (effluenti zootecnici non palabili costituiti da deiezioni solide e liquide, acqua di lavaggio e di bevuta), scarti della pianta di mais dolce in piccole quantità, insilato di orzo e insilato di mais. Lo stabilimento in questione è stato selezionato poiché la sua alimentazione prevede una quantità piuttosto elevata di insilato di orzo, substrato ricco in materia lignocellulosica; si presta quindi particolarmente ad essere oggetto di questo studio. La composizione chimica del digestante è riportata in *Tabella 1*.

Un'azienda coinvolta nel progetto di ricerca ha fornito 3 miscele degradative da testare: CG costituita prevalentemente da pectinasi, HC composta in particolare da cellulasi e proteasi, C4 principalmente da composti tensioattivi che insinuandosi tra le fibre di cellulosa ne facilitano la separazione.

**Tabella 1.** Composizione del digestante.

Parametro	U.M.	Fermentatore
Sostanza secca	%	9,6
Contenuto d'acqua	%	90,4
Ceneri	% s.s.	23,3
Sostanza secca organica	% s.s.	76,7
Ammonio NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	mg/L	3675
Ammonio NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	mg/L	2853
Acido acetico	mg/L	1482
Acido propionico	mg/L	361
Acido iso-butyrico	mg/L	85
Acido butyrico	mg/L	< 14
Acido iso-valerico	mg/L	< 16
Acido valerico	mg/L	< 16
Somma acidi grassi volatili	mg/L	1928
TAC	mg CaCO <sub>3</sub> /L	19780
FOS	mg HOAC/L	6310
FOS/TAC		0,32
Valore pH		7,9

Note: la composizione chimica è stata analizzata il 06/07/22 nell'ambito del progetto *Più-Biogas-App*. U.M.: unità di misura; TAC: capacità di tamponamento alcalina determinata con titolazione fino a pH 5,0; FOS: acidi grassi volatili totali determinati con titolazione da pH 5,0 a pH 4,4.

### 3.2. Preparazione dei reattori *batch*

L'esperimento è stato condotto conformemente ad un adattamento del protocollo per i test BMP pubblicato da Angelidaki et al. (2008) [9].

Dopo aver accuratamente numerato 40 reattori *batch* da 120 mL, sotto cappa chimica a flusso orizzontale sono stati versati in ciascuno circa 30 g del digestante campionato, il quale rappresenta l'inoculo del reattore. Da esperimenti esplorativi precedenti, si è notato che è preferibile diluire l'inoculo in acqua in modo da rallentare la cinetica di reazione e poter monitorare la produzione di biogas ad una risoluzione maggiore. Pertanto, con una pipetta motorizzata sono stati aggiunti 14 mL di H<sub>2</sub>O distillata.

I reattori sono stati suddivisi in 10 gruppi, ciascuno costituito da 4 ripetizioni nelle medesime condizioni. L'allestimento di più repliche permette di valutare un risultato medio e quindi ridurre gli effetti che variabili incontrollabili possano provocare sugli esiti dell'esperimento. Il primo gruppo rappresenta il controllo al quale è stato addizionato ulteriormente 1 mL di H<sub>2</sub>O distillata, mentre ai successivi 9 gruppi è stato aggiunto 1 mL della rispettiva miscela, ciascuna in tre differenti diluizioni. I volumi delle miscele CG, C4 e HC da utilizzare per 30 g di inoculo sono state raccomandate dalla società di consulenza S&C Best che partecipa al progetto e sono rispettivamente 40 µL, 48 µL e 80 µL in 1 mL di soluzione acquosa. Rispetto ai valori consigliati, per ciascuna miscela sono state considerate anche diluizioni del 20% e del 500% (Tabella 2) per verificare la dipendenza della produzione di biogas non solo dalla presenza e composizione delle miscele testate ma anche dalla loro concentrazione. Le miscele sono state fornite ad una concentrazione troppo elevata per essere dosate con precisione, di conseguenza per ciascun gruppo di reattori è stata preparata un'unica soluzione acquosa contenente un volume di miscela enzimatica correttamente scalato di un fattore 5x.

**Tabella 2.** Preparazione dei reattori *batch*.

Numerazione reattori	Condizione	V miscela addizionata (µL)
1 - 4	Controllo	-
5 - 8	20% CG	8
9 - 12	100% CG	40
13 - 16	500% CG	200
17 - 20	20% C4	16
21 - 24	100% C4	80
25 - 28	500% C4	400
29 - 32	20% HC	9,6
33 - 36	100% HC	48
37 - 40	500% HC	240

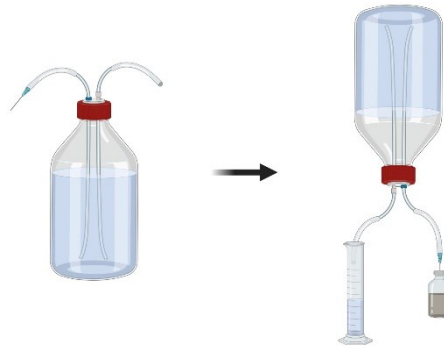
Per poter condurre delle analisi a conclusione dell'esperimento, la medesima condizione dei reattori di controllo al tempo T0 è stata riprodotta in una falcon e conservata in freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Ad ogni reattore è stata aggiunta un'ancoretta magnetica per mantenere omogeneo l'inoculo durante l'esperimento, simulando il rimescolamento dell'impianto su larga scala. Per garantire le condizioni di anossia richieste dalla digestione anaerobica è stato flussato  $\text{N}_2$  nell'inoculo per 2 min. Dopo aver chiuso ermeticamente i reattori con un tappino in butirrile sigillato da un cappuccio in alluminio, è stato flussato  $\text{N}_2$  per 2 min anche nel volume di testa, penetrando il tappo di gomma con due aghi da siringa: il primo (*input*) è connesso alla bombola di  $\text{N}_2$  e il secondo (*output*) permette la fuoriuscita dell'aria contenuta nel reattore. Dopo aver flussato si rimuovono i due aghi e si procede bucando rapidamente il tappino per rilasciare l'eventuale sovrappressione di  $\text{N}_2$  e uniformare i reattori alla pressione atmosferica. I reattori infine sono stati incubati a  $37^{\circ}\text{C}$  su agitatori magnetici multi-posizione. Per 21 sessioni, ogni 2 – 3 giorni si è proceduto alla misurazione del volume di biogas prodotto e alla valutazione della sua composizione.

### **3.3. Analisi quantitativa e qualitativa del biogas prodotto**

Per quantificare il volume di biogas prodotto si è utilizzato il *water displacement method* (Figura 3). L'apparato consiste in una bottiglia da 500 mL riempita con una soluzione salina ( $\text{NaCl}$  25%) alla quale sono state aggiunte 3 gocce di  $\text{HCl}$  puro. La bottiglia è sigillata da un tappo dal quale dipartono due tubi in PVC. Il primo ha l'estremità aperta ed inserita in un cilindro graduato mentre l'estremità del secondo è saldata ad un ago da siringa, il quale viene utilizzato per perforare il tappino di gomma del reattore connettendo così il volume di testa con quello della bottiglia. Non appena si penetra il tappino, la bottiglia deve essere sollevata dal piano di lavoro e mantenuta a testa in giù finché si osserva uno spostamento di soluzione acquosa verso il cilindro, il cui volume viene registrato su un documento *MS Excel*<sup>TM</sup>. Questa tecnica si basa sull'assunto che il biogas prodotto, essendo in sovrappressione, fluisce nel volume di testa della bottiglia determinando una variazione di forze che trova equilibrio nella fuoriuscita di un certo volume di soluzione pari al volume in sovrappressione del biogas prodotto nel reattore.

Una volta eseguita la quantificazione, il volume di testa del reattore torna in equilibrio con la pressione atmosferica. Ciò è utile ai fini dell'esperimento perché l'aumento progressivo della pressione avrebbe rallentato ed infine inibito la produzione di biogas.



**Figura 3.** Illustrazione della procedura del *water displacement method*, realizzata con *Biorender*.

Solo successivamente alla misurazione del volume si è proceduto all'analisi della composizione del biogas tramite gascromatografo *Agilent 490 Micro GC* governato dal software *Soprane II*. Per procedere con la misurazione si connette lo strumento al reattore tramite un tubo di metallo che termina con un ago da siringa. È necessario che il primo reattore di ciascun gruppo venga analizzato due volte di seguito per evitare che residui di gas del gruppo precedente siano ancora presenti nello strumento, inquinando le rilevazioni successive. Ogni nuova giornata di misurazioni si è considerato come primo reattore della serie quello successivo rispetto alla giornata precedente, cosicché da evitare che il doppio prelievo crei dei *bias* per il primo reattore del gruppo. Per ogni reattore ci si appunta su un apposito documento *MS Excel™* la concentrazione relativa di  $\text{CH}_4$  e di  $\text{CO}_2$ , forniti dal software. È importante valutare anche la presenza di  $\text{O}_2$ , il quale potrebbe essere entrato nei reattori durante la misurazione del volume o in seguito alle numerose perforazioni del tappino. L'ossigeno infatti non solo inquina l'ambiente anossico pregiudicando la produzione di biogas ma altresì riduce in termini percentuali la composizione degli altri gas, inquinando i dati.

A conclusione dell'esperimento, è stato deciso di conservare ciascun inoculo a  $-80^\circ\text{C}$  per permettere in futuro di studiare la composizione degli *spent substrates* rispetto alla condizione di controllo e al tempo  $T_0$ , affinando la qualità dell'analisi.

### 3.4. Elaborazione dei dati

Per poter procedere con l'analisi dei risultati è necessario dapprima calcolare il volume specifico di metano prodotto in ciascuna condizione sperimentale. Tale procedimento è riassunto nell'1. La variazione del volume di metano prodotto ad ogni misurazione ( $\Delta V_M(t)$ ) è ottenuta moltiplicando la variazione del volume di biogas ( $\Delta V_B(t)$ ), misurata con il *water displacement method*, per la concentrazione relativa di metano ( $C_M(t)$ ) ricavata per gascromatografia. A questi valori è necessario sommare anche la quantità di metano residua nel volume di *headspace* ( $H$ ), in equilibrio con la pressione atmosferica per cui non rilevabile dal *water displacement method*. L'*headspace*, o volume di testa è di 75 mL corrispondenti al volume totale del reattore (120 mL) a cui è sottratto il *working volume* (45 mL), ottenuto dalla somma del volume dell'inoculo (la cui densità è stata approssimata ad 1 g/cm<sup>3</sup>) al volume della soluzione acquosa. La tecnica prevede necessariamente che dopo ogni misurazione rimanga sempre un certo volume di biometano nel volume di *headspace* che deve essere sottratto dalla misurazione successiva. Infine, si sommano le variazioni dei volumi di biometano prodotti ad ogni misurazione per ottenere il volume cumulativo di biometano in funzione del tempo ( $M_{cum}(t)$ ) per ciascun reattore. Per ogni gruppo di reattori nella medesima condizione si è calcolato il valore medio ( $\bar{M}_{cum}(t)$ ), il cui andamento è stato rappresentato graficamente, associando ciascuna quantità alla deviazione standard.

$$\Delta V_M(t) = (\Delta V_B(t) + H)C_M(t) - HC_M(t - 1) \quad (1)$$

Per ciascuna condizione, la produttività totale ( $TP$ ) rappresenta il volume totale di biometano che è stato prodotto nel corso dell'esperimento e coincide con  $\bar{M}_{cum}$  nell'ultimo giorno di misurazione.

La produttività specifica ( $q_p$ ) quantifica la velocità media di produzione del gas ed è stata calcolata con l'2.

$$q_p = \frac{TP}{21 \text{ giorni}} \quad (2)$$

È stato studiato anche l'andamento della composizione del biogas durante l'esperimento, calcolando in funzione del tempo la concentrazione relativa di metano ( $P_M(t)$ ) riferita al volume cumulativo di biogas ( $B_{cum}(t)$ ).

Per ogni gruppo di reattori è stato calcolato il valore medio ( $\bar{P}_M(t)$ ), il cui andamento è stato rappresentato graficamente, associando ciascuna misura alla deviazione standard.

$$P_M(t) = \frac{M_{cum}(t)}{B_{cum}(t)} \quad (3)$$

Per studiare la cinetica del processo, è stata calcolata la velocità istantanea di reazione intesa come il tasso di produzione del metano nell'unità di tempo.

$$v(t) = \frac{\Delta V_M(t)}{\Delta t} \quad (4)$$

## 4. Risultati e discussione

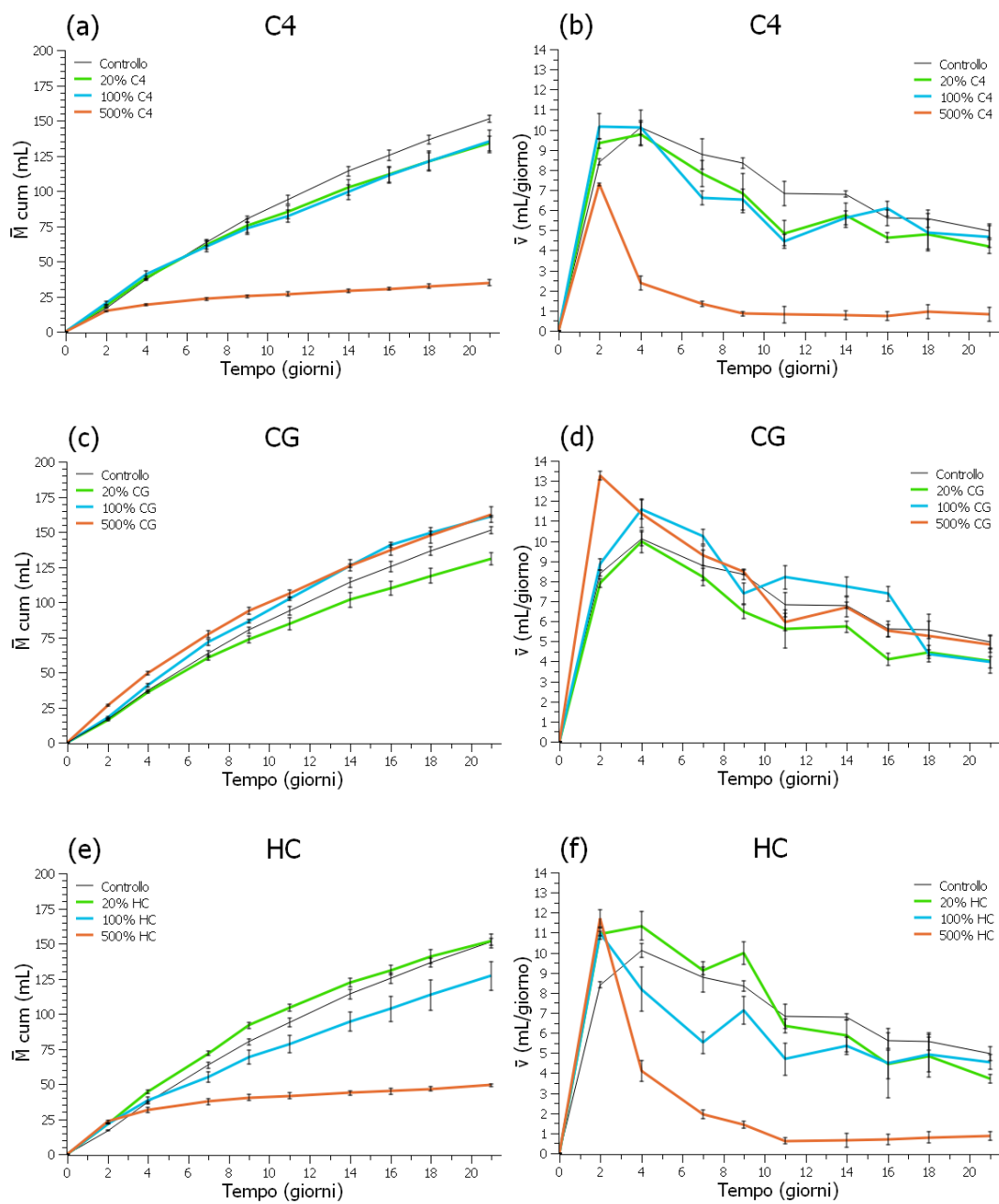
### 4.1. BMP in presenza di tre miscele enzimatiche

La miscela che ha dimostrato *performance* globalmente superiori è stata CG, costituita in prevalenza da pectinasi (Tabella 3). La diluizione ottimale tra quelle testate è del 100%, pari al suggerimento dell'azienda. Tale condizione in 21 giorni di fermentazione ha prodotto in totale  $161 \pm 1$  mL di metano ad una concentrazione del  $59,2 \pm 0,3$  % rispetto i  $151 \pm 3$  mL ( $58,8 \pm 0,1$  %) della condizione senza enzimi. La variazione percentuale della produttività totale è del 5 – 8 %, mentre per la concentrazione è compresa tra - 1 % e 2 %. La produzione media giornaliera di CG 100% è stata di circa 7,7 mL/giorno, un aumento del 5 – 8 % rispetto alla produzione in assenza di enzimi di  $7,2 \pm 0,1$  mL/giorno. Ricerche bibliografiche sui trattamenti enzimatici dimostrano come i risultati ottenuti non siano propriamente prosperosi. Tuttavia, ricordando le finalità meramente qualitative dello studio, la variazione percentuale ottenuta è sufficientemente significativa per considerare soddisfacente l'esito dell'esperimento.

**Tabella 3.** Riassunto dei risultati.

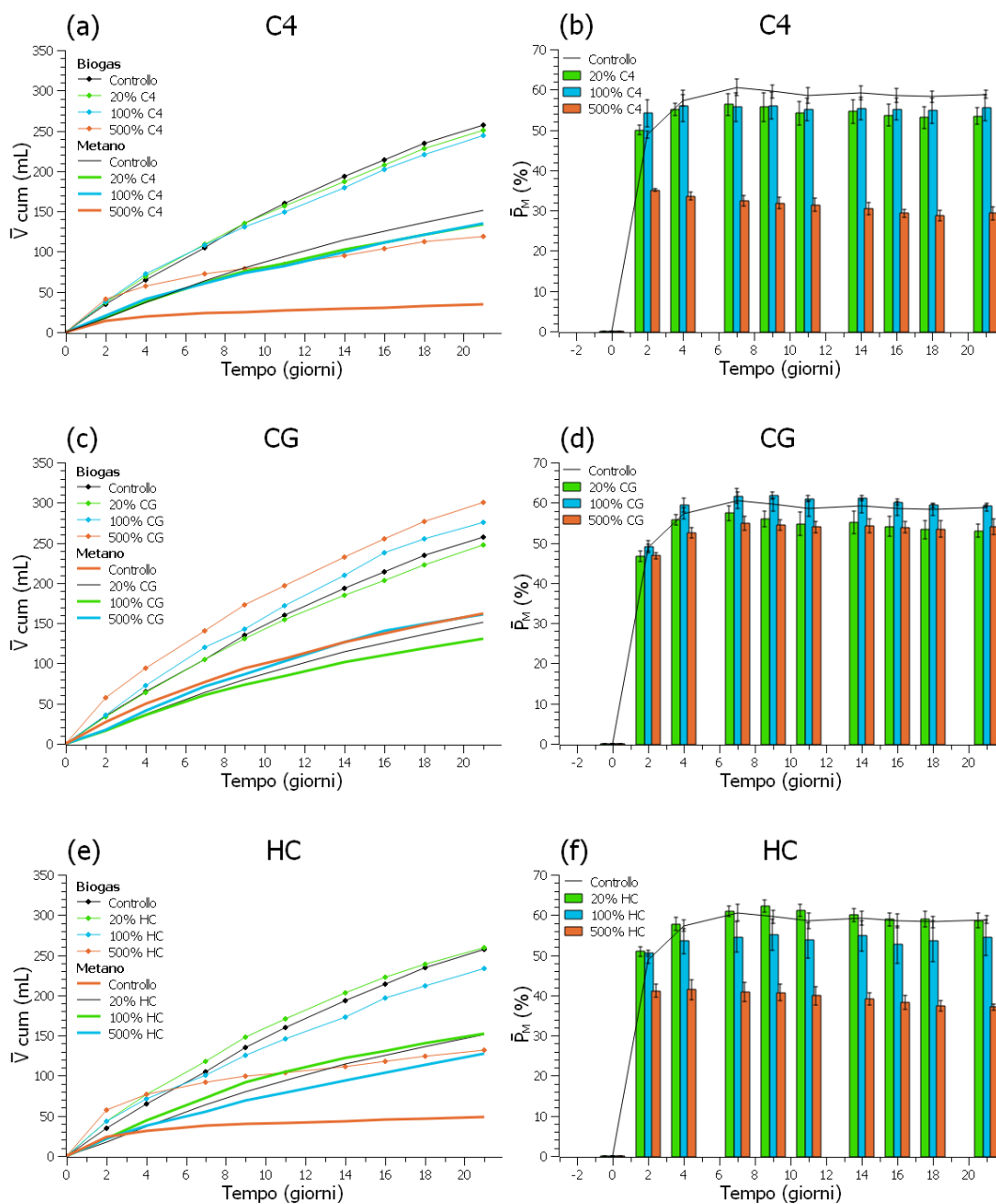
Parametro	U.M.	No Enz	C4 20%	C4 100%	C4 500%	CG 20%	CG 100%	CG 500%	HC 20%	HC 100%	HC 500%
TP	mL	151	133	135	34	130	161	162	151	127	49
$\bar{P}_M$ finale	%	58,8	53,4	55,4	29,3	53,0	59,2	54,0	58,6	54,4	37,1
$q_P$	mL/day	7,2	6,4	6,4	1,7	6,2	7,7	7,7	7,2	6,0	2,3
$v_{max}$	mL/day	10,1	9,8	10,2	7,3	10,0	11,6	13,3	10,9	11,0	11,7

Note: in *verde* sono riportati i migliori risultati per ciascun parametro mentre in *rosso* i peggiori.



**Figura 4.** A sinistra sono riportati gli andamenti dei valori medi dei volumi cumulativi di biometano ( $\bar{M}_{cum}(t)$ ) prodotti dai reattori addizionati rispettivamente con C4 (a), CG (c) e HC (e). A destra sono riportati gli andamenti delle velocità istantanee di produzione del biometano ( $\bar{v}(t)$ ) riferite rispettivamente alle condizioni C4 (b), CG (d) e HC (f).





**Figura 5.** A sinistra sono riportati gli andamenti dei valori medi dei volumi cumulativi di biometano ( $\bar{M}_{cum}(t)$ ) confrontati con i corrispondenti valori medi dei volumi cumulativi di biogas ( $\bar{B}_{cum}(t)$ ) prodotti dai reattori addizionati rispettivamente con C4 (a), CG (c) e HC (e). A destra sono riportati gli andamenti delle concentrazioni del biometano ( $\bar{P}_M(t)$ ) riferite rispettivamente alle condizioni C4 (b), CG (d) e HC (f).

Come è riportato in *Figura 4.*, ad esclusione delle condizioni 500% C4 e 500% HC, al 21° giorno le produzioni di biogas non sono mai giunte a *plateau* benché prossime all'esaurimento, come suggeriscono gli andamenti delle velocità di reazione. Il protocollo però prevede che l'esperimento sarebbe dovuto continuare ulteriormente fino alla cessazione dell'attività

metanogenica e quindi al *plateau* per tutte le condizioni, giungendo all'esaurimento dei nutrienti disponibili. Il rischio è di non riuscire ad ottenere una visione completa sul processo degradativo, escludendo dalla valutazione gli effetti a lungo termine dei trattamenti. Nonostante ciò, le informazioni ottenute sono state sufficienti per trarre delle conclusioni utili ai fini della valutazione. Infatti, si è ipotizzato che, vista la solidità degli andamenti dei parametri considerati, la continuazione dell'esperimento avrebbe portato alle medesime conclusioni.

#### **4.2. L'effetto inibente causato da elevate concentrazioni delle miscele enzimatiche adottate**

Dai risultati riportati in *Tabella 3* e nelle *Figura 4.* e *Figura 5.*, è possibile ipotizzare che, alle più alte concentrazioni adottate, le miscele enzimatiche abbiano inibito, e non sostenuto, la produzione di metano. Probabilmente, ciò è imputabile ad un'eventuale attività inibitoria provocata dai costituenti (sali, coadiuvanti ecc.) dei prodotti commerciali impiegati in questo studio.

Al termine dell'esperimento, nei reattori 500% C4 (*Figura 4.a*) e 500% HC (*Figura 4.e*) la produttività totale di metano è spiccatamente esigua. Nientemeno eclatante è la diminuzione, per la quasi totalità delle condizioni, della produttività totale rispetto alla situazione priva di miscela. È evidente che per queste condizioni l'aggiunta delle miscele degradative abbia esercitato sul *pathway* della digestione anaerobica un effetto tutt'altro che stimolante. Questo effetto inibente, vista la coerenza con la quale si manifesta e la significatività statistica del dato, non è attribuibile alla casualità naturale ma si suppone sia conseguenza più o meno diretta della formulazione somministrata. In *Figura 4.e* è possibile apprezzare perfino una chiara dipendenza diretta tra la concentrazione di miscela HC e l'effetto inibente.

L'eventualità che tale fenomeno sia spiegabile attribuendo la totale difettosità alle miscele non è soddisfacente. Si ipotizza infatti che l'effetto stimolante sia comunque partecipe ma nella maggior parte delle condizioni l'aumentata disponibilità di nutrienti non è sufficiente a contrastare l'effetto inibente, comportando un calo delle capacità metanogeniche dell'inoculo. Nel caso di CG (*Figura 4.c*) è plausibile la presenza di un effetto inibente molto più tenue rispetto alle altre due miscele. Si suppone che in questa

circostanza, più elevata è la concentrazione di enzima e più la disponibilità ampliata di nutrienti è in grado di contrastare l'effetto inibente, stabilendo l'unico caso in cui è osservabile un aumento della produzione di metano rispetto alla condizione senza enzimi, seppur molto lieve.

Si evidenzia che queste affermazioni puramente speculative non possono essere confermate soltanto da suddette osservazioni. Si ritengono necessari studi più approfonditi sulla formulazione delle miscele e sull'effetto che hanno le singole componenti sul potenziale metanigeno dell'inoculo.

#### **4.3. Impatto sulla metanogenesi delle miscele enzimatiche adottate**

Dai risultati esposti nella *Tabella 3* si coglie che quando le miscele aumentano la produttività totale e specifica rispetto alla condizione senza enzimi, non corrisponde mai un aumento tanto elevato nella concentrazione di metano. Viceversa, dove si è verificata una riduzione della produttività anche la concentrazione è diminuita vigorosamente. Difatti, risulta che 100% CG accresce la produzione di biogas senza effettivamente aumentare l'efficienza della via metanogenica in quanto la concentrazione di biometano risulta pressoché invariata. La presenza di nutrienti aggiuntivi si traduce sia in un aumento della produzione di metano che di anidride carbonica, conservando i rapporti nelle concentrazioni. Si evidenzia così la caratteristica "ad imbuto" del *pathway* della digestione anaerobica descritta da Campanaro et al. (2016) [10] per cui un aumento dei nutrienti primari determina a cascata l'incremento della resa di tutto il processo, fintanto che i prodotti intermedi vengono consumati.

Le precedenti affermazioni sono corroborate dai dati rappresentati nelle *Figura 5.c* e *Figura 5.d*. All'aumentare della concentrazione della miscela CG, si osserva una crescita nella produzione di biogas che non è corrisposta al medesimo aumento nella produzione di biometano. Difatti, l'inibizione della produzione di biogas alla diluizione del 20% è significativamente più lieve rispetto alla diminuzione della produzione di biometano. A questo si aggiunge l'osservazione che 500% CG ha determinato un forte aumento della produttività totale di biogas ma un lieve rialzo nella produzione di biometano, tanto che il suo andamento coincide con la condizione al 100%. Si ipotizza, quindi, che per CG l'effetto

inibente sia stato più impattante sulla metanogenesi piuttosto che sulle altre reazioni della digestione anaerobica. Pertanto, si evince che l'introduzione di 100% CG nei processi di biodigestione dei residui agro-alimentari non è indicata per la produzione di un biogas più arricchito in biometano, bensì eventualmente per l'aumento della sua produttività totale e specifica.

Si suppone che anche per le miscele C4 e HC l'effetto inibente impatti principalmente la metanogenesi. Da quanto si evince dalle *Figura 4.b* e *Figura 4.f* ma anche *Figura 5.b* e *Figura 5.f*, per le diluizioni al 500% (dove l'effetto inibente è più forte) la produzione di metano essenzialmente si arresta nonostante la generazione di biogas continui, seppur rallentata, riflettendosi in un andamento decrescente della concentrazione di biometano.

#### **4.4. Impatto sulla cinetica produttiva di metano da parte delle miscele enzimatiche adottate**

A causa della precocità nella conclusione dell'esperimento, risulta difficile giudicare gli effetti sulle cinetiche di reazione senza rischiare di commettere valutazioni parziali. Tuttavia, è possibile riscontrare che la riduzione della produttività totale di biometano è generalmente corrisposta ad una diminuzione dell'andamento della velocità istantanea di reazione (*Figura 4*). L'effetto inibente non soltanto ha comportato una riduzione della capacità metanogenica dell'inoculo in termini di produttività ma ha altresì causato un rallentamento più o meno manifesto delle velocità di reazione. È importante notare che laddove l'effetto inibente è stato più impattante, nei primissimi giorni di digestione la correlazione non è osservabile. Difatti, le miscele 500% C4 (*Figura 4.b*) e 500% HC (*Figura 4.f*) hanno impresso una velocità iniziale molto elevata, paragonabile alle altre diluizioni se non superiore. Tuttavia, la forte velocità iniziale non si è sostenuta per l'intero processo, tanto che dopo il settimo giorno si è pressoché estinta. Sono richiesti studi ulteriori per spiegare la ragione scientifica del fenomeno.

Nonostante 500% CG (*Figura 4.d*) abbia causato l'aumento più consistente della velocità iniziale di reazione, si è assestata agli stessi valori della condizione priva di enzimi dimostrando nuovamente la superiorità della diluizione 100%, la cui velocità di reazione si è sostenuta a valori mediamente più alti per la maggior parte dell'esperimento.

Stabilito che la miscela 100% CG tra quelle testate favorisce maggiormente la digestione di inoculi ricchi di materiale lignocellulosico, come continuazione di questo esperimento si prevede la valutazione delle *performance* della miscela con un digestante più ricco in materia lignocellulosica.

## 5. Conclusioni

Dai dati ottenuti risulta che, tra quelle testate, la miscela di pectinasi 100% CG è la più adatta a favorire la degradazione della materia lignocellulosica del digestante in esame, in quanto ha incrementato efficacemente la produttività totale, la produttività specifica e la cinetica di reazione. Tuttavia, il mancato incremento della concentrazione di biometano rispetto al controllo suggerisce che l'impiego di 100% CG non è adatto all'eventuale scopo di produrre biogas più ricco in CH<sub>4</sub>. Contrariamente a 100% CG, le altre miscele e diluizioni testate hanno generalmente ridotto le capacità produttive dell'inoculo, rivelando che l'esito del trattamento dipende dalla strategia degradativa selezionata, dalla concentrazione della soluzione enzimatica e dei suoi costituenti accessori, i quali potrebbero raggiungere livelli inibenti per i microrganismi.



## 6. Bibliografia

- [1] Chen X. Y. et al., 'Membrane gas separation technologies for biogas upgrading', *RSC Adv.*, vol. 5, no. 31, pp. 24399–24448, Mar. 2015, doi: 10.1039/C5RA00666J.
- [2] Frigon J.-C. and Guiot S. R., 'Biomethane production from starch and lignocellulosic crops: a comparative review', *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 4, no. 4, pp. 447–458, Jul. 2010, doi: 10.1002/bbb.229.
- [3] Angelidaki I. and Kougiaris P. G., 'Biogas and its opportunities – A review', *Front. Environ. Sci. Eng.*, vol. 12, no. 3, pp. 1–12, Jun. 2018, doi: 10.1007/s11783-018-1037-8.
- [4] Adekunle K. F. and Okolie J. A., 'A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion', *Advances in Bioscience and Biotechnology*, vol. 6, no. 3, Art. no. 3, Mar. 2015, doi: 10.4236/abb.2015.63020.
- [5] Christy P. M. et al., 'A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 34, pp. 167–173, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.rser.2014.03.010.
- [6] Koch K. et al., 'The role of inoculum's origin on the methane yield of different substrates in biochemical methane potential (BMP) tests', *Bioresource Technology*, vol. 243, pp. 457–463, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.142.
- [7] Rimika K. et al., 'Valorization of agricultural waste for biogas based circular economy in India: A research outlook', *Bioresource Technology*, vol. 304, p. 123036, May 2020, doi: 10.1016/j.biortech.2020.123036.
- [8] Lehtomäki A. and Björnsson L., 'Two-Stage Anaerobic Digestion of Energy Crops: Methane Production, Nitrogen Mineralisation and Heavy Metal Mobilisation', *Environmental Technology*, May 2010, doi: 10.1080/09593332708618635.
- [9] Angelidaki I. et al., 'Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for *batch* assays', *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, vol. 59, no. 5, 2009, doi: 10.2166/wst.2009.040.
- [10] Campanaro S. et al., 'Metagenomic analysis and functional characterization of the biogas microbiome using high throughput shotgun sequencing and a novel binning strategy', *Biotechnol Biofuels*, vol. 9, no. 1, Art. no. 1, Dec. 2016, doi: 10.1186/s13068-016-0441-1.