



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN ENERGIA E AMBIENTE  
*PhD Program in ENERGY and ENVIRONMENT*

*XXXV Cycle*

Trattamenti per la valorizzazione energetica ed  
ambientale dei sottoprodotti dell'industria  
olearia

*PhD Thesis*

Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie per l'Innovazione Industriale  
Facoltà di Ingegneria Civile e Industriale  
Dipartimento di Ingegneria Astronautica, Elettrica ed Energetica

**Fabio Girardi**

Advisor  
Prof. Ing. Gianfranco Caruso

Co-Advisor/Tutor  
Prof. Ing. Romolo Remetti

A.A. 2021-2022

## PREMESSA

Nel primo anno di Dottorato un evento di portata planetaria, il diffondersi di una pandemia, ha influenzato oltre che la vita della maggioranza della popolazione mondiale, anche le attività di ricerca.

In linea con il primo tema di ricerca proposto dal titolo: “Tecniche di fitodepurazione per il recupero di matrici ambientali contaminate da radionuclidi”, nei primi mesi del 2020 sono state svolte attività sperimentali eseguendo dei test in condizioni idroponiche. Era stato individuato come organismo sperimentale una pianta di rilevanza economica dalle proprietà iperaccumulatrici: la colza (*Brassica napus* L.).

La colza è un organismo capace di assimilare elementi di interesse radiologico (nel caso preso in esame, il cesio) e generare prodotti (oli vegetali) non contaminati ed impiegabili per la fabbricazione di biocarburanti (biodiesel). Le prove, volte a determinare la capacità di fitorisanamento delle acque contaminate da cesio da parte della colza, sono state effettuate seguendo un disegno sperimentale basato sull'uso delle superfici di risposta attraverso la metodica del *Central Composit Design* (CCD). Il CCD è stato utilizzato al fine di massimizzare l'assunzione del Cesio da parte delle piante in funzione dei diversi tenori di Cesio e Potassio presenti nelle soluzioni di crescita (Hoagland modificata) secondo un disegno sperimentale a 2 fattori.

Purtroppo nelle fasi iniziali dei test idroponici si sono riscontrati problemi tecnici quali: piante estremamente fragili, mortalità elevata, crescita lenta e capacità di assorbimento degli elementi nutritivi piuttosto modesta che hanno indotto ad un ripensamento della linea di ricerca. Non è stato possibile trovare soluzioni tecniche per la risoluzione dei problemi presentatisi in quanto il periodo di *lockdown* ha, di fatto, bloccato le prove.

Coerentemente con gli argomenti del Dottorato, dopo una approfondita analisi bibliografica, è stato individuato un nuovo tema di ricerca che si è proposto di valorizzare i residui solidi dell'industria olearia; le sanse (ovvero la parte solida residuale dell'oliva dopo il processo di estrazione dell'olio) ed in particolar modo, le sanse umide.

Tale argomento è stato selezionato in quanto, nell'ottica dell'economia circolare, sono di grande interesse le attività di ricerca volte a promuovere soluzioni in grado di agevolare l'uso di fonti energetiche rinnovabili e, nel contempo, capaci di ridurre gli impatti ambientali dei diversi comparti industriali e, nel caso preso in esame, di un importante comparto agroindustriale europeo e mediterraneo.

La parte sperimentale di quello che è stato poi effettivamente il tema del presente Dottorato di Ricerca, inoltre, ha previsto l'esecuzione di prove di tipo chimico e biotecnologico che, al contrario delle coltivazioni idroponiche, non richiedono cure costanti. In un clima di incertezza legato alla pandemia le prove sperimentali relative alle sanse potevano “sopportare” eventuali periodi di sospensione senza compromettere eccessivamente l'attività di ricerca.

## RINGRAZIAMENTI

Al termine di questi 3 anni i miei ringraziamenti e la mia gratitudine vanno:

A Francesco Petrazzuolo, senza la sua assistenza, guida, generosità e professionalità questo lavoro non avrebbe mai potuto vedere la luce.

Ai miei Tutor e Co-Tutor, per il sostegno e l'autonomia concessami durante tutto il periodo di dottorato: Prof. Gianfranco Caruso e Prof. Romolo Remetti.

Ai coautori dell'articolo: Prof. Nicola D'Alessandro, Dr. Giuseppe Augusto Marzo, Prof.ssa Lucia Tonucci e Dr. Andrea Mascitti che hanno contribuito in modo sostanziale alla parte sperimentale.

Alla mia famiglia: Mamma, Giada e Francesca.

A tutte quelle persone che a vario titolo mi hanno aiutato, devo ritenermi davvero fortunato di averle nella mia vita. Le nominerò soltanto per nome tanto loro si riconosceranno: Alessandra, Arnaldo, Nicola, Daniele, Davide e Nadia.

Ai colleghi dell'ENEA che mi hanno supportato e "sopportato".

Soprattutto dedico questa Tesi a mio padre, che, anche se non c'è più, ha sempre creduto in me. Grazie Papà!

#### ATTIVITÀ EFFETTUATE DURANTE IL DOTTORATO DI RICERCA:

Corsi frequentati. È stato seguito dal 14/10/2020 al 25/11/2020, con presentazione di un poster, il corso “*Joint ICTP-IAEA International School on Radioactive Waste Cementation*” erogato in modalità *on-line* dal *Abdus Salam International Centre for Theoretical Physics (ICTP)* di Trieste in collaborazione con la *International Atomic Energy Agency (IAEA)*. Pagina web: <http://indico.ictp.it/event/9129/>

Convegni: I risultati della sperimentazione sulle sanse a due fasi sono stati illustrati con una presentazione orale al convegno internazionale SYNC2022. *The First Symposium for YouNg Chemists: Innovation and Sustainability (SYNC2022)* - *Sapienza University of Rome, Department of Chemistry* - Rome, 20-23 June 2022. Pagina web: [www.sync2022rome.org/](http://www.sync2022rome.org/)

Articoli: I risultati dell'attività di ricerca hanno portato alla pubblicazione del seguente articolo: Girardi, F., Mascitti, A., D'Alessandro, N., Tonucci, L., Marzo, G.A., Remetti, R., 2022. Effects of oxidative treatments on biomethane potential of solid olive residues. *Waste and Biomass Valorization*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01987-4>

## ELENCO ABBREVIAZIONI

---

ARO	Acque Reflue Olearie
AMPTS II	Automatic Methane Potential Test System II
AV	Acque di Vegetazione
BHP	Biochemical Hydrogen Potential - Potenziale Biochimico di Idrogeno
BMP	Biochemical Methane Potential - Potenziale Metanigeno
BOD <sub>5</sub>	Biochemical Oxygen Demand - Domanda Biochimica di Ossigeno
COD	Chemical Oxygen Demand - Domanda Chimica di Ossigeno
CSTR	Continuous Stirred Tank Reactor - Reattore Continuo Completamente Miscelato
DA	Digestione Anaerobica
DF	Dark Fermentation - Fermentazione in assenza di luce
DS	Deviazione Standard
FORSU	Frazione Organica dei Rifiuti Urbani
GC	Gasromatografo
GPR	Gas Production Rate – Velocità di Produzione del Biogas
HRT	Hydraulic Retention Time – Tempo medio di Residenza Idraulico
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometer
MP-AES	Microwave Plasma - Atomic Emission Spectroscopy - Spettrometro ad Emissione Atomica al plasma a microonde
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OHPAs	Obligate hydrogen-producing acetogens – Batteri idrogeno produttori obbligati acetogeni
OLR	Organic Loading Rate - Carico Organico Volumetrico
OMWW	Olive Mill Wastewater
PFR	Plug Flow Reactor - Processo continuo in reattore con flusso a pistone
rpm	rotazioni per minuto
SG	Sostanza Grassa
SGP	Specific Gas Production – Produzione Specifica di Gas
SRT	Solids Retention Time – Tempo medio di Residenza dei Fanghi
ST	Solidi Totali

SUD	Sansa Umida Denocciolata
SUV	Sansa Umida Vergine
SV	Solidi Volatili
TCD	Thermal Conductivity Detector
UE	Unione Europea
UR	Umidità Relativa
VDP	Variable Dynamic Pressure - Pressione Dinamica Variabile
VFA	Volatile Fatty Acid – Acidi Grassi Volatili

## INDICE FIGURE

Fig. 1. Struttura molecolare dell'Oleuropeina .....	14
Fig. 2. Schema impianto discontinuo tradizionale .....	17
Fig. 3. Distribuzione delle dimensioni dei frammenti di nocciolino in funzione di due tipologie di frangitori utilizzati. ....	24
Fig. 4. Schema di funzionamento decanter a 3 fasi .....	28
Fig. 5. Struttura dell'idrossitirosolo .....	32
Fig. 6. Diagramma di flusso per le fasi del processo di digestione anaerobica .....	42
Fig. 7. Schema generale del processo di digestione anaerobica con indicazione dei principali ceppi batterici per ciascuna fase della DA. ....	43
Fig. 8. Rappresentazione grafica della cinetica di reazione biologica.....	45
Fig. 9. Influenza della temperatura sulla velocità di digestione anaerobica .....	48
Fig. 10. Vie metaboliche per la generazione di idrogeno attraverso la DF .....	53
Fig. 11. Fasi di estrazione con il sistema Randall .....	63
Fig. 12. Profilo della temperatura di mineralizzazione.....	67
Fig.13. Retta di calibrazione per l'elemento Ferro con MP-AES.....	69
Fig. 14. Produzione cumulata di CH <sub>4</sub> delle SUV. ....	79
Fig. 15. Produzione giornaliera di CH <sub>4</sub> delle SUV. ....	80
Fig. 16. Produzione cumulata di CH <sub>4</sub> delle SUD. ....	81
Fig.17. Produzione giornaliera di CH <sub>4</sub> delle SUD .....	81
Fig. 18. Produzione cumulata di CH <sub>4</sub> delle SUV e delle SUD nei primi 28 giorni. ....	82
Fig. 19. Produzione cumulata di CH <sub>4</sub> delle SUV – Test ad alta diluizione. ....	84
Fig. 20. Produzione cumulata di H <sub>2</sub> delle SUD.....	85

## INDICE TABELLE

<b>Tab. 1.</b> - Percentuale del diametro delle gocce d'olio nella pasta d'olive dopo l'operazione di frangitura e di gramolazione. ....	23
<b>Tab. 2.</b> - Quantità e caratteristiche delle acque di vegetazione ottenute nella lavorazione delle olive in funzione delle diverse tecnologie di estrazione. ....	34
<b>Tab. 3.</b> - Caratteristiche e quantità delle sanse ottenute in funzione di differenti sistemi di estrazione dell'olio d'oliva. ....	36
<b>Tab. 4.</b> - Programmata temperature metodica HPR-AG-03. ....	66
<b>Tab. 5.</b> - MP-AES Condizioni dello spettrometro comuni a tutte le analisi. ....	68
<b>Tab. 6.</b> - MP-AES Condizioni specifiche dello strumento per ciascun elemento ....	68
<b>Tab. 7.</b> - Parametri delle prove sperimentali ....	76
<b>Tab. 8.</b> - Parametri del test di BMP ad alta diluizione delle SUV ....	77
<b>Tab. 9.</b> - Parametri test BHP ....	77
<b>Tab. 10.</b> - Principali caratteristiche delle SUV e delle SUD. ....	78
<b>Tab. 11.</b> - Andamento dei valori di pH. ....	83

## INDICE FOTO

Fot. 1. Ulivo.....	13
Fot. 2. Olive .....	14
Fot. 3. Cernita olive.....	15
Fot. 4. Operazione di mondatura .....	16
Fot. 5. Olive mondate .....	16
Fot. 6. Molazze .....	18
Fot. 7. Fiscoli .....	18
Fot. 8. Pressa con carrello e fiscoli.....	19
Fot. 9. Frangitore a martelli con carica dall'alto.....	22
Fot. 10. Particolare dell'interno di una gramolatrice in lavorazione della pasta d'olive.....	25
Fot. 11. Separatore centrifugo orizzontale meglio noto come Decanter .....	26
Fot. 12. Uscita frazioni liquide in un decanter a 3 fasi.....	29
Fot. 13. Particolare dell'uscita dell'olio da un separatore centrifugo verticale.....	30
Fot. 14. Sansa a 3 fasi in uscita dal decanter.....	37
Fot. 15. Impianto di stoccaggio sanse umide .....	37
Fot. 16. Campioni di sansa essiccati al forno a 105 °C.....	57
Fot. 17. Operazione di pesatura del campione essiccato .....	59
Fot. 18. Campioni di sansa in muffola prima della mineralizzazione .....	60
Fot. 19. Soxhtraction apparecchio per l'estrazione dei grassi attraverso il metodo Randall.....	61
Fot. 20. Sanse disidratate e pre-omogeneizzate prima di essere inserite nel mixer.....	62
Fot. 21. Fibramatic della pbi .....	64
Fot. 22. Spettrometro ad emissione atomica Agilent 4210 MP-AES.....	65
Fot. 23. Mineralizzatore a microonde START-D con accanto muffola Vulcan .....	66
Fot. 24. Visualizzazione a schermo dei <i>raw data</i> del software acquisizione del AMPTS II .....	71
Fot. 25. AMPTS II apparato sperimentale utilizzato per la misura del BMP. ....	71
Fot. 26. Unità di assorbimento dei gas acidi dell'AMPTS II.....	72
Fot. 27. SUV trattate e non trattate.....	75

## SOMMARIO

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	12
<b>2. INDUSTRIA OLEARIA EUROPEA</b> .....	13
2.1 EVOLUZIONE DELLE TECNOLOGIE ESTRATTIVE .....	15
2.2 OPERAZIONI PRELIMINARI COMUNI A TUTTE LE TECNOLOGIE DI ESTRAZIONE .....	15
2.3 TECNOLOGIE ESTRATTIVE DISCONTINUE .....	16
2.4 TECNOLOGIE ESTRATTIVE CONTINUE .....	21
2.4.1 FRANGITORI .....	21
2.5 GRAMOLAZIONE .....	23
2.6 SEPARATORI CENTRIFUGHI ORIZZONTALI – DECANTER .....	25
2.7 SEPARATORI CENTRIFUGHI VERTICALI.....	30
<b>3 SOTTOPRODOTTI DELL'INDUSTRIA OLEARIA</b> .....	32
3.1 FOGLIE DELL'OLIVO .....	32
3.2 SOTTOPRODOTTI LIQUIDI .....	33
3.3 SANSE .....	35
3.4 LINEE DI RICERCA PER LA VALORIZZAZIONE DELLE SANSE UMIDE .....	38
<b>4 DIGESTIONE ANAEROBICA</b> .....	40
4.1 INTRODUZIONE.....	40
4.2 FASI DELLA DIGESTIONE ANAEROBICA.....	41
4.3 CINETICHE MICROBIOLOGICHE DI REAZIONE .....	44
4.4 PROCESSO DI DIGESTIONE ANAEROBICA .....	46
4.5 PARAMETRI DI PROCESSO DELLA DIGESTIONE ANAEROBICA .....	46
<b>5 DARK FERMENTATION</b> .....	52
<b>6 PARTE SPERIMENTALE: GLI OBIETTIVI</b> .....	54
<b>7 MATERIALI E METODI</b> .....	56
7.1 CAMPIONAMENTO DELL' INOCULO.....	56
7.2 CAMPIONAMENTO DELLE SANSE .....	56
7.3 CARATTERIZZAZIONE SUBSTRATI.....	56
7.4 pH.....	57

7.5 DETERMINAZIONE DEI SOLIDI TOTALI .....	57
7.6 DETERMINAZIONE DEI SOLIDI VOLATILI .....	59
7.7 DETERMINAZIONE DELLA SOSTANZA GRASSA - METODO RANDALL .....	60
7.8 CONTENUTO IN FIBRE .....	63
7.9 ANALISI DEGLI ELEMENTI .....	65
7.10 ANALISI DEI FENOLI TOTALI.....	69
7.12 ZOLFO TOTALE .....	72
7.13 ANALISI DEL BIOGAS AL GASCROMATOLOGRAFO .....	73
<b>8 SET UP SPERIMENTALE .....</b>	<b>74</b>
8.1 TRATTAMENTI OSSIDATIVI.....	74
8.2 TEST DI BMP DELLE SUV AD ALTA DILUIZIONE .....	77
8.3 TEST DI BHP DELLE SUD .....	77
<b>9 RISULTATI .....</b>	<b>78</b>
9.1 PROVE DI BIOMETANAZIONE.....	79
9.2 RISULTATI DELLE PROVE DI BIOMETANAZIONE DELLE SUV .....	79
9.3 RISULTATI DELLE PROVE DI BIOMETANAZIONE DELLE SUD .....	80
9.5 RISULTATI DEL TEST DI BMP DELLE SUV AD ALTA DILUIZIONE.....	84
9.6 RISULTATI DEL TEST DI BHP DELLE SUD .....	84
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>86</b>
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>89</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>90</b>

## 1. INTRODUZIONE

Questo decennio si configura come cruciale per le Nazioni di tutto il mondo che hanno sottoscritto impegni nell'ambito della XXI Conferenza delle Parti dell'UNFCCC (COP 21). L'Unione Europea, nel quadro del summenzionato accordo di Parigi del 2015, ha fissato obiettivi ambiziosi per ridurre le emissioni nette di almeno il 55 % entro il 2030 (rispetto ai livelli del 1990) e per diventare il primo continente climaticamente neutro entro il 2050. Il *Green Deal* europeo, presentato nel dicembre 2019 dalla Commissione Von der Leyen, fissa una rigorosa *road map* per il conseguimento di un'economia circolare a impatto climatico zero, in cui la crescita economica sia dissociata dall'uso delle risorse. Secondo le previsioni della Commissione, l'economia circolare produrrà benefici netti in termini di crescita del PIL e di creazione di posti di lavoro. L'applicazione di misure di economia circolare in Europa si prevede che possa generare un aumento del PIL dell'UE di un ulteriore 0,5 % da qui al 2030 e creare circa 700'000 nuovi posti di lavoro (Commissione Europea, 2021).

L'affermarsi di modelli economici che prevedono un sempre più un massiccio ricorso al riciclo e riuso di materiali e alla produzione di energia rinnovabile presuppone che anche la comunità scientifica si impegni a ricercare soluzioni in tutti i settori produttivi e civili che permettano l'uso fonti energetiche alternative e, nel contempo, che possano ridurre gli impatti ambientali legati alla generazione di beni e servizi.

Nel settore dell'olivicoltura e dell'industria olearia, le moderne tecnologie agroindustriali per l'estrazione dell'olio d'oliva, rispetto alle tecnologie tradizionali, presentano problemi di impatto ambientale legati ai sottoprodotti solidi. Le sanse, ovvero la parte solida residua dopo l'estrazione dell'olio d'oliva, erano tradizionalmente destinate al recupero dell'olio residuale (olio di sansa) attraverso l'uso di solventi presso degli impianti industriali. L'evoluzione delle tecnologie estrattive e, in particolare, il diffondersi dei separatori centrifughi orizzontali continui, detti decanter, hanno progressivamente ridotto il valore di tali sottoprodotti. Con l'introduzione negli anni novanta di sistemi centrifughi a due fasi le sanse hanno acquisito caratteristiche tali (basso contenuto di olio residuo e tenore di umidità elevato) da non poter essere più accettate dai sansifici creando all'intero comparto produttivo un problema di gestione della biomassa generata.

Tra le tecnologie per la gestione sostenibile delle biomasse residue un posto preminente è dedicato alla digestione anaerobica. Questa opzione biotecnologica volta al recupero di energia dalla materia organica di scarto, nel caso delle sanse a due fasi è ostacolata dall'elevato contenuto fenolico in esse presenti. I fenoli infatti esercitano un'azione batteriostatica sulle comunità di microrganismi anaerobici che realizzano la produzione di biometano e di bioidrogeno.

Il lavoro della presente Tesi sperimentale si colloca nell'ambito delle ricerche volte a pretrattare i sottoprodotti dell'industria olearia ai fini della loro valorizzazione dal punto di vista energetico ed ambientale.

## 2. INDUSTRIA OLEARIA EUROPEA

L'Unione Europea (UE) è il maggior produttore, consumatore ed esportatore di olio di oliva al mondo. L'UE con i suoi 4 milioni di ettari dedicati ad oliveto, collocati principalmente nei paesi mediterranei, produce all'incirca il 67% dell'olio di oliva mondiale. La Spagna e l'Italia sono i maggiori consumatori dell'Unione, con un consumo annuo di circa 500 000 tonnellate ciascuna, mentre in Grecia si registra il consumo pro capite maggiore, con circa 12 kg pro capite all'anno. In totale, nell'UE si realizza circa il 53% del consumo mondiale (European Commission website, 2022). Questi numeri fanno intuire l'importanza dell'industria olearia nell'Unione Europea e nel bacino del mediterraneo dov'è concentrata la maggior parte della produzione mondiale.



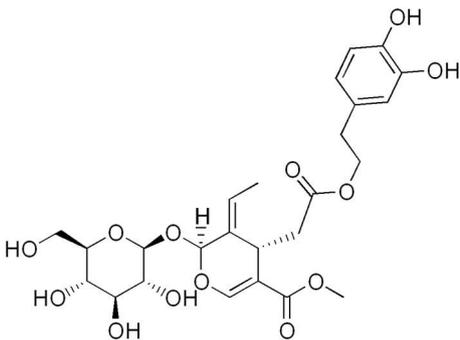
**Fot. 1.** Ulivo

La produzione dell'olio d'oliva è un processo di trasformazione industriale agroalimentare che mira ad estrarre l'olio contenuto nella drupa dell'olivo (Fot. 1) e separarlo sia dalla componente solida residua (sansa) sia dalla frazione acquosa ovvero l'acqua di vegetazione. Il frutto dell'ulivo, a seconda delle cultivar di provenienza, è una drupa dal peso estremamente variabile (0,5 – 20 g) e questo ne rende difficile la descrizione in termini medi (Fot. 2). La struttura anatomica è costituita da un epicarpo, la buccia, estremamente sottile (1,0 - 3,5% della drupa), un mesocarpo, ovvero la polpa del frutto, che rappresenta la frazione maggiore circa il 70-80% e l'endocarpo, ovvero il nocciolo, che costituisce il 15%-28% del frutto. L'endocarpo, a sua volta, contiene la mandorla che rappresenta tra il 2% ed il 4% del frutto intero (Bianchi, 2003). La drupa risulta costituita mediamente (percentuale sul peso fresco) tra il 40-70 % di acqua e le sostanze grasse variano tra 6 e il 25% (Gucci et al., 2012).



**Fot. 2.** Olive

Le cultivar destinate alla produzione di olive da mensa, tranne nel caso di varietà a duplice attitudine, generalmente presentano un contenuto in olio ridotto per unità di massa. I composti idrosolubili presenti nella frazione acquosa del frutto e che si ritrovano nell'acqua di vegetazione sono: zuccheri (glucosio, fruttosio e saccarosio), acidi organici (acidi malico, succinico, citrico e ossalico), sostanze azotate e sostanze fenoliche ed una frazione insolubile colloidale (Gucci et al., 2012). Particolare importanza riveste la frazione fenolica che include i precursori degli antiossidanti naturali che si trovano anche negli oli vergini di oliva. I composti fenolici più rilevanti presenti nella drupa in quantità elevate (dal 0,5 al 2,5% del peso fresco) sono l'oleuropeina (la cui struttura è mostrata in Fig. 1), la demetiloleuropeina ed il verbascoside; tali sostanze e i loro derivati sono anche i responsabili degli attributi sensoriali amaro e piccante dell'olio (Beauchamp et al., 2005; Panizzi et al., 1960; A. Ranalli et al., 2009). I fenoli sono concentrati in modo più consistente nell'epicarpo e nel mesocarpo mentre la mandorla li contiene in quantità molto limitate.



**Fig. 1.** Struttura molecolare dell'Oleuropeina (Fonte: Di Edgar181 - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2688191>)

Il contenuto oleoso è presente sia nella polpa sia nella mandorla all'interno dell'endocarpo, tuttavia la parte presente nelle cellule del mesocarpo risulta di gran lunga prevalente rispetto a quella del seme dove rappresenta appena 1–1,5 % del peso complessivo frutto fresco. A livello cellulare l'oliva presenta una compartimentazione peculiare in quanto la frazione lipidica risulta prevalentemente concentrata nei vacuoli ed è poco presente in forma dispersa a livello citoplasmatico, questo ne favorisce l'estrazione con soli procedimenti meccanici (Gucci et al., 2012). A tal proposito il Regolamento di esecuzione (UE) n. 29/2012 della Commissione, del 13 gennaio 2012, relativo alle norme di commercializzazione dell'olio d'oliva definisce appunto gli oli vergini ed extravergini «olio d'oliva di categoria superiore ottenuto direttamente dalle

olive e unicamente mediante procedimenti meccanici» e questo distingue le estrazioni che si eseguono nei frantoi da altri processi industriali che devono avvalersi dell'ausilio di solventi per poter recuperare il contenuto lipidico da semi e altri frutti oleaginosi. Proprio per la facilità di estrazione dell'olio attraverso processi tecnologici semplici le civiltà mediterranee hanno potuto avvalersi di questa preziosa fonte alimentare lipidica nel corso dei secoli.

Il REGOLAMENTO (CEE) N. 2568/91 DELLA COMMISSIONE dell'11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti infine ne definisce i criteri qualitativi per tutta l'Unione Europea.

## 2.1 EVOLUZIONE DELLE TECNOLOGIE ESTRATTIVE

L'elaiotecnica, ovvero la tecnica che viene usata per la lavorazione delle olive finalizzata alla produzione dell'olio comprende sostanzialmente due "grandi famiglie" di tecnologie estrattive: quelle "discontinue" basate sull'impiego di molazze e presse (di Giovacchino et al., 1994), e quelle "continue" basate su frangitori e separatori centrifughi orizzontali conosciuti come "decanter" (Luciano di Giovacchino et al., 2002). Le prime sono state le tecniche di riferimento fino agli anni settanta e ormai sono residuali in quanto soppiantate dalle tecnologie estrattive continue (Albuquerque et al., 2004). Esistono altre tecniche di minor utilizzo, quali il processo di denocciatura al posto della frangitura o la tecnologia di estrazione basata sul percolamento (ad es. Sinolea) che hanno rese non elevate e che sono legate a produzioni di nicchia, queste per ragioni di brevità non verranno riportate nella seguente trattazione.

## 2.2 OPERAZIONI PRELIMINARI COMUNI A TUTTE LE TECNOLOGIE DI ESTRAZIONE

Le operazioni preliminari, comuni a tutte le tecnologie estrattive, hanno l'obiettivo di preparare le olive inviate al frantoio prima delle operazioni di frangitura o di molitura vere e proprie. Tra queste annoveriamo la cernita, generalmente effettuata attraverso l'impiego di vagli e aspiratori in grado di rimuovere corpi estranei presenti insieme alle olive (ad es. rametti, pietrame, terriccio, foglie) (Fot. 3), la pesatura, lo stoccaggio e il lavaggio con lavatrici industriali (Fot. 4). Le olive mondate (Fot. 5) vengono avviate alle successive operazioni meccaniche di estrazione (Ranalli et al., 1997).



**Fot. 3.** Cernita olive (Fonte: CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1383700>)



**Fot. 4.** Operazione di mondatura (Fonte: CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1416734>)

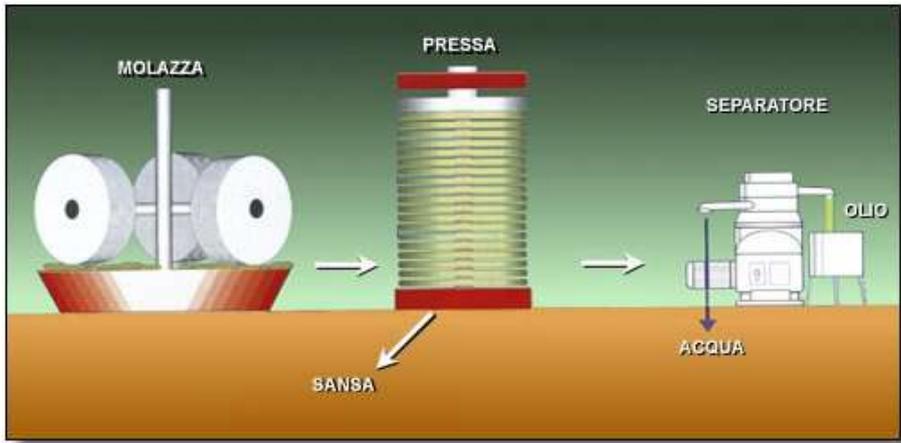


**Fot. 5.** Olive mondate (Fonte: CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1416781>)

### 2.3 TECNOLOGIE ESTRATTIVE DISCONTINUE

Le tecnologie discontinue rappresentano le tecniche tradizionali di estrazione (Fig. 2) e si basano, nei propri elementi essenziali, sull'uso di molazze e presse. La molazza deriva dalle classiche macine in pietra ed è costituita da due o più ruote di granito, o altri materiali litoidi similari, che effettuano una rotazione sui frutti mondati. La fuoriuscita della fase liquida presente nel frutto avviene principalmente grazie all'azione dei

noccioli che, per merito degli spigoli aguzzi dei loro frammenti, favoriscono la rottura dei lipovacuoli presenti nella polpa.



**Fig. 2.** Schema impianto discontinuo tradizionale (Fonte: Amirante, 2013)

La molazza ha, perciò, il compito essenziale di frangere il frutto dell'ulivo, ed in particolare il suo nocciolo, oltre ad effettuare il rimescolamento ed una prima lavorazione della pasta di olive; ovvero il composto semisolido ottenuto dallo schiacciamento dei frutti dove sono presenti ancora tutte le frazioni liquide e solide del frutto (Fot. 6). Proprio la continua lavorazione della pasta, oltre alla rottura della drupa, è l'azione meccanica più importante svolta dalle molazze grazie all'ausilio di raschiatori e pale mescolatrici. In antichità la molitura classica sfruttava la trazione animale e la ruota veniva mossa per mezzo di muli o cavalli attraverso l'uso di un braccio ad essi collegato. Attualmente la molazza, dove ancora utilizzata, viene azionata da un motore che, oltre ad essere meno ingombrante, permette un ciclo di lavorazione più continuo e regolare. La vasca dov'è collocata la molazza è costituita solitamente da granito o acciaio e la principale caratteristica tecnica è quella di poter regolare lo scalzo ovvero lo spazio che intercorre proprio tra la ruota della macina e la superficie della vasca, in modo da ottenere frammenti del nocciolo di dimensioni e quantità adeguate in funzione delle caratteristiche e dimensioni delle drupe che si stanno lavorando. La pasta d'oliva con questa tecnica viene lavorata di norma dai quindici ai trenta minuti, tempo in cui è possibile trattare circa 3 – 4 quintali di olive e ottenere una quantità di pasta adeguata al riempimento di una pressa idraulica che costituisce, dopo una breve gramolatura, il secondo passaggio nel processo di estrazione discontinuo.



**Fot. 6.** Molazze (Fonte: Arnaldo Serraiocco - CREA)



**Fot. 7.** Fiscoli (Fonte: CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1416627>)

I fiscoli, nel metodo classico, sono una componente essenziale per l'estrazione dell'olio d'oliva. Le prime tipologie erano realizzate in fibra di cocco e/o in altri materiali di origine vegetale formati da un doppio disco filtrante legato ai margini e forato al centro (Fot. 7). Quelli tuttora in produzione sono costituiti, per esigenze organizzative e standard qualitativi più elevati, da diaframmi circolari in fibra sintetica di polipropilene per

alimenti. I setti filtranti permettono, attraverso l'applicazione di una pressione, la separazione delle frazioni liquide della pasta d'olive, dette mosto oleoso (olio + acqua di vegetazione) dalla frazione solida. La pressione viene esercitata con una pressa idraulica aperta disponendo la pasta delle olive macinate su strati sottili alternati a fiscoli e diaframmi filtranti in una torre carrellata.



**Fot. 8.** Pressa con carrello e fiscoli (Fonte: Arnaldo Serraiocco – CREA)

La torre carrellata, detta anche torre di spremitura, serve per la movimentazione della pasta d'olive dalle molazze alla pressa e per la costruzione della pila da comprimere. È costituita da un piatto circolare in acciaio con sponde leggermente rialzate e sagomate al cui centro è inserito un cilindro forato, detto foratina, che ha lo scopo di mantenere la pila in verticale e favorire il deflusso del mosto d'olio anche lungo l'asse centrale della pila.

La pila di fiscoli viene costituita secondo un ordine standard: sul primo setto filtrante, adagiato sul fondo del piatto infilato nella foratina, si dispone uno strato di pasta d'oliva dallo spessore di alcuni centimetri (mediamente 3 cm) a cui sovrappone un secondo diaframma e un secondo strato di pasta e così via. Ogni tre strati di pasta si sovrappone un fiscolo senza pasta e un disco d'acciaio inox allo scopo di distribuire uniformemente la pressione (Fot. 8). Complessivamente viene costituita una pila composta dalla sovrapposizione di una sessantina di fiscoli alternati ad altrettanti strati di pasta, con approssimativamente venti dischi d'acciaio e venti diaframmi senza pasta. Il quantitativo di pasta impiegato, come abbiamo già riportato, è calibrato in funzione della partita di olive molite che può lavorare la molazza (alcuni quintali). L'intera operazione di carico di una pressa si effettuava manualmente, ma ai nostri giorni si utilizzano apposite dosatrici, spesso integrate con una gramola. La torre costituita dai setti filtranti viene inserita nella pressa e sottoposta a pressione; valori tipici sono da 350 a 400 kg/cm<sup>2</sup> raggiunti dall'impianto di solito in 15 – 20 minuti a seconda della tipologia di pressa. L'applicazione di tale pressione permette al mosto oleoso, ovvero la frazione liquida costituita dall'acqua di vegetazione e dalla frazione oleosa (Roberti Giovanni,

2022), di separarsi dalla frazione solida e di venire raccolto sul piatto di fondo e defluire in modo continuo in un pozzetto di raccolta di acciaio inox o con un rivestimento piastrellato di materiale inerte e lavabile. Il mosto d'olio successivamente viene sottoposto a centrifugazione per separare l'olio dall'acqua di vegetazione e da eventuali residui solidi in sospensione. Allo scopo si utilizzano separatori centrifughi verticali, che effettuano la separazione in virtù di una rotazione ad alta velocità (6000-6500 giri al minuto). Martinez Moreno con altri autori (Martinez Moreno et al., 1964, 1963) negli anni 60 hanno descritto la spremitura con il sistema a pressione come un'operazione di filtrazione la cui cinetica può essere espressa dalla seguente relazione derivante dall'equazione più generale di Carman–Kozeny.

$$\frac{dV}{dt} = \frac{PA}{\eta\beta} \left(1 - \frac{\alpha\omega}{\beta A} V\right)$$

Dove:

V= Volume del liquido separato

t= Tempo di spremitura

P= pressione applicata

A= superficie di filtrazione

$\eta$ = viscosità del liquido

$\beta$ = resistenza del materiale depositato

$\alpha$ = resistenza del materiale filtrante

$\omega$ = quantità di solido depositato per unità di liquido filtrato

Integrando:

$$V = \frac{\beta A}{\alpha\omega} \left(1 - e^{-\frac{P\alpha\omega}{\eta\beta^2}t}\right)$$

Il mosto oleoso che esce è direttamente proporzionale alla superficie di filtrazione e alla resistenza del materiale depositato e inversamente proporzionale alla resistenza del materiale filtrante (fiscoli) sia alla quantità pasta depositata. Questo spiega perché è opportuno distribuire la pasta sui setti filtranti in piccoli spessori.

La precedente equazione può essere espressa anche nel seguente modo:

$$\ln V = a + bt$$

Dove a e b sono costanti legate alle caratteristiche della pasta d'olive e degli altri parametri sopra indicati.

La relazione comunque rappresenta una funzione esponenziale che riporta il volume di mosto oleoso V in funzione del tempo t e tende asintoticamente ad un volume  $V_0$  che è il valore di tutto il mosto oleoso presente nella pasta d'olive.

Una volta estratto nel processo discontinuo le frazioni liquide che costituiscono il mosto oleoso più i residui solidi vengono inviati ai separatori centrifughi verticali.

## 2.4 TECNOLOGIE ESTRATTIVE CONTINUE

Negli anni sessanta le tecnologie discontinue a causa della loro inferiore capacità di lavorazione delle olive e del maggior impiego di manodopera sono state soppiantate da tecnologie di estrazione continue (di Giacomo and Romano, 2022). Tali tecnologie si basano sostanzialmente sull'uso di frangitori meccanici (Fot. 9) e separatori centrifughi orizzontali, meglio noti con il nome di decanter, in sostituzione rispettivamente delle molazze e delle presse. Come premesso nell'introduzione al capitolo per brevità non verranno discusse in questo contesto le tecnologie, seppur interessanti, legate all'uso di denocciolatori ovvero macchine dedicate a produzioni di nicchia di oli ad elevata qualità in grado di separare il nocciolo dalla polpa del frutto prima della gramolatura al posto dei frangitori (Alfonso Ranalli et al., 2009).

### 2.4.1 FRANGITORI

I frangitori meccanici, analogamente all'azione svolta dalle molazze nel processo di estrazione tradizionale, hanno il compito di frantumare le olive per permettere il rilascio delle fasi liquide presenti formando la pasta che verrà lavorata nelle successive fasi estrattive che portano alla produzione dell'olio d'oliva. Tali sistemi sono costituiti da appositi contenitori di forma cilindrica con parti metalliche in movimento, talora rivestiti da una camicia d'acqua per disperdere il calore generato durante la frangitura e ridurre lo shock termico sulla pasta appena prodotta. Questo accorgimento, quando adottato, serve ad evitare o, comunque, a ridurre il possibile deterioramento delle caratteristiche organolettiche dell'olio prodotto con il processo di estrazione continuo (Nucciarelli et al., 2022). Non bisogna dimenticare che l'endocarpo è costituito da un legno estremamente duro e richiede un'elevata quantità di energia per essere rotto. Le drupe vengono frante da parti meccaniche in acciaio che presentano una rotazione compresa, a seconda delle tecnologie di frangitura utilizzate, tra i 1400 e i 2900 giri al minuto. La pasta in conseguenza di questa azione meccanica, soprattutto nelle configurazioni che prevedono una frangitura particolarmente violenta, può subire un incremento di temperatura dell'ordine di grandezza di una decina di gradi centigradi (dovuta alla elevata energia rotazionale che si converte in energia termica). Al contrario le paste ottenute da olive frante con le molazze in media non superano i 5 °C di aumento della temperatura rispetto alla temperatura ambientale del frantoio. I frangitori meccanici comunque determinano una profonda rottura delle cellule contenenti olio e assicurano, dopo la gramolatura, una buona separazione centrifuga e rese di estrazione elevate. Tali frangitori solitamente hanno un'alta capacità di lavorazione e, dove l'azione meccanica risulta più violenta, si possono avere delle variazioni nelle caratteristiche olfatto-gustative dell'olio prodotto a seguito di un incremento del contenuto di composti fenolici negli oli che determinano gli attributi gustativi di amaro e piccante. Altra conseguenza legata ad una azione di frangitura più violenta è l'aumento dei pigmenti lipofili (ad es. clorofille, carotenoidi e xantofille) presenti nell'olio ma comunque va ricordato che i frangitori, soprattutto quelli a martelli che sono tra i più diffusi e che presentano un'azione meccanica particolarmente violenta, nonostante possano avere effetti sulle caratteristiche organolettiche non determinano differenze significative nei parametri di qualità commerciale degli oli prodotti.

In funzione delle caratteristiche costruttive si possono identificare essenzialmente tre tipi di frangitore in commercio:

- A martelli
- A dischi dentati
- A coltelli sequenziali



**Fot. 9.** Frangitore a martelli con carica dall'alto (Fonte: CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1416781>)

I frangitori a martelli, come già detto in precedenza, sono tra i più diffusi nei processi estrattivi a ciclo continuo per la loro alta capacità di lavorazione oraria e per la loro resistenza all'usura. Tali frangitori si integrano bene, come configurazione, alle esigenze di automazione dell'impianto; il processo di carica delle olive solitamente avviene dall'alto tramite nastri trasportatori e l'operazione di frangitura si svolge in pochi secondi riversando la pasta d'olive appena prodotta nelle gramolatrici poste in basso (Polari et al., 2018). I frangitori a martelli sono costituiti da una griglia di acciaio al cui interno sono alloggiati una serie di elementi rotanti costituiti da un disco alle cui estremità vi sono delle placchette di materiali speciali resistenti all'usura dotati di spigoli vivi (detti, appunto, martelli) (Fot. 9). Tali elementi possono avere una velocità che di norma è vicina ai 2500-2900 giri al minuto (rpm) e sono azionati da motori da 10-40 kW di potenza. Gli spigoli vivi degli elementi rotanti e, in minor parte, i frammenti dell'endocarpo provocano la rottura dei lipovacuoli contenuti nella polpa (Amirante, 2013). Come anticipato precedentemente le caratteristiche di resistenza all'usura, la grande capacità di lavorazione (valori di riferimento in ambito italiano: 60/70 q.li/h, 2900 rpm, 50 kg/min di olive) permettono di ottenere una frangitura rapida ed efficace e una resa elevata. Completa il frangitore a martelli la griglia con un diametro dei fori da 5/6 mm e una girante con ferodi che effettua l'estrusione forzata dell'oliva attraverso i fori con rottura sia dei noccioli che della polpa. Di contro, costituiscono elementi negativi legati a tale tipologia di frangitura il riscaldamento della pasta (sino a 7/10 °C), la formazione di emulsioni dovute alla violenza della lavorazione e la maggiore estrazione di sostanze fenoliche (oltre che di pigmenti lipofili) che possono indurre una variazione di alcune caratteristiche organolettiche degli oli che possono essere mal percepite dal consumatore finale.

I frangitori a dischi sono costituiti da un gruppo di alimentazione a vite che spinge le olive tra due dischi dotati di una serie di denti con spigoli vivi, uno fisso ed uno rotante sulla cui superficie si trovano quattro o più anelli concentrici. Le olive si muovono dal centro verso la periferia del disco rotante, vengono tagliate e ridotte in sezioni sempre più piccole. Il livello di frantumazione delle olive e di conseguenza la granulometria della pasta può essere regolata agendo sulla distanza tra denti rotanti e quelli fissi. Dopo la frangitura, la pasta di olive cade nella pompa o nella tramoggia di alimentazione a vite e viene condotta alle gramole. Anche questo tipo di frangitori come il precedente si contraddistingue per un'elevata capacità lavorativa (ad es. 30 q.li/h) ma con una velocità di rotazione media (ad es. 1400 rpm). Quindi l'azione di frangitura risulta essere più delicata, si evita la formazione di emulsioni e si ottengono oli dal gusto più armonico; tuttavia la

resa estrattiva può risultare leggermente inferiore se confrontata al frangitore a martelli. Il frangitore a dischi, a causa delle caratteristiche costruttive intrinseche, in particolare a causa del materiale con cui sono costruiti i denti, è sensibile alla presenza di corpi estranei come sassi e pezzi di ferro che possono determinarne la rottura.

Un ultimo sistema preso in considerazione in questa trattazione tra quelli più utilizzati per frangere le olive è costituito dal frangitore a coltelli. Questi ha un funzionamento analogo a quello a martelli ma il suo utilizzo dà luogo ad un processo meno violento in quanto le olive non vengono violentemente frante ma tagliate da coltelli rotanti con un minore riscaldamento della pasta ottenuta. L'asse di rotazione degli elementi è disposto verticalmente e la particolare geometria fa sì che la pasta esca dalla griglia rapidamente evitando il surriscaldamento e l'ossidazione della pasta (Servili et al., 2002). Rispetto al frangitore più diffuso, ovvero quello a martelli, ha una minore capacità lavorativa ed è più soggetto a rotture.

## 2.5 GRAMOLAZIONE

Successivamente alle operazioni di frangitura o di molitura, le paste prodotte subiscono un'ulteriore operazione tecnologica; la gramolazione. Tale passaggio, seppur con qualche differenza nelle tempistiche adottate, è comune ad entrambi i processi estrattivi continuo e discontinuo.

La gramolazione, anche chiamata gramolatura, serve a preparare la pasta d'oliva alla successiva e più importante fase estrattiva, la separazione delle fasi liquide e solide. Tale processo consiste in una lenta lavorazione della pasta attuata attraverso dei macchinari detti, appunto, gramole (o gramolatrici) al fine di rompere le emulsioni fra acqua e olio e favorire la coalescenza delle goccioline d'olio.

**Tab. 1.** - Percentuale del diametro delle gocce d'olio nella pasta d'olive dopo l'operazione di frangitura e di gramolazione (di Giovacchino, 2010).

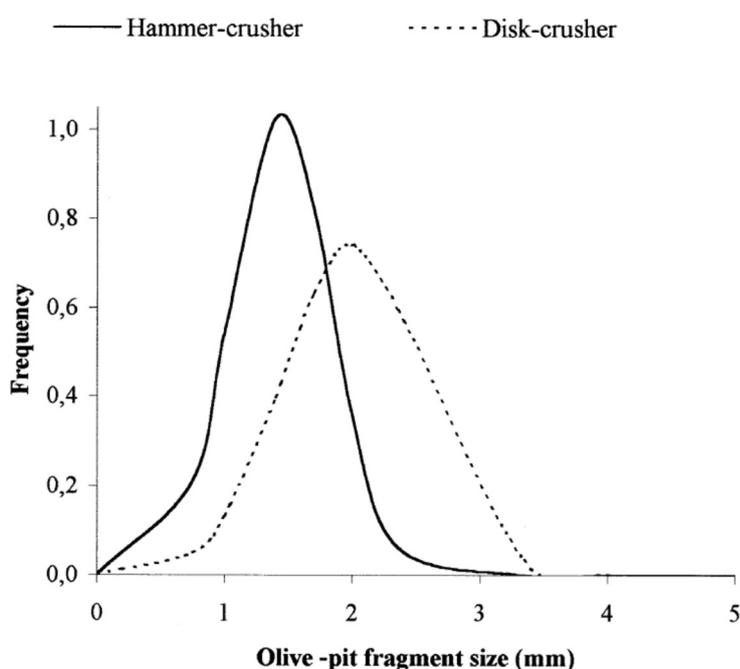
Fase di lavorazione	Diametro gocce d'olio (micron)					
	< 15	15-30	30-45	45-75	75-150	>150
<b>Dopo la frangitura (%)</b>	6	49	21	14	4	6
<b>Dopo la gramolazione (%)</b>	2	18	18	18	19	25

Come si evince dalla Tabella 1 la percentuale di gocce d'olio che presentano un diametro superiore a 30 micron superano 80% dopo il passaggio nella gramolatrice migliorando poi la resa in mosto d'olio nella successiva fase d'estrazione.

La gramola è sostanzialmente costituita da una vasca in acciaio inox in cui sono presenti pale elicoidali che, ruotando delicatamente (20-30 rpm), mantengono in lento rimescolamento la pasta d'olive (flottazione) (Fot. 10). La gramola è anche dotata di un'intercapedine esterna dove circola acqua riscaldata per regolare la temperatura di processo della pasta. Attualmente i moderni frantoi comprendono più gramole disposte in serie (anche su diversi piani) o in parallelo ed alimentate mediante sistema idraulico, dalla pasta d'olive uscita dal frangitore o dalla molazza. Le gramole possono anche presentare più sezioni per permettere una lavorazione partitaria delle olive. Tra le gramole inoltre vi è una particolare tipologia specifica per i tradizionali processi discontinui, ovvero la gramola-dosatrice. Questa specifica gramolatrice è fornita di un sistema di distribuzione idoneo a porre la pasta proveniente dalle molazze sui fiscoli per l'estrazione con le presse.

L'efficacia dell'operazione di gramolatura sulle rese finali di estrazione dipende dalle caratteristiche reologiche della pasta d'olive ma anche dalla durata dell'operazione di gramolatura e dalla temperatura che raggiunge l'impasto durante il processo. Le proprietà reologiche delle paste sono funzione di svariati fattori quali, la cultivar, l'andamento climatico, il momento di raccolta e il tipo di frangitore utilizzato. Ad esempio, nei processi discontinui la fase di gramolazione risulta meno importante perché la pasta ottenuta dalle macine in granito non determina la formazione di emulsioni e può essere svolta a temperatura ambiente o con un blando riscaldamento del composto e con tempi di lavorazione ridotti (15-20 minuti); al contrario risultano molto importanti i parametri tecnici come la durata dell'operazione di mescolamento in vasca e la temperatura nelle rese di estrazione dei processi continui. La temperatura risulta critica per destabilizzare l'emulsione acqua-olio. Ugualmente in un processo di estrazione continuo, in caso di paste con un basso grado di emulsione poco difficili da trattare, la gramolatura può avvenire a temperature prossime a quelle ambientali (23-25 °C) o poco superiori fino ad un limite di 27 °C. Quando la pasta viene lavorata ad una temperatura al di sotto dei 27 °C viene definita estrazione o gramolatura "a freddo" e tale limite tecnologico nella fase di gramolazione può essere considerato critico per ottenere oli di elevata qualità (Regolamento di esecuzione (UE) N. 29/2012 della Commissione del 13 gennaio 2012 relativo alle norme di commercializzazione dell'olio d'oliva). Tra i 27 °C e i 30 °C gli oli d'oliva non possono più fregiarsi della dicitura "estratto a freddo". In presenza di emulsioni più stabili, la pasta può essere portata, pena uno scadimento qualitativo dell'olio prodotto soprattutto in termine di attributi organolettici e di perdita di sostanze volatili che conferiscono un aroma all'olio, oltre ai 30 °C per aumentare le rese.

L'operazione di gramolazione di solito, per ottenere una resa estrattiva soddisfacente, ha una durata che in genere supera i 45 minuti e che si può prolungare fino ad un tempo limite di 60 - 90 minuti (L. di Giovacchino et al., 2002). Anche i frammenti di nocciolino presenti nella pasta, le cui dimensioni sono correlabili al sistema di frangitura adottato (Fig. 3) (Caponio and Catalano, 2001), hanno un effetto sull'operazione di gramolatura. Il nocciolino possiede il duplice ruolo, svolge un'azione lacerante dei tessuti rimasti integri all'ingresso della gramola dall'altro svolge un'azione drenante delle fasi liquide favorendo la coalescenza dell'olio (Amirante, 2013).



**Fig. 3.** Distribuzione delle dimensioni dei frammenti di nocciolino in funzione di due tipologie di frangitori utilizzati (Fonte: Caponio and Catalano, 2001).



**Fot. 10.** Particolare dell'interno di una gramolatrice in lavorazione della pasta d'olive (Fonte: Arnaldo Serraioco – CREA)

## 2.6 SEPARATORI CENTRIFUGHI ORIZZONTALI – DECANTER

Il passaggio tecnologico successivo alla gramolatura nel processo continuo è la separazione delle frazioni solide e liquide presenti nella pasta d'olive. I primi del novecento vedono diffondersi le macchine centrifughe in molteplici contesti industriali compreso quello dell'industria alimentare (Fot. 11). A seguito di numerosi tentativi ed esperimenti negli anni sessanta la società Alfa-Laval costruisce la "Centriolive" che può essere definita come la prima macchina centrifuga che permette la lavorazione in continuo delle olive (Costagli, 2018). Il brevetto del decanter per l'estrazione centrifuga dell'olio, approvato in Italia nel 1964, aveva come oggetto un "Sistema a funzionamento continuo per recuperare l'olio da una pasta costituita da sostanze vegetali finemente suddivise" e all'inizio non prevedeva l'aggiunta dell'acqua di processo. Nondimeno durante le prove sulla pasta d'olive venne fuori l'esigenza di modificare la viscosità della pasta aggiungendo, appunto, acqua di processo; perciò nel 1967 vennero commercializzati i primi impianti centrifughi continui che prevedevano l'aggiunta di acqua pari al 50 – 60 % del peso delle olive. Il cambio tecnologico nei processi di estrazione, dagli impianti a pressione a quelli continui, ha permesso una maggiore igienicità del processo e un minor impiego di manodopera; tuttavia si è accresciuta la produzione di acque di vegetazione da valori di circa 40-60 kg/100 kg (acqua di vegetazione/olive) con l'uso delle presse a valori di 80-120 kg/100 kg con i decanter. Il processo ha avuto ripercussioni anche sul tenore di umidità della sansa che è passata dal 24-30% al 48-54% (Amirante et al., 2009).



**Fot. 11.** Separatore centrifugo orizzontale meglio noto come Decanter (Fonte: Arnaldo Serraiocco – CREA)

Pochi ricercatori hanno investigato dal punto di vista concettuale le leggi fisiche e i principi teorici che regolano la separazione delle diverse fasi liquide e della fase solida della pasta d'olive mediante forza centrifuga. In questo campo notevole risulta essere il contributo di Amirante e altri autori che, partendo dalla equazione generale della sedimentazione, sono arrivati ad una serie di equazioni che descrivono le caratteristiche del sistema complesso costituito dalla pasta d'olive in un separatore centrifugo.

La velocità di sedimentazione di una particella  $v_{se}$  in un liquido a bassa concentrazione di solidi è descritta dalla seguente equazione:

$$v_{se} = \frac{dr}{dt} = (D_p)^2 \frac{(\rho_s - \rho_l)}{18\mu} \omega^2 r$$

Dove

$D_p$  = diametro medio delle particelle solide;

$\rho_s$  = peso specifico della particella solida;

$\rho_l$  = peso specifico del liquido;

$\omega$  = velocità angolare del rotore;

$\mu$  = viscosità del liquido;

$r$  = raggio.

Dalla prima equazione è possibile determinare il tempo di sedimentazione centrifuga che rappresenta il tempo impiegato dalla particella per raggiungere radialmente la superficie del tamburo rotante.

$$t_s = \frac{18\mu \ln \frac{R_2}{r}}{(D_p)^2 (\rho_s - \rho_l) Kc \omega^2}$$

$R_2$  = Raggio del tamburo rotante;

$r$  = distanza che deve percorrere la particella solida per raggiungere la superficie del tamburo;

$Kc$  = fattore di correzione funzione della concentrazione di particelle solide nel liquido.

Tenendo in considerazione che il tempo di ritenzione ( $t_r$ ) della particella solida nel decanter è funzione del rapporto tra il volume utile della centrifuga e la portata volumetrica (quantità di pasta d'olive e di acqua di processo addizionata) immessa nel macchinario nell'unità di tempo, e del diametro  $D_p$  delle particelle solide la relazione che permette di determinare il tempo di sedimentazione diventa:

$$t_s = \frac{18\mu \ln \frac{(R_2)^2}{(R_1)^2 + (R_2)^2}}{(D_p)^2 (\rho_s - \rho_l) Kc \omega^2}$$

Dove  $R_1$  = raggio minimo del volume impiegato dal liquido, corrispondente alla bocca dello stramazzo dell'olio.

L'espressione analitica del moto relativo tra fluidi e particelle solide, affinché possa essere consentita la sedimentazione di buona parte delle particelle solide, è stata ricavata come segue:

$$Q_s = (D_{50})^2 \frac{(\rho_s - \rho_l)}{18 \mu} g Kc \frac{\pi [(R_2)^2 - (R_1)^2] L \omega^2}{g \ln \frac{2(R_2)^2}{(R_1)^2 + (R_2)^2}}$$

Dove il tempo di ritenzione  $t_r$  che corrisponde al tempo di permanenza della particella solida nel decanter sia maggiore o uguale al tempo di sedimentazione  $t_s$  prima indicato. La portata volumetrica  $Q_s$  dipenderà dalla relazione sopra riportata. Con:

$D_{50}$  = diametro delle particelle caratterizzato dal 50 % di "cut-off";

$L$  = lunghezza della parte cilindrica del decanter

$g$  = accelerazione di gravità (9,81 m/s<sup>2</sup>)

La relazione sopra riportata può essere scomposta in due termini, il primo costituito dalla velocità di sedimentazione naturale; il secondo, definito spesso con il simbolo  $\Sigma$ , è funzione dei parametri costruttivi e delle cinetiche del decanter e viene definito con il termine "coefficiente dinamico di produttività". Dal punto di vista dimensionale è un parametro che si esprime in metri quadri ed è determinato dalla seguente relazione:

$$\Sigma = \frac{\pi [(R_2)^2 - (R_1)^2] L \omega^2}{g \ln \frac{2(R_2)^2}{(R_1)^2 + (R_2)^2}}$$

Tale parametro determina la portata da richiedere alla pompa di alimentazione. Pertanto macchine con lo stesso valore di  $\Sigma$  dovrebbero avere le stesse prestazioni capacitive.

$$\frac{V_1}{\Sigma_1} = \frac{V_2}{\Sigma_2} = cost = H_e$$

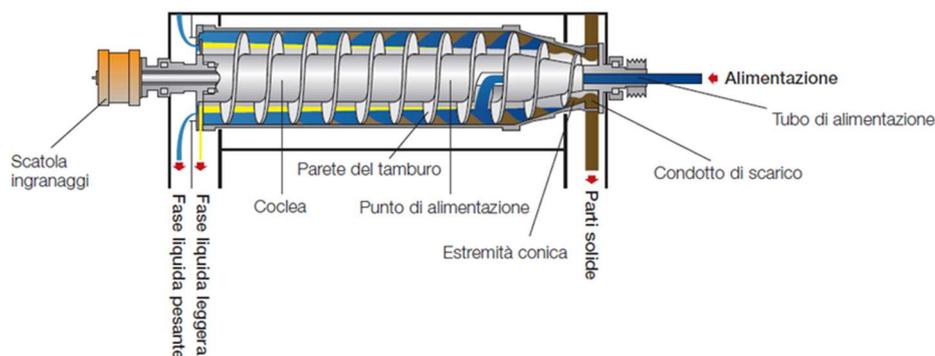
$H_e$  è un parametro definito “altezza efficace di sedimentazione” che caratterizza in modo univoco la funzionalità della macchina. All’aumentare di  $H_e$  aumenta il tempo necessario a completare la sedimentazione (Amirante, 2013; Amirante et al., 2009; di Giovacchino, 2010).

La pasta proveniente dalle gramole arriva, per mezzo di una pompa ed un opportuno condotto, al decanter che è costituito da un tamburo esterno ed una coclea in acciaio di forma cilindrica con un’estremità troncoconica. La parte cilindrica è più lunga di quella conica e ruota ad una velocità di circa 3500 giri/min; all’interno di essa gira una coclea ad una velocità lievemente superiore (da 5 a 20 giri/min) il cui nastro elicoidale è radente la superficie interna del tamburo. Nel sistema a 3 fasi al fine di ottenere la giusta viscosità la pasta d’olive viene addizionata prima di entrare nella centrifuga con acqua di rete preriscaldata (24 – 30 °C) in proporzioni variabili da 30-40 L/100 kg fino a 60-70 L/100 kg di olive.

Per effetto della forza centrifuga applicata, la pasta si suddivide in 3 fasi distinte (Fig. 4):

- Fase solida, composta dalla parte fibrosa del mesocarpo, dalle bucce e dai frattumi dell’endocarpo, che costituisce la parte più pesante (peso specifico  $\approx 1,2 \text{ g/cm}^3$ ) e che per questo si colloca sulla superficie interna del tamburo, la più periferica, da cui viene rimossa continuamente e spostata verso la bocca di scarico collocata nella parte conica dall’azione della coclea interna.
- Fase liquida acquosa. Questa fase con una densità intermedia tra la fase solida e la fase liquida ( $1,02 - 1,09 \text{ g/cm}^3$ ) si dispone tra la sansa e la fase oleosa e si muove in una direzione opposta a quella dove si trova la bocca di scarico della sansa.
- Fase liquida oleosa, la meno densa ( $0,915 - 0,920 \text{ g/cm}^3$ ) si dispone nella zona più interna e si muove nello stesso senso della fase acquosa verso un diverso ugello di uscita posto ad un’altezza superiore da cui esce l’acqua di vegetazione.

Funzionamento in tre fasi



**Fig. 4.** Schema di funzionamento decanter a 3 fasi (Fonte: Alfa-Laval)

Le prime tecnologie estrattive centrifughe alimentate dalla pasta proveniente dalla gramola resa più fluida dall’aggiunta di acqua di processo prevedevano quindi l’uscita di tre fasi distinte, la fase solida costituita dalle sanse e le due fasi liquide, una costituita dalla frazione acquosa ovvero l’acqua di processo più l’acqua di vegetazione (con un minimo contenuto d’olio) e l’altra dalla frazione oleosa che contiene ancora una percentuale d’acqua e di solidi sospesi che necessita quindi di un ulteriore passaggio con separatori centrifughi orizzontali per essere destinata all’uso alimentare (Fot.12).

Il sistema centrifugo continuo a 3 fasi se da un lato aveva portato dei vantaggi rispetto al processo discontinuo tradizionale, quali:

- la maggior igienicità del processo

- la riduzione della manodopera impiegata
- la maggior capacità oraria di lavorazione delle olive
- l'automazione di processo

dall'altra parte aveva avuto delle controindicazioni che possono essere riassunte così:

- diminuzione del valore delle sanse (legato al maggior tenore in acqua e al minor contenuto in olio residuo)
- consumo di acqua potabile impiegata come acqua di processo
- maggior consumo energetico legato anche al riscaldamento dell'acqua di processo
- aumento elevato delle acque di vegetazione con conseguenti problemi legati allo stoccaggio e allo smaltimento delle stesse.
- minor resistenza all'irrancidimento oli prodotti legata al dilavamento da parte delle acque di processo della componente fenolica presente nella pasta d'olive.



**Fot. 12.** Uscita frazioni liquide in un decanter a 3 fasi (Fonte: Arnaldo Serraiocco – CREA)

Negli anni novanta l'evoluzione tecnologica portò alla produzione e diffusione principalmente in Spagna, la prima nazione produttrice di olio al mondo, di un separatore centrifugo in grado di operare la separazione delle fasi solida e liquida senza o con pochissima aggiunta di acqua di processo. Tale tipologia di separatore consente di avere solo due fasi distinte all'uscita del separatore: una fase liquida costituita dalla fase oleosa e una fase solida costituita dalla sansa che ingloba anche l'acqua di vegetazione. Per tale ragione questa tipologia di decanter è definita "a 2 fasi" o, anche, "a due uscite". Questa tecnologia coniuga a rese estrattive simili alcuni vantaggi:

- scarsa generazione di acque di vegetazione
- minor consumi di energia
- minor consumo d'acqua
- maggior contenuto di antiossidanti nell'olio

Dall'altra parte con tale sistema si riscontra un problema legato alle sanse per il loro elevato livello di umidità che non le rende più utilizzabili dai sansifici generando il problema del mancato recupero dell'olio residuale e della gestione e smaltimento delle sanse umide.

Attualmente le due tecnologie di separatori centrifughi orizzontali coesistono sul mercato, con alcune evoluzioni tecnologiche quali ad es.: i decanter a "cono corto" o i separatori centrifughi VDP (*variable dynamic pressure*). Quest'ultimi hanno la caratteristica che la velocità ( $\Delta n$ ) della coclea può variare rispetto a quella del tamburo (VDP-decanter).

Alle due tipologie di decanter appena descritte, si sono aggiunti anche estrattori centrifughi orizzontali in grado di operare sia a due sia a tre fasi e lavorare in uno stato intermedio, ovvero necessitando nell'estrazione di un basso apporto d'acqua di processo. Tali separatori vengono impropriamente chiamati decanter a "due fasi e mezzo".

## 2.7 SEPARATORI CENTRIFUGHI VERTICALI

I separatori centrifughi verticali, costituiscono il passaggio tecnologico finale di entrambi i processi di estrazione. Sono macchine centrifughe ad asse verticale costituite da un serbatoio cilindrico contenente il tamburo rotante della centrifuga (circa 6000-6500 giri/minuto) formato da una serie di dischi conici forati e sovrapposti. Il mosto d'olio, immesso dall'alto, viene inviato attraverso un tubo d'ingresso stazionario al tamburo rotante dove subisce una progressiva accelerazione. La separazione olio-acqua avviene nei dischi, per via della diversa densità. La fase acquosa e i solidi sospesi si distribuiscono ai margini mentre la fase oleosa si concentra nella parte centrale del pacco dei dischi dove fluisce in una camera di raccolta superiore. L'acqua, al contrario, fluisce in una camera di raccolta inferiore mentre i residui solidi (morchie) vengono scaricati, ad intervalli regolari, in un apposito raccogliitore posto sotto il tamburo ed espulsi tramite un sistema di sicurezza automatizzato (Costagli, 2018). Spesso per facilitare la separazione delle fasi del mosto oleoso viene immessa nel separatore centrifugo verticale dell'acqua di rete tiepida; tale processo è particolarmente usato in presenza di fasi oleose difficili quali quelle che provengono da impianti di estrazione a pressione dove il contenuto di frammenti vegetali risulta essere particolarmente elevato. Tale acqua di lavaggio dell'olio costituisce anch'essa, insieme alle acque di lavaggio delle olive e, eventualmente, alle acque di vegetazione, una quota di rifiuti liquidi acquosi che gli oleifici devono gestire nei loro cicli produttivi.



**Fot. 13.** Particolare dell'uscita dell'olio da un separatore centrifugo verticale (Fonte: CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1416080>)

All'uscita dal separatore centrifugo, l'olio è un prodotto pronto ad essere destinato al consumo (Fot. 13). Il prodotto tal quale può contenere dei minimi residui solidi e liquidi in sospensione e presentarsi torbido. In situazione di riposo tale residuo tende spontaneamente depositarsi sul fondo del recipiente e l'olio

illimpidisce spontaneamente. Per l'olio extravergine destinato subito alla commercializzazione non si attende la decantazione delle morchie ma lo si sottopone a filtrazione prima del confezionamento.

### 3 SOTTOPRODOTTI DELL'INDUSTRIA OLEARIA

L'attività di estrazione dell'olio d'oliva genera dei sottoprodotti che, in alcuni casi, possono rappresentare per il frantoio un'ulteriore fonte di reddito ma, in altri casi, costituiscono una fonte di spesa dovuta ai costi di gestione e smaltimenti degli stessi.

I sottoprodotti che genera un oleificio sono i seguenti:

- le foglie dell'olivo
- le acque di lavaggio delle olive
- le acque reflue olearie (ARO) (*Olive mill wastewater* - OMWW)
- l'acqua di processo impiegata nel separatore centrifugo orizzontale
- la sansa vergine d'oliva
- Il nocciolino e la sansa denocciolata (*paté*), entrambe frazioni separabili della sansa vergine

I sottoprodotti appena elencati sono comuni a tutte le tecnologie estrattive eccezion fatta per le acque reflue olearie che nel sistema a due fasi non sono presenti perché la componente liquida del frutto e la poca acqua di processo eventualmente utilizzata risultano inglobate nelle sansi vergini all'uscita dal decanter dando luogo a quelle che vengono definite "sansi umide", ovvero un residuo semisolido con un elevato tenore di umidità.

#### 3.1 FOGLIE DELL'OLIVO

Tale sottoprodotto deriva da quelle che vengono definite le operazioni preliminari di estrazione che, come abbiamo visto precedentemente, consistono in quelle operazioni in grado di preparare le olive raccolte al processo di estrazione qualunque sia la tecnologia impiegata. In particolare le macchine attraverso i vagli e gli aspiratori permettono l'allontanamento di foglie, rametti e corpi estranei che si mescolano inevitabilmente ai frutti durante le fasi di raccolta. Le foglie vengono di solito smaltite riciclandole nel terreno o sottoponendole ad un processo di essiccazione naturale al fine di essere impiegate come biomassa combustibile. Non comportano quindi nessun problema gestionale al frantoio anzi va segnalata la possibilità di utilizzare tali sottoprodotti per estrarre dei composti bioattivi ad alto valore aggiunto. L'oleuropeina, tra tutti i glucosidi fenolici estraibili, è quella presente in maggior quantità nelle foglie ed ha mostrato proprietà nutraceutiche e salutistiche importanti. Questo iridoide ha infatti un'azione ipotensiva ed un effetto ipoglicemizzante, risulta quindi capace di avere effetti sulla sindrome metabolica. Altre proprietà salutistiche attribuite all'oleuropeina sono legate alla capacità della stessa di avere un'azione anti-neurodegenerativa (Panizzi et al., 1960; Ranalli et al., 2006).

L'oleuropeina, a sua volta, ha le potenzialità per essere usata come composto base per la produzione di idrossitirosolo (Fig. 5), un ortodifenolo (di cui l'oleuropeina costituisce l'estere insieme all'acido elenolico) dalle elevate proprietà antiossidanti.

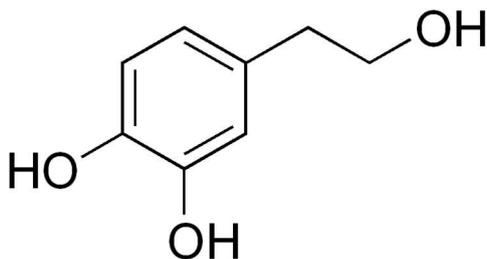


Fig. 5. Struttura dell'idrossitirosolo

### 3.2 SOTTOPRODOTTI LIQUIDI

Durante le fasi produttive vengono generati o possono essere generati, in funzione delle tecnologie applicate e dello stato dei frutti, i seguenti sottoprodotti liquidi:

- Acque di lavaggio delle olive,
- Acque di reflue olearie (ARO),
- Acque di processo del separatore centrifugo verticale.

Le acque di lavaggio delle olive di solito non costituiscono un problema per il frantoio, queste sono generate nel passaggio successivo al processo di defogliazione. I frutti vengono lavati con acqua potabile al fine di rimuovere polvere e terriccio o qualsiasi altro elemento che possa aver sporcato le drupe. Tale operazione, in genere, comporta un consumo d'acqua che ammonta in volume al 10% della quantità del peso delle olive lavorate ( $\approx 10\%$  v/p). Le acque, in accordo con la legislazione del vigente, generalmente vengono poi destinate allo spandimento controllato nelle superfici agrarie adiacenti l'oleificio.

I reflui liquidi derivanti dall'acqua di costituzione delle olive, detti acque reflue olearie (ARO) o, anche, acque di vegetazione (AV), come riportato in precedenza, possono essere prodotti o meno, a seconda della tecnologia utilizzata; nel caso si usi un estrattore centrifugo a due fasi le ARO non vengono generate ma vengono inglobate nelle sansa andando a costituire un prodotto semisolido chiamato "sansa umida". Le ARO, come altri prodotti e sottoprodotti dell'oleificio, presenteranno caratteristiche e verranno generate in quantità diverse per unità di frutti trattati in funzione del processo estrattivo che le origina (processo discontinuo o processo continuo a tre fasi).

Le acque di processo impiegate nella fase d'uso del separatore centrifugo verticale vengono utilizzate per l'allontanamento finale dei residui liquidi acquosi e dei solidi in sospensione eventualmente presenti nel mosto oleoso prima del confezionamento finale dell'olio d'oliva. Le acque tecnologiche risultanti dall'impiego dell'estrattore centrifugo verticale per caratteristiche (basso COD e contenuto in fenoli ridotto) e per quantità di solito non sono molto impattanti dal punto di vista ambientale e quindi non comportano molti oneri dal punto di vista gestionale per gli oleifici. Queste acque in alcuni casi vengono miscelate alle acque provenienti dal lavaggio delle olive e smaltite secondo le norme vigenti locali in cui ricadono queste attività agroindustriali. Tale pratica è estremamente diffusa in Spagna, la maggiore nazione produttrice al mondo di olio, dove la diffusione capillare dei sistemi a due fasi limita, nella stragrande maggioranza dei casi, solo a queste due le tipologie le acque di processo residuali.

Un discorso diverso meritano invece le ARO provenienti sia dagli impianti tradizionali con le presse sia da impianti continui a tre fasi (Tab. 2). Queste possiedono un elevato potenziale inquinante derivante dall'alto contenuto di materia organica, dalla loro acidità, dall'elevata Domanda Chimica di Ossigeno COD (*chemical oxygen demand*), dalla capacità delle sostanze organiche presenti di polimerizzare formando dei pigmenti bruni (tannini e antociani) e, soprattutto, dall'elevata presenza di sostanze fenoliche (Mekki et al., 2007). I fenoli, presenti in elevate quantità nelle ARO (2–10 g/L), hanno un'azione fitotossica e batteriostatica che rende estremamente difficile, se non tecnicamente impossibile, il trattamento attraverso i comuni sistemi di depurazione biologica delle acque reflue. Sia i sistemi aerobici sia quelli anaerobici necessiterebbero di diluizioni progressive dalle 70 alle 100 volte per diminuire la concentrazione dei fenoli presenti e rendere possibile la riduzione del COD intorno al 1 g/L (Zahi et al., 2022). Le diluizioni necessarie rendono il trattamento con metodi biologici classici eccessivamente oneroso sia dal punto di vista dei costi che delle risorse da impiegare.

Attualmente gli approcci più utilizzati per gestire le ARO sono tre:

- Lo stoccaggio in lagune al fine di una parziale o totale evaporazione delle ARO (Martínez-Gallardo et al., 2022)
- La diffusione dei decanter centrifughi a due fasi, che non producono ARO

- L'utilizzazione agronomica delle ARO attraverso lo spandimento controllato su terreni adibiti ad usi agricoli come ammendante (80 m<sup>3</sup>/ha) (Kinigopoulou et al., 2022).

Le soluzioni appena elencate sono tecnicamente semplici e comportano un basso costo di esercizio compatibile anche con realtà agroalimentari mediterranee medio piccole; tuttavia non sono esenti da ricadute negative sull'ambiente.

Il lagunaggio dei reflui liquidi dei frantoi per una parziale o totale evaporazione delle acque oltre a occupare vaste superfici di territorio può essere causa della diffusione di odori molesti e/o favorire la proliferazione di insetti.

Lo spandimento, normato in Italia dalla Legge 11 novembre 1996, n. 574, pur essendo una pratica in grado di restituire al suolo importanti elementi quali, ad esempio, il potassio, se non praticata correttamente può causare un'elevata concentrazione di sostanze fitotossiche nel suolo ed avere un impatto importante sulle falde acquifere o sui corpi idrici superficiali danneggiandone lo stato qualitativo ed ambientale.

**Tab. 2** - Quantità e caratteristiche delle acque di vegetazione ottenute nella lavorazione delle olive in funzione delle diverse tecnologie di estrazione (Fonte: L. di Giovacchino, 2010).

<b>Determinazioni</b>	<b>Sistema di lavorazione delle olive</b>			
	Pressione	Centrifugazione a 3 fasi	Centrifugazione a due fasi e mezzo*	Centrifugazione a due fasi
<b>Quantità (L/t olive)</b>	400 – 500	600 – 800	150 – 300	100**
<b>pH</b>	4,5 – 5,7	4,5 – 6,0	4,5 – 6,0	4,5 – 5,0
<b>Residuo secco (%)‡</b>	8 – 20	4 – 15	7 – 18	3
<b>Sostanza organica (%)‡</b>	6 – 16	3 – 12	6 – 15	2,5
<b>Contenuto d'olio (%)‡</b>	0,2 – 0,8	0,6 – 2,0	0,6 – 2,0	0,1
<b>COD (g O<sub>2</sub>/L)</b>	60 – 200	50 – 170	50 – 180	10
<b>Fenoli totali (g/L) come acido caffeico</b>	2 – 10	2 – 8	2 – 10	0,5 – 1,6
<b>Ceneri (%)‡</b>	2 – 4	1 – 3	2 - 4	0,5
<b>Azoto (%)‡</b>	0,10 – 0,15	0,05 – 0,10	0,10 – 0,15	-
<b>Fosforo (%)‡</b>	0,05 – 0,10	0,02 – 0,06	0,05 – 0,10	-
<b>Potassio (%)‡</b>	0,2 – 0,4	0,1 – 0,2	0,2 – 0,4	-

\*Decanter a 3 fasi, particolarmente diffuso in Italia, con ridotta quantità di acqua di processo aggiunta alla pasta di olive (20-30% in peso)

\*\* Acqua usata per la separazione dell'olio dal mosto oleoso nella centrifuga verticale

‡ Percentuale in peso (m/m)

Alla luce di quanto sopra riportato è molto attiva la ricerca scientifica finalizzata a ridurre e/o eliminare gli impatti associati alle ARO.

Di seguito saranno illustrate alcune linee di ricerca tra le più promettenti ma ancora non implementate, o poco, su scala industriale. Le linee di ricerca sono basate essenzialmente su:

- Metodi biologici
- Metodi chimici
- Metodi chimico – fisici

Tra i metodi di depurazione biologica le tecnologie di detossificazione basate sull'uso di microrganismi fungini sembrano rappresentare un'alternativa valida ai metodi classici impieganti consorzi di batteri; i funghi hanno una tolleranza a condizioni di pH acido e mostrano con i loro enzimi la capacità di demolire le sostanze organiche più recalcitranti alla degradazione biologica presenti nelle ARO. Tuttavia però gli impianti basati su questi microrganismi non hanno ancora raggiunto la maturità tecnologica per un impiego su vasta scala (Zahi et al., 2022).

Per ridurre il potenziale inquinante delle ARO sono stati proposti anche altri approcci basati su meccanismi chimici e chimico fisici.

Tra i metodi chimici citiamo quelli basati su metodi fotocatalitici tramite nano composti ZnO – Magnetite, quelli basati sull'elettrocoagulazione e una vasta gamma di trattamenti ossidativi basati sul reattivo di Fenton (Babuponnusami and Muthukumar, 2014; Bampalioutas et al., 2019; El-Gohary et al., 2009; Lucas and Peres, 2009). Purtroppo anche questi metodi, pur evidenziando una fattibilità tecnica legata al fatto che sono in grado di demolire la componente fenolica e di ridurre il COD, hanno però mostrato una scarsa sostenibilità economica soprattutto dove la dimensione dei frantoi è medio-piccola e quindi incapace di implementare soluzioni complesse e/o costose.

Un ultimo approccio interessante per la depurazione delle acque è dato dal processo chimico-fisico della ultra e della nanofiltrazione, quello della estrazione liquido-liquido e dell'essiccazione attraverso la metodica *spray drier*. Tali tecnologie sono capaci di detossificare le ARO e nel contempo concentrare (ad esempio in un permeato ad osmosi inversa o in polvere) le sostanze fenoliche dell'olivo. Così facendo si eliminano le sostanze più complesse dal punto di vista dell'impatto ambientale associato alle ARO permettendo poi alle acque residue l'impiego di tecnologie di depurazione più semplici e a costi compatibili. I polifenoli estratti dalle ARO, a loro volta, dovrebbero trovare un mercato considerando le riconosciute proprietà antiossidanti, nutraceutiche e salutistiche che possiedono tali sostanze organiche (Abbattista et al., 2021; Antónia Nunes et al., 2018; Frankel et al., 2013; Roig et al., 2006; Benincasa et al., 2022). Un ostacolo allo sfruttamento delle molecole estratte però è dato dalla varietà qualitativa e quantitativa dei composti fenolici recuperati che ne frena il pieno impiego su scala industriale (Dermeche et al., 2013). Attualmente, quindi, il problema delle ARO risulta ancora aperto ed oggetto di studi da parte di una vasta comunità di ricercatori.

### 3.3 SANSE

Definiamo sansa la parte solida residua dell'oliva dopo il processo di estrazione meccanica dell'olio costituita dai frammenti dell'endocarpo (nocciolo + mandorla), dalla parte fibrosa del mesocarpo (la polpa) e dall'epicarpo (le bucce). In funzione della tecnologia estrattiva che le genera possiamo distinguere principalmente tre tipologie di sanse, una quarta, quella proveniente dal cosiddetto "due fasi e mezzo" è meno rappresentativa (Tab. 3).

Le tecnologie estrattive, come per i reflui liquidi provenienti dai frantoi, influenzano le caratteristiche e la quantità delle sanse prodotte; in particolar modo hanno effetto su alcuni parametri quali: il tenore d'acqua percentuale, il contenuto di olio residuale e la concentrazione di sostanze fenoliche in esse presenti.

Le sanse prodotte con le tradizionali tecnologie estrattive basate su presse e molazze, per il loro alto contenuto di olio residuale (6 – 8%) e il basso tenore in acqua (22 – 35%), un tempo costituivano un ulteriore introito per il frantoiano in quanto potevano essere vendute ai sansifici per l'estrazione dell'olio residuale (olio di sansa) con l'ausilio di solventi organici (ad es. *n*-esano).

L'evoluzione delle tecnologie estrattive del processo agroindustriale di produzione dell'olio vergine d'oliva, ha portato quindi, un cambiamento quali-quantitativo degli oli extravergini d'oliva, con effetti sulle rese d'estrazione, sulla manodopera impiegata nel frantoio, sulle proprietà organolettiche degli extravergini ottenuti (ad es. variando la concentrazione di sostanze antiossidanti nell'olio si modifica la resistenza all'ossidazione e la *shelf life* del prodotto); ma anche sui sottoprodotti solidi.

Con l'evoluzione tecnologica le sanse nei processi continui di estrazione hanno progressivamente perso la capacità di generare reddito. Le sanse provenienti da un impianto di estrazione a tre fasi (e quelle del "due fasi e mezzo") sono ancora accettate dai sansifici ma faticano a essere remunerate a causa dei maggiori costi energetici per ridurre il tenore di umidità (45 – 55%) e per un contenuto d'olio non elevato (3,5 – 4,5%).

**Tab. 3** - Caratteristiche e quantità delle sanse ottenute in funzione di differenti sistemi di estrazione dell'olio d'oliva (Fonte: G. di Serio et al., 2011).

<b>Determinazioni</b>	<b>Sistema di lavorazione delle olive</b>			
	Pressione	Centrifugazione a 3 fasi	Centrifugazione a due fasi e mezzo*	Centrifugazione a due fasi
<b>Quantità di sansa (kg/t olive)</b>	250 – 350	450 – 550	550 – 650	800 – 850
<b>Acqua (%)‡</b>	22 – 35	45 – 55	55 – 62	65 – 75
<b>Olio residuale sul fresco (%)‡</b>	6 – 8	3,5 – 4,5	3,5 – 4,5	3 – 4
<b>Fibre (%)‡</b>	20 – 35	15 – 25	12 – 20	10 – 15
<b>Nocciolino (%)‡</b>	30 – 45	20 – 28	15 – 20	12 – 18
<b>Ceneri (%)‡</b>	3 – 4	2 – 4	3 – 4	3 – 4
<b>Azoto (mg/100 g)</b>	250 – 350	200 – 300	200 – 300	250 – 300
<b>Fosforo (mg/100 g)</b>	40 – 60	30 – 40	35 – 45	40 – 50
<b>Potassio (mg/100 g)</b>	150 – 200	100 – 150	100 – 180	150 – 250
<b>Fenoli totali (mg/100 g)</b>	200 – 300	200 – 300	250 – 350	400 – 600

\*Decanter a 3 fasi, particolarmente diffuso in Italia, con ridotta quantità di acqua di processo aggiunta alla pasta di olive (20-30% in peso)

‡ Percentuale in peso (m/m)

Le sanse a 3 fasi (Fot. 14) quando non utilizzabili dai sansifici, soprattutto per ragioni logistiche, si prestano, dopo essiccazione, ad altri usi quali biomasse per scopi energetici visto il loro potere calorifico mediamente

elevato 12,5 – 14,6 MJ/kg. Anche le sanse disoleate, a seguito del processo di estrazione dell'olio residuo con solventi, trovano spesso impiego come biomasse combustibili o anche come ammendante agricolo.



**Fot. 14.** Sansa a 3 fasi in uscita dal decanter

Va comunque sottolineato che gli alti costi energetici per la produzione dell'olio di sansa coniugata ad un abbassamento delle richieste di mercato per questo prodotto stanno riducendo ulteriormente le possibilità per le sanse del processo continuo di essere impiegate nel processo industriale di estrazione a favore di altre materie prime più idonee e ad altri metodi di estrazione. Nei sansifici moderni si sta affermando la tecnica del "ripasso" ovvero il recupero dell'olio residuo direttamente attraverso una seconda estrazione direttamente in frantoio (di Giovacchino et al., 2017).



**Fot. 15.** Impianto di stoccaggio sanse umide (Fonte: <https://blogdelagua.com/actualidad/internacional/disenan-un-sistema-que-permite-convertir-las-aguas-residuales-procedentes-de-la-agricultura-en-bioplásticos/>)

Negli anni novanta con il diffondersi dei sistemi estrattivi a due fasi soprattutto in Spagna, paese olivicolo che da solo copre oltre un terzo della produzione mondiale di olio, (Alburquerque et al., 2004), la gestione delle sanse umide è diventata un problema per i frantoi ed ha iniziato a costituire una delle principali problematiche ambientali legate all'industria olearia. Queste, come sopra riportato, per il loro scarso contenuto di olio (3 – 4%) e l'alto tenore d'acqua (65 – 75%) non sono accettabili dai sansifici in quanto

necessiterebbero di un trattamento termico eccessivamente oneroso per ridurre il quantitativo d'umidità in esse presente. Quindi i decanter a due fasi, se da un lato permettono un basso consumo di acqua di processo e un minor consumo di energia, dall'altro generano un residuo semisolido che non è più possibile avviare al tradizionale impiego per il recupero dell'olio residuo con solventi.

La sansa umida spesso viene stoccata in apposite vasche e costituisce uno dei maggiori impatti ambientali legati all'industria dell'olio d'oliva (Fot. 15).

### 3.4 LINEE DI RICERCA PER LA VALORIZZAZIONE DELLE SANSE UMIDE

Molteplici quindi sono i tentativi per valorizzare la biomassa residua proveniente dai decanter a due uscite (Roig et al., 2006). Molte ricerche hanno cercato di valorizzare la biomassa residua come ammendante per migliorare la fertilità del terreno (Saviozzi et al., 2001; Serramiá et al., 2012) ma il processo di compostaggio risulta lento e crea uno sbilanciamento di nutrienti principalmente dovuto al basso apporto di azoto tanto da richiedere una correzione attraverso l'aggiunta di altri nutrienti.

È stato suggerito un possibile impiego della sansa umida per il settore della mangimistica (Castellani et al., 2017); la presenza di antiossidanti e di grassi vegetali polinsaturi con un bilanciato rapporto di  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 ed un'alta percentuale di grassi monoinsaturi (ac. Oleico) presenta alcuni effetti positivi nella produzione di prodotti carnei e influenza positivamente la composizione acidica di prodotti derivati dal latte; purtroppo l'apporto nutrizionale sbilanciato e l'elevata concentrazione di potassio delle sanse determina problemi sanitari di tipo gastrointestinale per il bestiame. Un'altra ricerca, mirata ad ovviare al problema dell'apporto nutrizionale sbilanciato e a favorire l'impiego di sanse denocciolate riporta l'utilizzo di trattamenti biologici che impiegano specie fungine (*Pleurotus sp.*) ma senza apprezzabili miglioramenti (Brozzoli et al., 2010). Va tenuto anche presente che il rapido irrancidimento dell'olio residuo a cui sono soggette le sanse riduce la palabilità del mangime costituendo un ostacolo per la valorizzazione della biomassa nel settore dell'alimentazione del bestiame.

Altri impieghi per la valorizzazione della sansa vedono tale matrice come co-substrato per la crescita delle tarme della farina (Ruschioni et al., 2020) e come fonte principale di carbonio organico per la produzione di surfattina da *Bacillus subtilis* (Maass et al., 2016). Questi metodi biologici hanno mostrato dei limiti di impiego e pur avendo delle potenzialità allo stato dell'arte non appaiono in grado di valorizzare a pieno tutta la biomassa residua annualmente prodotta.

Le sanse sono state proposte anche come materiale di base da utilizzare in ambito edilizio in quanto hanno conferito ai materiali, buone proprietà di isolamento sia termico che acustico, ma al momento presentano tali impieghi sono limitati a considerazioni di tipo tecnico e non ad una reale applicazione a livello edilizio (Gutierrez et al., 2020).

Sicuramente una valorizzazione delle sanse è stata ottenuta in tempi recenti attraverso un approccio "frazionale" (Ribeiro et al., 2020). Il nocciolino viene recuperato a valle del processo di estrazione attraverso l'uso di appositi macchinari (chiamati appunto denocciolatori) capaci di separare i frammenti dell'endocarpo dalla parte fibrosa costituita dalla polpa e delle bucce.

Il recupero del nocciolino rappresenta un'interessante fonte di reddito per il frantoiano in quanto già attualmente ha un valore di mercato, i frammenti del nocciolo nel contesto spagnolo vengono venduti intorno agli 80-100 € la tonnellata (García Martín et al., 2020). Tale residuo legnoso difatti possiede un elevato potere calorifico (tra i 18,8 MJ/kg e i 20,9 MJ/kg) ed è un combustibile particolarmente apprezzato, oltre che per tale aspetto, anche per la scarsa generazione di ceneri e per il basso contenuto di composti solforati e azotati presenti nei fumi. I frammenti legnosi possono trovare anche altri impieghi quali, ad esempio, essere usati come materia prima per la produzione di furfurale (Montané et al., 2002).

Il nocciolino dalle sanse può essere recuperato convenientemente da entrambi i processi continui a due e tre fasi ma la resa nel recupero risulta maggiore quando le sanse hanno un alto tenore di umidità e provengono quindi da un impianto a due fasi (di Serio et al., 2011). La parte residuale delle sanse dopo il recupero del nocciolino costituisce anch'essa una biomassa da valorizzare e che è stata considerata nel lavoro sperimentale di questa tesi di Dottorato denominandola "sansa umida denocciolata" (SUD). Una proposta per lo sfruttamento della sansa denocciolata è l'impiego, previa disidratazione, nel settore della mangimistica (Benincasa et al., 2021). Pur utilizzando la sansa come integratore al mangime del bestiame in quantità moderate (6%), tale uso richiede un'attenta valutazione dei costi energetici legati alla riduzione del tenore d'acqua per poter trovare una realistica applicazione di mercato.

Due linee di ricerca appaiono essere tra le più promettenti per valorizzare i sottoprodotti solidi dell'industria olearia: la prima vede le sanse come fonte di composti bioattivi ad alto valore aggiunto (antiossidanti e pectine) (Difonzo et al., 2021; Frankel et al., 2013), l'altra linea considera la biomassa come una potenziale fonte di energia rinnovabile (Christoforou and Fokaides, 2016).

Analogamente al discorso fatto per le acque di vegetazione, gli antiossidanti e le molecole di interesse salutistico e biomedico estratte dalle sanse faticano a trovare uno sfruttamento di tipo industriale a causa della loro eterogeneità quali-quantitativa. Va inoltre considerato che, di queste sostanze, sono ricche anche altre parti della pianta in particolare le foglie dalle quali possono essere estratte non soltanto nel periodo di raccolta delle olive, bensì tutto l'anno.

Anche le linee di sfruttamento della sansa a scopi energetici non sono del tutto immuni a problemi di tipo gestionale, infatti, le frazioni solide utilizzate a fini di sfruttamento energetico danno spesso problemi di agglomerazione (Williams et al., 2017).

Una delle più promettenti tecnologie per la valorizzazione energetica della biomassa derivante dall'estrazione dell'olio d'oliva con un sistema a due fasi è data dall'uso della digestione anaerobica (DA) (Borja et al., 2002; Messineo et al., 2020; Sánchez-Sánchez et al., 2020; Serrano et al., 2021).

La DA è stata definita come una "*core technology*" per la gestione sostenibile della sostanza organica (Verstraete et al., 2005) in quanto è in grado di dare energia rinnovabile, attraverso l'uso del biogas, e la sostanza organica stabilizzata a fine processo trova impiego come miglioratore della fertilità dei suoli (il digestato). L'opzione biotecnologica che vede l'impiego delle sanse umide come biomassa da usare nei digestori è ostacolata dalla presenza nelle stesse di sostanze recalcitranti alla degradazione da parte dei microrganismi, i polifenoli (Borja et al., 2003). Queste molecole, anche in condizioni di anaerobiosi, esplicano un'azione batteriostatica e costituiscono un impedimento al processo di produzione del biometano; i polifenoli non vengono degradati in condizioni acidogeniche e vengono solo parzialmente eliminati durante la fase di metanogenesi (Borja et al., 2005).

Quindi molto attiva risulta essere in questo ambito la ricerca sui pretrattamenti in grado di eliminare l'effetto batteriostatico dei fenoli e migliorare il potenziale metanigeno (*Biochemical Methane Potential* - BMP) delle sanse. Accanto ad una serie di trattamenti fisici che richiedono elevata quantità di energia basati essenzialmente su processi meccanici e termici, quali l'uso di microonde o di ultrasuoni da soli o in combinazione con composti chimici (Elalami et al., 2020; Serrano et al., 2017) si sono andati sviluppando una serie di trattamenti chimici a basso costo basati su sostanze alcaline e i loro sali, a volte in azione sinergica con il perossido di idrogeno, in grado di aumentare la produzione di biogas delle sanse umide (Pellera et al., 2016; Ruggeri et al., 2015; Siciliano et al., 2016a, 2016b). In questo lavoro sperimentale abbiamo analizzato gli effetti che trattamenti ossidativi basati sul reattivo di Fenton (Babuponnusami and Muthukumar, 2014) hanno sul BMP dei sottoprodotti provenienti da un sistema estrattivo a due fasi.

## 4 DIGESTIONE ANAEROBICA

### 4.1 INTRODUZIONE

In questo capitolo verranno analizzate le reazioni biochimiche che sottendono le fasi della digestione anaerobica (DA) e i processi legati alla produzione di biogas.

La DA a fini industriali è un processo biotecnologico complesso attraverso il quale la sostanza organica viene decomposta in condizioni anaerobiche da una biocenosi di organismi generando due prodotti che possiedono un valore economico: il digestato, in grado di essere successivamente utilizzato (dopo opportuna stabilizzazione) come ammendante per i terreni agricoli, e, soprattutto, un gas combustibile ad elevato potere calorifico: il biogas. Quest'ultimo è una fonte energetica rinnovabile ed è costituito principalmente da miscela, in proporzioni variabili, di due gas: il biossido di carbonio e il metano. La percentuale di metano nel biogas varia, a seconda del processo e della sostanza organica digerita, da un minimo del 50% ad un massimo che di solito si aggira attorno all'80%. La DA è un processo che si sviluppa spontaneamente in natura e permette la stabilizzazione della sostanza organica convertendo parte di essa in biogas; si realizza in diversi ambienti, ad esempio: nelle paludi, sul fondo dei bacini lacustri, nello stomaco dei ruminanti, nelle fosse settiche e nelle discariche.

Storicamente, nel 1630, le prime osservazioni scientifiche legate al biogas sono attribuibili Jan Baptista Van Helmont che fu tra i primi in età moderna a verificare la presenza di gas infiammabili provenienti dalla decomposizione della materia organica, ma solo alla fine del settecento con gli esperimenti di Volta si mise in diretta correlazione la quantità di gas infiammabili con la quantità di materia organica digerita. Nel 1875 un agricoltore olandese, Wouter Sluys, usò il metano proveniente dalla DA per scopi di illuminazione. Alla fine dell'ottocento in Inghilterra si ebbero i primi usi su larga scala del biogas per alimentare l'illuminazione pubblica. Durante la seconda guerra mondiale a causa della scarsità di approvvigionamenti vi fu un rinnovato interesse per questa tecnologia in Germania che è stata abbandonata, a conflitto finito, vista la relativa economicità di altre fonti di approvvigionamento legate ai combustibili fossili. Solo la crisi energetica degli anni 70 e l'accresciuto interesse per le fonti rinnovabili nel corso degli ultimi decenni hanno fornito un nuovo impulso a tale tecnologia (Deepanraj et al., 2014).

Attualmente in Europa il metano proveniente dal biogas viene utilizzato per la produzione di calore e/o energia attraverso tecnologie cogenerative; il surplus energetico può essere immesso nella rete sia come energia elettrica prodotta da motori stazionari sia come biometano grazie a tecnologie di *upgrading* in grado di ridurre ad una percentuale accettabile i composti indesiderabili presenti nel biogas stesso (ad es. H<sub>2</sub>S, silossani, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O...) e portare il metano ad una purezza tale da poter essere impiegato sia nell'autotrazione sia con l'immissione in rete.

La degradazione della materia organica in un processo di DA può essere schematizzata utilizzando una formula bruta generica per la matrice di partenza C<sub>a</sub>H<sub>b</sub>O<sub>c</sub>N<sub>d</sub> nel seguente modo (Cecchi et al., 2005):



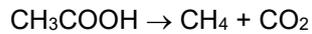
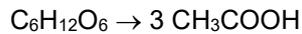
Con:

$$s = a - nw - m$$

$$r = c - ny - 2s$$

Dallo schema reattivo riportato si può vedere la parziale demolizione di un substrato organico complesso con la produzione di metano, biossido di carbonio e ammoniaca. Ma mentre il biossido di carbonio ha una parziale solubilità e si ripartisce anche nella fase acquosa il metano prodotto abbandona la fase liquida e si concentra quasi esclusivamente nella fase gassosa.

Di seguito un esempio dalla decomposizione di un substrato semplice come il glucosio per via anaerobica:



Le comunità microbiche procariotiche costituite da Archaea e Batteri, realizzino il processo di DA in presenza delle seguenti cinque condizioni:

- Assenza di ossigeno
- Assenza di luce
- Temperature al di sopra dei 5 °C
- Presenza di una biomassa degradabile
- Presenza di acqua e di nutrienti

L'estensione a livello industriale di questo processo naturale di stabilizzazione della materia organica ha permesso lo sfruttamento per fini energetici ed il trattamento di una serie di substrati organici di diversa origine e natura quali: i fanghi di supero derivanti dal trattamento delle acque reflue, le deiezioni animali, le acque derivanti dalle industrie agroalimentari, le biomasse agricole e la frazione organica dei rifiuti urbani (FORSU).

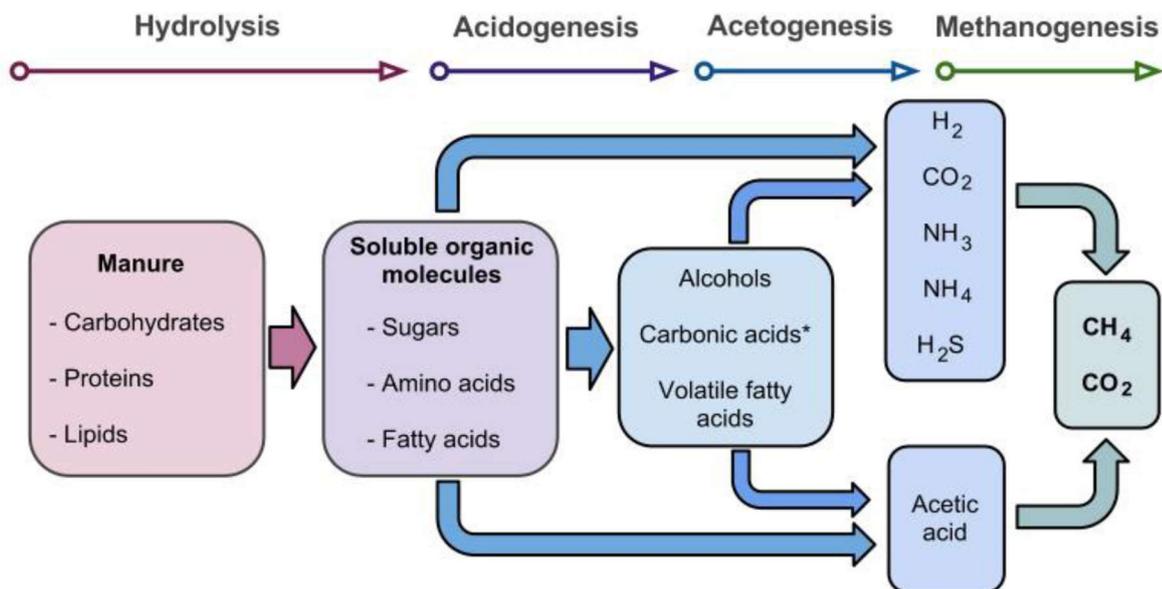
#### 4.2 FASI DELLA DIGESTIONE ANAEROBICA

Come accennato in precedenza il processo biologico della DA sfrutta l'azione sintrofica di diversi gruppi microbici interagenti tra di loro. Da un punto di vista biologico la DA può essere suddivisa in 4 fasi consecutive ma queste spesso possono avvenire simultaneamente in un digestore (Fig. 6):

- Idrolisi
- Acidogenesi
- Acetogenesi
- Metanogenesi

La fase di idrolisi prevede la scissione per via enzimatica delle macromolecole organiche complesse (ad es. carboidrati, proteine e grassi) nei loro costituenti monomerici (monosaccaridi, aminoacidi, acidi grassi) ad opera di diversi gruppi batteri idrolitici. I microrganismi idrolizzanti possono colonizzare il materiale particolato e degradarlo o produrre enzimi extracellulari (lipasi, proteasi, cellulasi, amilasi, xilanasi, pectinasi, etc.) per portare in soluzione la sostanza organica in forma di monomeri o oligomeri per poi assorbirla nel citoplasma. Un eccesso di oligomeri (aminoacidi e/o oligosaccaridi) in soluzione ha la capacità di inibire l'attività idrolitica dei batteri ed interferire con l'azione degli esoenzimi presenti nel medium. Il valore ottimale di pH per i batteri idrolitici è compreso nell'intervallo tra pH 5 e pH 6, conseguentemente anche gli enzimi idrolitici presentano un'attività enzimatica ottimale per valori di pH inferiori a 7.

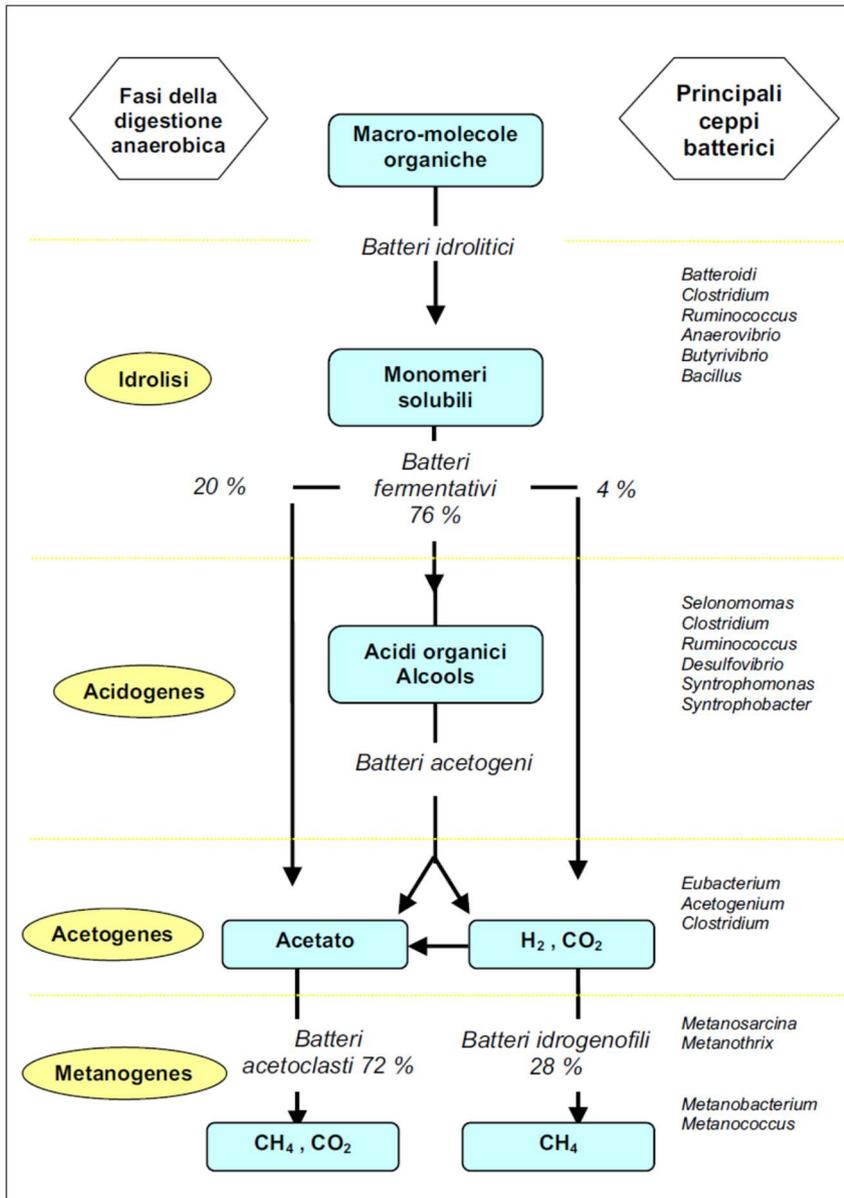
In generale l'attività idrolitica non implica la crescita dei microrganismi.



**Fig. 6.** Diagramma di flusso per le fasi del processo di digestione anaerobica Fonte: (Girard et al., 2013)

La disponibilità dei monomeri delle sostanze organiche permette l'inizio della fase acidogenica in cui i batteri fermentativi, che presentano un intervallo ottimale di pH più ampio rispetto ai batteri idrolitici (da pH 4.5 a pH 6), degradano aminoacidi, acidi grassi e monosaccaridi producendo acidi grassi a corta catena volatili (*volatile fatty acids* – VFA) (C1-C5) come ad es. acidi propionico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ) e butirrico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ) in equilibrio con le loro forme ioniche (propionato e butirrato) ma anche acidi a catena leggermente più lunga come l'acido valerico ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ) (Angelidaki et al., 1999). In questo step biologico vengono prodotte modeste quantità di idrogeno solforato ( $\text{H}_2\text{S}$ ),  $\text{CO}_2$ , alcoli (etanolo), acido lattico e acido acetico. Quest'ultimo verrà impiegato direttamente nella fase finale della metanogenesi (Fig. 7).

I substrati formati durante la fase di acidificazione vengono convertiti in acido acetico, idrogeno, anidride carbonica e, in misura minore, in acido formico dai batteri acetogeni nella fase detta, appunto di acetogenesi. I batteri acetogeni, come i metanogeni, presentano una crescita lenta e sono sensibili al cambiamento del carico organico e alle variazioni ambientali. Richiedono quindi un periodo di acclimatazione alle nuove condizioni ambientali prima di ritornare in una fase metabolica attiva.



**Fig. 7.** Schema generale del processo di digestione anaerobica con indicazione dei principali ceppi batterici per ciascuna fase della DA (Cecchi et al., 2005).

L'accumularsi di composti accettori di elettroni (lattato, etanolo, propionato, etc.) e dell'idrogeno non possono essere consumati dai metanogeni e devono essere metabolizzati ulteriormente da batteri idrogeno produttori obbligati acetogeni (OHPAs, *Obligate hydrogen-producing acetogens*) (Merlin Christy et al., 2014).



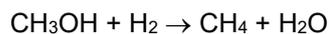
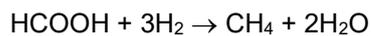
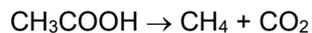
Le equazioni precedenti (propionato, glucosio ed etanolo) sono un esempio di come i substrati mostrati, che sono metaboliti prodotti dalla acidogenesi, vengano convertiti in acido acetico con produzione di idrogeno. La pressione parziale di tale gas (H<sub>2</sub>) svolge un ruolo importante in questa fase metabolica. Un contenuto eccessivo di idrogeno in fase acquosa, per questioni energetiche impedisce, la conversione dei prodotti

intermedi dell'acidogenesi, di conseguenza gli acidi organici come il propionico, l'isobutirrico, l'isovalerico e l'eicosanoico si accumulano ed inibiscono la formazione di metano. Per tale ragione i batteri acetogenici (che sono idrogeno formanti) devono coesistere in stretta correlazione sintrofica con gli Archaea che consumano l'idrogeno assieme alla CO<sub>2</sub> attraverso la respirazione acetogenica del bicarbonato e dei microrganismi omoacetogeni in grado di utilizzare l'idrogeno come fonte di elettroni per la riduzione dell'anidride carbonica o lo ione carbonato ad acetato (Schuchmann and Müller, 2016) in competizione con gli Archaea metanigeni.

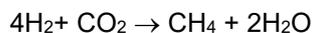


La metanogenesi è la fase finale della DA nella quale i procarioti metanigeni appartenenti al regno degli Archaea producono il metano attraverso due differenti vie sintetiche. Una via prevede la metanogenesi attraverso la dismutazione dell'acido acetico (o di altri idonei substrati quali il metanolo e acido formico) con formazione di metano ed anidride carbonica, la cosiddetta via acetoclastica. Un'altra via metabolica, ad opera dei batteri idrogenofili, prevede l'ossidazione anaerobica dell'idrogeno.

#### REAZIONI ACETOCLASTICHE O ACETOFILE



#### REAZIONE IDROGENOFILA



### 4.3 CINETICHE MICROBIOLOGICHE DI REAZIONE

Durante la fase di progettazione di un digestore anaerobico è necessario considerare le singole operazioni unitarie, le fasi di processo e le cinetiche alle quali hanno luogo le reazioni di trasformazione.

Un sistema microbiologico di DA dal punto di vista cinetico è caratterizzato da due differenti processi:

- La velocità di crescita netta della biomassa microbica che utilizza come fonte di carbonio un determinato substrato
- La velocità di utilizzo del substrato considerato

La velocità di crescita dei microrganismi (che tiene in considerazione il decadimento endogeno  $k_d X$ ) può essere rappresentata dalla seguente equazione generale

$$\frac{dX}{dt} = Y \frac{dS}{dt} - k_d X$$

Dove:

- $dX/dt$ , velocità di crescita dei microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup> tempo<sup>-1</sup>];
- $Y$  coefficiente di rendimento di crescita, [massa (microrganismi formati) \* massa (substrato utilizzato)<sup>-1</sup>];
- $dS/dt$  velocità di utilizzazione del substrato da parte dei microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup> tempo<sup>-1</sup>];
- $k_d$  coefficiente di decadimento dei microrganismi, [tempo<sup>-1</sup>];
- $X$ , concentrazione di microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup>].

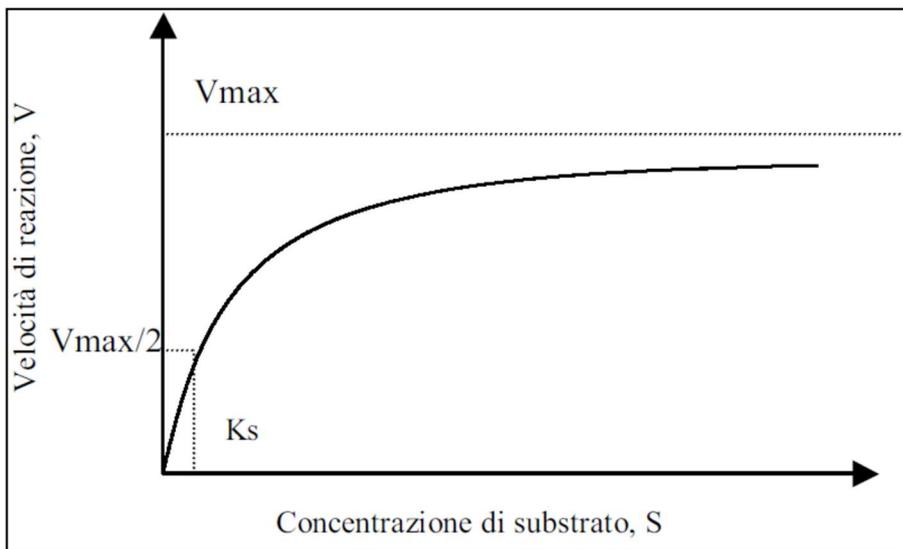
Per modellizzare l'uso del substrato si fa riferimento al modello cinetico di Michaelis-Menten esprimibile con la seguente relazione:

$$\frac{dS}{dt} = K_M X \frac{S}{K_S + S}$$

Dove:

- $dS/dt$ , velocità di utilizzazione del substrato da parte dei microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup> tempo<sup>-1</sup>];
- $K_M$ , massima velocità di utilizzo del substrato per unità di massa di microrganismi, [tempo<sup>-1</sup>];
- $X$ , concentrazione di microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup>];
- $S$ , concentrazione del substrato a contatto con i microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup>];
- $K_S$ , coefficiente di semi-saturazione, corrispondente alla concentrazione di substrato  $S$  alla quale la velocità di utilizzo del substrato per unità di massa di microrganismi è pari alla metà della velocità massima, [massa volume<sup>-1</sup>].

Da notare che la velocità di utilizzo del substrato tende asintoticamente al suo massimo per valori di concentrazione del substrato  $S$  grandi o per valori di  $K_S$  piccoli (Fig. 8). Il coefficiente  $K_S$  che quantifica l'affinità tra lo specifico enzima deputato alla degradazione e il substrato determina la maggiore o minore celerità con cui la curva tende al suo massimo.



**Fig. 8.** Rappresentazione grafica della cinetica di reazione biologica (Cecchi et al., 2005)

Combinando le equazioni cinetiche di crescita dei microrganismi e di utilizzo del substrato si ottiene:

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = YK_M \frac{S}{K_S + S} - k_d$$

Definiamo  $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$  la velocità specifica di crescita dei microrganismi e  $YK_M = \mu_{MAX}$  la massima velocità specifica di crescita, sostituendo si ottiene:

$$\mu = \mu_{MAX} \frac{S}{K_S + S} - k_d$$

Nel caso in cui si abbia un eccesso di substrato, cioè per valori di S molto più grandi di  $K_s$  ( $S \gg K_s$ ), l'espressione di Monod si può semplificare con l'equazione di una cinetica di ordine zero rispetto al substrato S, e pertanto si avrà:

$$\mu = \mu_{MAX} - k_d$$

Qualora ci si trovi in condizioni di substrato limitante, con valori di  $K_s$  non trascurabili (scarsa affinità tra substrato ed enzima specifico), il modello di Monod diviene una cinetica di primo ordine e pertanto assume la forma:

$$\mu = \mu_{MAX} \frac{S}{K_s} - k_d$$

Overo una cinetica del primo ordine (Cecchi et al., 2005).

#### 4.4 PROCESSO DI DIGESTIONE ANAEROBICA

Gli impianti di DA si caratterizzano in funzione della filiera di approvvigionamento delle biomasse, delle caratteristiche della materia organica in ingresso, dei pretrattamenti o post-trattamenti necessari e dalla tipologia di reattori scelta. I parametri di gestione di un reattore determinano l'esercizio in termini di tempi, di presenza della biomassa che alimenta il reattore, di concentrazione dei microrganismi, di rese di produzione di biogas in funzione al volume del reattore ed alle caratteristiche del substrato trattato.

Il carico organico che alimenta un reattore può essere definito in termini di:

- Solidi Totali (ST) o Sostanza Secca (SS) (% sul tal quale). Rappresenta il contenuto in sostanza secca di un campione, determinato per essiccazione in stufa a 105 °C fino a raggiungimento di peso costante (di solito dopo 24h);
- Solidi Volatili (SV) (% sulla sostanza secca), cioè la frazione di sostanza secca che risulta volatilizzata per combustione a 550 °C fino a peso costante, questo parametro rappresenta, in prima approssimazione, la frazione organica della sostanza secca.

Altri parametri spesso utili per descrivere la biomassa in ingresso in un digestore anaerobico sono:

- COD (*Chemical Oxygen Demand*) la domanda chimica di ossigeno, ovvero la quantità di ossigeno necessaria per ossidare la sostanza organica attraverso l'uso di un forte agente chimico ossidante, il bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ), in ambiente acido.
- BOD<sub>5</sub>, (*Biochemical Oxygen Demand*) definibile come la quantità di ossigeno consumata in 5 giorni dai microrganismi aerobi (inoculati o già presenti nella soluzione da analizzare) per ossidare al buio e alla temperatura di 20 °C le sostanze organiche presenti in un litro d'acqua o di soluzione acquosa.
- Ceneri o Sostanza Inerte (% sulla sostanza secca). È la frazione residua dopo la combustione a 550 °C fino a peso costante.

#### 4.5 PARAMETRI DI PROCESSO DELLA DIGESTIONE ANAEROBICA

La complessità del processo di DA ha portato allo sviluppo di diverse configurazioni di processo e di impianto. In funzione delle concentrazioni di solidi che caratterizza il rifiuto organico trattato possiamo distinguere le tecniche di DA in 3 tipologie (Cecchi et al., 2005):

- La digestione ad umido (*wet digestion*) quando il contenuto di sostanza organica secca non supera il ST < 10%. Questa è la tecnica più diffusa in particolare per il trattamento dei liquami zootecnici.

- La digestione a semi secco (*semi-dry digestion*) quando il contenuto di solidi totali è compreso mediamente tra il 10 e il 20% ( $10% < ST < 20%$ ).
- La digestione a secco (*dry digestion*) quando il contenuto di solidi è superiore al 20%

Il processo di DA può essere suddiviso in:

- processo monostadio o monofase, quando tutte le fasi di idrolisi, fermentazione acida e metanigena avvengono contemporaneamente in un unico reattore. Pertanto la fase più lenta del processo costituisce l'elemento di dimensionamento del reattore;
- processo bi-stadio o bifase, quando si hanno due reattori distinti posti in serie tra loro. Nel primo hanno luogo i fenomeni di idrolisi/acidogenesi ed acetogenesi, mentre la fase metanigena avviene nel secondo reattore. Ciò permette di associare il tempo di residenza nel reattore alle diverse cinetiche dei ceppi microbici connessi alle due distinte fasi del processo di DA.

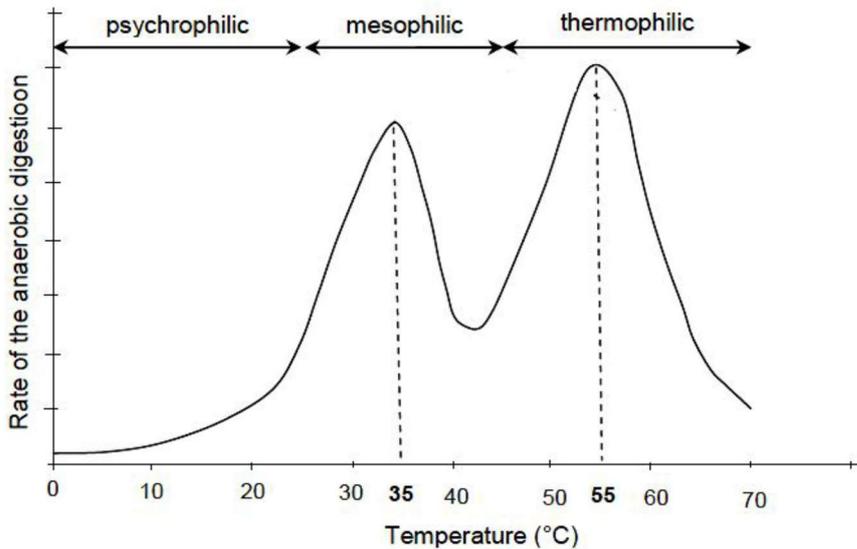
In funzione di come viene alimentato un digestore possiamo distinguere due tipologie sostanziali di processo:

- **Processi continui:** quei processi in cui il digestore è alimentato in modo continuo o semi-continuo con un tempo di permanenza medio del substrato nel reattore espresso dal tempo di residenza idraulico (HRT) e quello dei microrganismi dal tempo di residenza dei solidi (SRT). I processi possono essere, a seconda della soluzione adottata, ad una o due fasi. Esempi di processi continui:
  - o Processo in reattore continuo completamente miscelato (senza ricircolo) (*Continuous Stirred Tank Reactor* - CSTR). Nell'effluente la concentrazione del substrato, dei prodotti e della biomassa è uguale a quella nel reattore, il cui contenuto è assunto omogeneo.
  - o Processo in reattore continuo completamente miscelato (con ricircolo) (*Continuous Stirred Tank Reactor* - CSTR). Il ricircolo viene utilizzato per intensificare l'efficienza dei processi di stabilizzazione. Con il ricircolo di parte dell'effluente, la biomassa attiva viene reintrodotta nel reattore, garantendo quindi maggiori concentrazioni di microrganismi all'interno del reattore ed un tempo di residenza dei solidi (batteri) diverso da quello idraulico. Questo viene generalmente ottenuto separando la frazione liquida da quella solida e riciclando quest'ultima all'interno del reattore.
  - o Processo continuo in reattore con flusso a pistone (con o senza ricircolo) (*Plug Flow Reactor* - PFR): il processo ideale prevede un'alimentazione (con flusso continuo o semi-continuo) da un lato del sistema ed un successivo avanzamento lungo uno degli assi del reattore in direzione dell'uscita, senza subire mescolamenti lungo questa direzione; l'unico mescolamento possibile è ortogonale rispetto all'asse di avanzamento del substrato.
  - o Processo continuo a fasi separate: come accennato in precedenza le condizioni di crescita ottimali per i batteri idrolitici/acidificanti e per quelli metanigeni sono diverse quindi la separazione delle fasi in reattori distinti appare una soluzione ottimale per incrementare le rese dei due processi.
- **Processi discontinui:** il processo viene gestito in maniera cosiddetta "batch"; si avrà, cioè, l'alimentazione del reattore con il substrato ed un inoculo ed il conseguente avanzamento del processo fino ad esaurimento della componente organica degradabile dai microrganismi. Mentre in reattori continui di tipo CSTR il processo viene operato in un punto ottimale della curva di crescita della coltura per produzione e stabilità, nel caso di reattori batch si sfrutta tutta la curva di crescita, dall'inizio alla fine.

Anche la temperatura risulta un parametro estremamente importante per qualificare il processo di DA, in quanto la temperatura nel digestore determina le tipologie di comunità microbiche presenti nel reattore e

influenza le cinetiche di reazione; possono essere distinte tre condizioni fondamentali in funzione dell'intervallo di temperatura applicato (Fig. 9):

- Condizioni psicrofile; quando la DA si svolge con temperature inferiori ai 20 °C
- Condizioni mesofile; queste rappresentano le condizioni più diffuse nella conduzione dei digestori e il cui intervallo di temperature può essere ricompreso tra i 20 °C e i 40 °C
- Condizioni termofile quando la temperatura di esercizio del digestore supera i 45 °C.



**Fig. 9.** Influenza della temperatura sulla velocità di digestione anaerobica (Lettinga et al., 2001)

I principali **parametri di gestione** del reattore sono:

- Il **Tempo medio di residenza idraulico** (*Hydraulic Retention Time – HRT*) [giorni]. Tale parametro è definito come il rapporto tra il volume utile del reattore preso in considerazione e la portata di alimentazione del reattore stesso. Rappresenta il tempo di permanenza di ogni elemento fluido all'interno del reattore (questa affermazione è vera in senso stretto per i soli reattori ideali) o, più in generale, la media dei tempi di permanenza nel reattore dei vari elementi di fluido che permarranno in tempi diversi all'interno del reattore in relazione alla geometria costruttiva e ad altri parametri caratteristici:

$$HRT (g) = \frac{V_{reattore}(m^3)}{Q(\frac{m^3}{g})}$$

Dove:

V è il volume utile del reattore [m<sup>3</sup>]

Q è la portata in ingresso al reattore [m<sup>3</sup>/giorno]

- Il **Tempo medio di residenza dei fanghi** (*Solids Retention Time – SRT*) [giorni], è definito come il tempo medio di residenza dei fanghi all'interno del reattore ed è dato dal rapporto tra la massa totale di solidi volatili presenti nel reattore e la portata di solidi volatili estratta dal reattore. Si avrà quindi:

$$SRT (g) = \frac{V_{reattore} (m^3) * SV_{concentrazione} (\frac{kg SV}{m^3})}{Q_s (\frac{kg SV}{g})}$$

Dove:

V è il volume utile del reattore [m<sup>3</sup>];

SV<sub>concentrazione</sub>: è la concentrazione dei Solidi Volatili all'interno del reattore, [kg SV/m<sup>3</sup>];

Q<sub>s</sub>: la portata di Solidi Volatili estratta dal reattore, [kg SV/giorno].

- Carico Organico Volumetrico (Organic Loading Rate - OLR). Il carico organico volumetrico di una biomassa applicato al reattore è definito come la quantità di substrato in ingresso nel reattore riferita all'unità di volume del reattore stesso nell'unità di tempo. Analiticamente:

$$OLR \left( \frac{kg_{substrato}}{m^3_{reattore} g} \right) = \frac{Q \left( \frac{m^3}{g} \right) * SV_{concentrazione} \left( \frac{kg SV}{m^3} \right)}{V (m^3)}$$

Dove:

l'OLR quindi risulta il fattore di carico organico volumetrico in termini di substrato riferito al volume del reattore [kg substrato/m<sup>3</sup> reattore giorno];

Q è la portata influente [m<sup>3</sup>/giorno];

SV<sub>concentrazione</sub>: è la concentrazione di substrato nella portata influente [kg/m<sup>3</sup>];

V il volume del reattore [m<sup>3</sup>].

- Produzione specifica di gas (Specific Gas Production – SGP). Il parametro rappresenta la quantità di biogas prodotta per unità di sostanza volatile alimentata al reattore; viene espressa in termini di [m<sup>3</sup>biogas/kgsubstrato]. Questo parametro, serve per definire le rese dei processi di digestione anaerobica, ed è correlato alla biodegradabilità della materia organica sottoposta a trattamento. Dal punto di vista analitico può essere espresso come il rapporto:

$$SGP \left( \frac{m^3}{kg SV} \right) = \frac{Q_{biogas} \left( \frac{m^3}{g} \right)}{Q \left( \frac{m^3}{g} \right) * SV_{concentrazione} \left( \frac{kg SV}{m^3} \right)}$$

Dove:

Q<sub>biogas</sub> è la portata di biogas prodotto nell'unità di tempo, [m<sup>3</sup>/giorno];

Q è la portata influente, [m<sup>3</sup>/giorno];

SV<sub>concentrazione</sub>: è la concentrazione di substrato nella portata influente, [kg/m<sup>3</sup>].

- Velocità di produzione del biogas (Gas Production Rate – GPR). È definita come la portata di biogas prodotto rispetto al volume del reattore ed al tempo.

$$GPR \left( \frac{m^3 \text{ biogas}}{m^3 \text{ reattore g}} \right) = \frac{Q_{\text{biogas}} \left( \frac{m^3}{g} \right)}{V(m^3)}$$

GPR è velocità di produzione del biogas, [ $m^3$  biogas /  $m^3$  reattore giorno];

$Q_{\text{biogas}}$  la portata di biogas prodotto, [ $m^3$ /giorno];

V il volume del reattore, [ $m^3$ ].

- Efficienza di rimozione del substrato  $\eta$ : è definibile come la misura, espressa in termini percentuali, della conversione della sostanza organica in biogas.

$$\eta (\%) = \frac{Q \left( \frac{m^3}{g} \right) * SV_{\text{concentrazione}} \left( \frac{kg \text{ SV}}{m^3} \right) - Q \left( \frac{m^3}{g} \right) * SV_{\text{conc. effluente}} \left( \frac{kg \text{ SV}}{m^3} \right)}{Q \left( \frac{m^3}{g} \right) * SV_{\text{concentrazione}} \left( \frac{kg \text{ SV}}{m^3} \right)}$$

$\eta$  è la percentuale di SV rimossi [%];

Q è la portata influente ed effluente [ $m^3$ /giorno];

$SV_{\text{concentrazione}}$ : è la concentrazione di substrato nella portata influente, [ $kg/m^3$ ];

$SV_{\text{conc. effluente}}$ : è la concentrazione di substrato nella portata effluente, [ $kg/m^3$ ].

I **parametri di stabilità del processo** di DA servono per monitorare al fine di mantenere in condizioni operative ottimali e stabili la produzione di biogas. Di particolare importanza per il processo di DA sono: il pH, la concentrazione di acidi grassi volatili (VFA), l'alcalinità, il rapporto tra acidi grassi volatili ed alcalinità, la produzione e composizione percentuale del biogas, la temperatura. Per stimare la stabilità di un processo di DA i parametri appena elencati vanno valutati complessivamente in quanto la variazione di un singolo parametro, se non valutata contestualmente con gli altri, potrebbe risultare di difficile interpretazione.

Il pH

Il pH è un parametro importante ai fini della comprensione della stabilità di un processo di digestione. Questi è strettamente correlato alla capacità tamponante del mezzo di reazione e all'equilibrio (o lo sbilanciamento) tra le specie microbiche che partecipano alla catena trofica nel processo di DA. Normalmente vengono considerati stabili i digestori che operano in un intervallo di pH vicino alla neutralità  $6,5 < \text{pH} < 7,5$ .

Il valore è influenzato principalmente dall'anidride carbonica e dalle sue forme ioniche disciolte in soluzione, ma rivestono un ruolo importante nel determinare il pH anche altre specie chimiche quali l'ammoniaca o gli acidi grassi volatili. Condizioni di squilibrio del sistema che portano a deviare dell'optimum di processo vengono registrate dalla variazione del pH con un certo ritardo in quanto quando il pH del mezzo inizia a modificarsi significativamente indica che i carbonati disciolti hanno già esaurito tutta la capacità di agire come tampone.

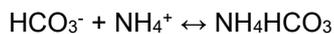
Schema di funzionamento reazioni di equilibrio dei carbonati:



R-H: acido organico.

ALCALINITÀ (capacità tampone)

Questo parametro è di estrema importanza nei processi anaerobici e rappresenta la capacità del sistema di neutralizzare gli idrogenioni rilasciati dagli acidi organici e da altre sostanze acidificanti presenti nel mezzo acquoso. L'alcalinità viene determinata analiticamente per titolazione con acido cloridrico ed espressa in termini di concentrazione di carbonato di calcio (valori di alcalinità dell'ordine di 3000-5000 mg CaCO<sub>3</sub> per litro sono tipici di digestori anaerobici operanti in condizioni stabili). Per comprendere il ruolo dell'alcalinità bisogna tener presente che i tassi di crescita dei metanigeni sono estremamente ridotti se confrontati ad altri ceppi batterici presenti nel digestore e può capitare che in occasione di un incremento del carico organico vengano avvantaggiate le proprietà idrolitiche e acidificanti di alcuni membri della comunità microbica presenti nel digestore. Ciò porta ad uno sbilanciamento tale da creare un ambiente sfavorevole alla componente metanigena. Si avrà, pertanto, una fase transitoria in cui verrà osservato un incremento di concentrazione degli acidi grassi volatili ed un abbassamento del pH. L'alcalinità di un digestore anaerobico è dovuta principalmente dalla coesistenza di ammoniaca, originata dalla degradazione di proteine, e di bicarbonato derivante dalla dissoluzione del biossido di carbonio nel mezzo acquoso (sistema calcio-acetico).



La formazione di bicarbonato d'ammonio porta ad una elevata alcalinità del mezzo e ad un controllo del processo di accumulo di acidi grassi volatili (VFA)

#### ACIDI GRASSI VOLATILI (VFA)

Gli acidi grassi volatili (*volatile fatty acid* – VFA) vengono normalmente prodotti durante il processo di DA, questi presentano una formula generale R-COOH dove R sta per un gruppo alchilico a catena corta. La concentrazione dei VFA viene espressa in termini di acido acetico (o in termini di COD in funzione del substrato) e varia dai 200 fino ai 2000 mgAc/L. Di norma questo parametro è significativo, non tanto a livello di concentrazione assoluta, quanto, piuttosto, in termini di variazione della concentrazione nel sistema. Variazioni repentine con incremento della concentrazione indicano che il processo è orientato verso percorsi acidogenici piuttosto che metanigeni con conseguente sbilanciamento della catena trofica e derive del sistema verso valori bassi di pH. Il valore di concentrazione dei VFA per una valutazione complessiva della stabilità del processo non va disgiunto dal dato della produzione del biogas e dalla sua composizione, oltre che dai dati relativi a pH ed alcalinità.

## 5 DARK FERMENTATION

Il crescente bisogno di vettori e fonti di energia sostenibili utili alla decarbonizzazione dei processi industriali pone un sempre maggiore interesse sull'idrogeno, in quanto questo elemento, o meglio, la sua molecola in fase gassosa può essere impiegata in moltissime applicazioni energetiche senza produrre emissioni clima alteranti. Tale interesse ha investito anche l'idrogeno prodotto attraverso l'uso di bioprocessi (bioidrogeno) (EUROPEAN COMMISSION, 2020).

La produzione biologica di idrogeno consiste nella conversione microbiologica di acqua, luce solare e/o substrati organici in idrogeno, attraverso l'azione degli enzimi idrogenasi (Hasi) o nitrogenasi (Nasi) (Benemann and Pedroni, 2007). La produzione biologica di H<sub>2</sub> può essere quindi fotobiologica, utilizzando alghe verdi, cianobatteri o batteri fotosintetici, oppure può avvenire tramite la fermentazione in assenza di luce definita anche fermentazione oscura (*Dark Fermentation* - DF) (Fig. 10).

Nel presente lavoro di tesi è stata valutata, limitatamente alla matrice denocciolata, l'effetto dei pretrattamenti proposti sul potenziale biochimico di idrogeno (*Biochemical Hydrogen Potential* - BHP) della sansa.

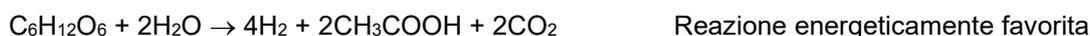
Attualmente la DF è la tecnologia preferenziale per la produzione di bioidrogeno perché, contrariamente alle reazioni che necessitano di una sorgente luminosa, può generare H<sub>2</sub> con continuità, inoltre, i metaboliti finali (acidi organici e alcoli) a valle del processo possono essere efficacemente impiegati da sistemi quali la DA per la produzione di metano, la fotofermentazione per la produzione di ulteriore H<sub>2</sub> o, ancora, essere utilizzati come materia prima per la produzione di molecole di valore commerciale (Ghimire et al., 2016).

Durante la DF diversi gruppi di batteri (fondamentalmente delle famiglie *Clostridia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Ruminococcus*, *Thermoanaerobacterium* e *Thermococcus*) prevedono la produzione di H<sub>2</sub> a partire dalle biomasse di scarto; tali microrganismi vengono definiti complessivamente come batteri idrogeno produttori obbligati acetogeni (*Obligate hydrogen-producing acetogens* – OHPAs) (Merlin Christy et al., 2014).

L'idrogeno all'interno del processo di DA è un metabolita intermedio che, una volta prodotto nella fase acidogenica, viene successivamente consumato dai batteri metanigeni per la riduzione dell'anidride carbonica in metano (reazioni idrogenofile) (Giovannini et al., 2016). La pressione parziale del bioidrogeno è spesso usata, per questo motivo, proprio come un parametro per valutare la stabilità del processo di produzione di biogas nel digestore. La DF basandosi su processi legati alla DA è una tecnologia particolarmente matura dal punto di vista impiantistico; tanto che l'idrogeno prodotto in una DA bi-stadio può essere utilizzato per produrre il bio-hythane (idrometano) ovvero una miscela di metano (70-90%) e idrogeno (10-30%) (Ramprakash et al., 2022).

Va comunque sottolineato che le fermentazioni anaerobiche in assenza di luce hanno un rendimento piuttosto modesto. I batteri anaerobi riescono a produrre dalla conversione di una mole di glucosio un massimo di 4 moli di H<sub>2</sub> (limite di Thauer) rispetto alle 12 teoricamente possibili e la resa reale resta spesso limitata a sole 2 o 3 moli di H<sub>2</sub> per mole di glucosio.

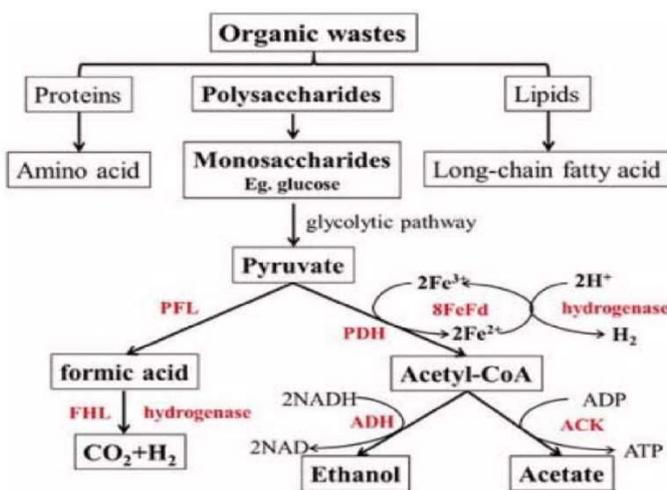
La possibilità di estrarre energia dai glucidi all'atto pratico si limita al 20-25% dell'energia potenzialmente utilizzabile a disposizione. Ciò avviene per ragioni strettamente termodinamiche legate al processo; ad es. una resa di quattro moli di H<sub>2</sub> e due di acetato a partire da una mole di glucosio produce la più alta variazione di energia libera di Gibbs -215 kJ/mole (a 25 °C e 1 atm). L'energia estratta dalla reazione appena descritta è utilizzata dai batteri per formare 4 moli di ATP per mole di glucosio.



La produzione di una quantità stechiometrica di 12 moli di H<sub>2</sub> per mole di glucosio ha una resa energetica estremamente bassa pari a -26 kJ/mole<sub>(glucosio)</sub> o circa -2 kJ/mole di H<sub>2</sub>, (a 25 °C e 1 bar); tale resa non è energeticamente sufficiente dal punto di vista metabolico e quindi la reazione non ha luogo.

Come accennato in precedenza, la produzione di bioidrogeno è basata principalmente sull'azione degli enzimi idrogenasi, che riducono i protoni presenti nell'acqua a H<sub>2</sub> gassoso mediante l'ossidazione di un forte agente riducente. Le idrogenasi sono state trovate in microrganismi appartenenti ai tre diversi domini del mondo vivente: archaea, bacteria ed eucarya. L'agente riducente, come ad es. la ferredoxina, l'NAD(P)H (ridotto) o la flavodoxina (quest'ultima è un'alternativa priva di ferro quando questi è un fattore limitante nel mezzo di crescita) è un vettore di elettroni ridotto.

Le idrogenasi sono enzimi reversibili capaci di portare a termine anche la reazione inversa, utilizzando l'H<sub>2</sub> e riducendo i trasportatori di elettroni in funzione della pressione parziale dell'H<sub>2</sub> e del percorso metabolico innescato. Dal punto di vista funzionale e fisiologico, questi enzimi sviluppano H<sub>2</sub> gassoso come mezzo per eliminare l'eccesso di agenti riducenti. La caratteristica comune a tutte le idrogenasi è di essere proteine Fe-S, in cui gli atomi di Fe sono organizzati in gruppi Ferro - Solfuro [Fe-S] (Benemann and Pedroni, 2007).



**Fig. 10.** Vie metaboliche per la generazione di idrogeno attraverso la DF (PDH: Pyruvate dehydrogenase; PFL: Pyruvate formate lyase; FHL: Formate hydrogen lyase; ADH: Alcohol dehydrogenase; ACK: Acetate kinase) (Yahaya et al., 2022)

## 6 PARTE SPERIMENTALE: GLI OBIETTIVI

L'attività sperimentale è stata condotta prevalentemente nel Laboratorio di Biomasse e Biotecnologie per l'Energia dell'ENEA nel Centro Ricerche della Casaccia. Una parte sperimentale si è svolta presso il Dipartimento di Ingegneria e Geologia dell'Università di Chieti e Pescara dove sono state preparate le sanse prima delle prove di biometanazione e dove sono stati misurati i fenoli totali per via spettrofotometrica e lo zolfo presente nelle unità di assorbimento.

I sottoprodotti solidi provenienti dal processo produttivo continuo a due fasi dell'industria olearia costituiscono un problema ambientale in particolar modo per le nazioni europee e le nazioni del bacino del mediterraneo dov'è concentrata la maggior parte della produzione mondiale (FAO, 2022).

Nonostante i numerosi tentativi di valorizzazione di tali biomasse residue queste restano un problema ambientale importante per il comparto agroindustriale oleico che è costretto ad una difficile gestione della materia organica residuale soprattutto quando è venuta a mancare, a causa dell'elevato tenore di umidità, la possibilità di indirizzare tali biomasse ai sansifici per il recupero industriale dell'olio residuo (olio di sansa d'oliva greggio).

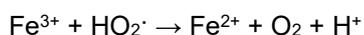
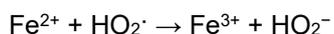
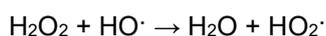
Come anticipato precedentemente (paragrafo 3.4.), molteplici sono i tentativi in ambito scientifico e tecnologico di valorizzare le sanse umide.

In questo lavoro sperimentale abbiamo investigato gli effetti che trattamenti ossidativi basati sul reattivo di Fenton (Babuponnusami and Muthukumar, 2014) hanno sul BPM dei sottoprodotti provenienti da un sistema estrattivo a due fasi: le sanse umide vergini (SUV) ovvero le sanse che vengono da un decanter a due fasi e le sanse umide denocciolate (SUD) ovvero la parte fibrosa delle sanse umide dopo che da queste è stato recuperato il nocciolino.

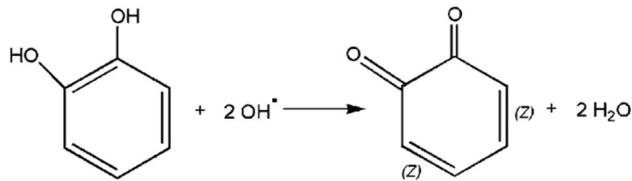
Il trattamento ossidativo basato sul Reattivo di Fenton può essere inoltre considerato a tutti gli effetti un processo "verde" in quanto segue i principi della "*green chemistry*" (Anastas and Kirchhoff, 2002); non lascia residui nel digestato (il perossido di idrogeno si decompone in ossigeno e acqua) e, pur non essendo un reagente specifico, è in grado di ossidare i composti fenolici (Bressan et al., 2004; Girardi et al., 2014; Lucas and Peres, 2009) riducendone l'effetto batteriostatico durante la DA.

Il reattivo di Fenton si basa sulla reazione che avviene in soluzione acquosa tra il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e lo ione ferro (II). Tale reazione sviluppa un radicale ossidrilico con un potenziale ossidativo estremamente alto (2,73 V) (Wang and Zhang, 2018) che è in grado di reagire con le sostanze fenoliche ossidandole.

Reazione di Fenton:

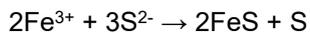
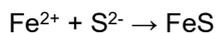


Di seguito, un possibile schema di ossidazione di un ortodifenolo attraverso la reazione con i radicali ossidrilici:



Il cloruro ferroso inoltre, come altri composti ferrici e ferrosi, è normalmente impegnato, come sorgente di ioni  $\text{Fe}^{2+}$ , nei digestori anaerobici per abbattere il contenuto di idrogeno solforato ( $\text{H}_2\text{S}$ ) presente nel biogas (Muñoz et al., 2015). Tali sali di ferro se uniti alla matrice prima del digestore anaerobico non pregiudicano i processi di biometanazione (Al-Imarah et al., 2017). L'uso di sali di ferro costituisce una soluzione impiantistica semplice per ridurre il tenore di  $\text{H}_2\text{S}$  nel biogas; basta un serbatoio per contenere i reagenti e una pompa dosatrice per immettere i composti a base di ferro nel digestore o per mescolarli alla biomassa da trattare. Per questo motivo è adottata prevalentemente in impianti medio-piccoli con un basso livello di tecnologia.

L'abbattimento del solfuro di idrogeno in fase acquosa attraverso l'uso dei sali di ferro avviene secondo il seguente schema:



Il ferro e lo zolfo combinandosi producono dei sali insolubili che sequestrano lo ione solfuro e restano in sospensione nella fase liquida, riducendo quindi la quota di idrogeno solforato in grado di ripartirsi tra la fase acquosa ed il biogas.

I trattamenti ossidativi investigati quindi hanno avuto il duplice scopo di vedere se fossero in grado avere effetto sia sul BPM e sia sul tenore di idrogeno solforato nel biogas.

Le due matrici sono state successivamente oggetto di altri test. Si è indagato l'effetto che gli stessi trattamenti hanno sulla produzione potenziale di bioidrogeno BHP (*Biohydrogen production potential*) nella matrice denocciolata (SUD) (Mugnai et al., 2021). Sulle SUV è stato investigato l'effetto che un'elevata diluizione nei test di BMP ha sulla cinetica di generazione e sulla quantità complessiva di biometano prodotto.

## 7 MATERIALI E METODI

Come anticipato precedentemente, la sperimentazione ha riguardato due tipologie di matrici provenienti dal processo estrattivo a due fasi: una sansa umida vergine (SUV) e una sansa umida denocciolata (SUD).

La prima costituisce il classico sottoprodotto proveniente da un sistema estrattivo con un decanter a due fasi mentre la seconda è la parte polposa e fibrosa che resta dopo il recupero del nocciolino ovvero la parte del mesocarpo dopo che i frammenti dell'endocarpo sono stati recuperati da un separatore. Il nocciolino, per via dell'alto potere calorifero che oscilla tra 18,8 MJ/kg ed i 20,9 MJ/kg ha già un valore di mercato (80-100 € la tonnellata (García Martín et al., 2020) ed è utilizzato principalmente come biomassa combustibile ma può essere impiegato come materia prima per la produzione di fururale (Montané et al., 2002).

### 7.1 CAMPIONAMENTO DELL' INOCULO

L'inoculo attivo destinato alle prove di metanogenesi è stato prelevato periodicamente da un impianto di biogas presso l'Azienda Agricola Bruni di Sutri (VT) Italy. Tale impianto tratta prevalentemente residui provenienti da allevamenti bovini. L'inoculo una volta prelevato viene poi successivamente filtrato in laboratorio al fine di rimuovere il materiale particolato sospeso (ad es. paglia) facendo passare il digestato attraverso un setaccio (< 1 mm) e lasciando unicamente la frazione liquida, ovvero quella che contiene i consorzi batterici atti ad innescare la DA senza materiale organico interferente.

La frazione liquida prima di essere impiegata negli esperimenti di biometanazione viene messa a degassare, non chiudendo ermeticamente il contenitore, per 10 giorni in condizioni mesofile senza l'aggiunta di alcun nutriente (35-38 °C). La predigestione dell'inoculo, sebbene l'apporto metanigeno sia valutato con prove in bianco, serve a ridurre la generazione di biogas non specifico e a diminuire l'influenza dello stesso sul risultato finale (Raposo et al., 2011).

L'inoculo, per il test di BHP sulle SUD, è stato sottoposto a trattamento di disidratazione termica a 105 °C per 24 h al fine di selezionare i microrganismi idrogeno produttori. Una volta raffreddato, è stato successivamente macinato e setacciato per escludere le granulometrie superiori a 850 µm in accordo con il protocollo standardizzato applicato (Carrillo-Reyes et al., 2019).

### 7.2 CAMPIONAMENTO DELLE SANSE

Le sanse sono state campionate rispettivamente all'uscita di un separatore centrifugo a due fasi del Frantoio Tiberio Ernesto s.a.s. della Regione Abruzzo, Tollo, Chieti, *Italy* e all'uscita del denocciolatore campionando la parte fibrosa di scarto. Tali matrici sono state poste in contenitori di plastica e congelate (-18 °C) fino alla realizzazione delle prove ossidative.

La conservazione della matrice a basse temperature prima dell'inizio delle prove, pur introducendo un fattore di disturbo derivante dal congelamento e dal successivo disgelo, risulta tra le più utilizzate per garantire in linea di massima la stabilità della materia organica da testare.

### 7.3 CARATTERIZZAZIONE SUBSTRATI

Le matrici (SUV e SUD) sono state caratterizzate con diverse metodiche al fine di valutare il materiale di partenza e per una migliore comprensione degli effetti che i trattamenti ossidativi basati sul reattivo di Fenton hanno avuto sul potenziale metanigeno (BMP) delle sanse e sulla produzione del metano nell'arco di 55 giorni di test.

Sono stati misurati parametri importanti per la digestione anaerobica quali: Solidi Totali (ST), Solidi Volatili (SV), Ceneri, Umidità Relativa (UR), contenuto d'olio, pH, i principali elementi metallici, il contenuto fenolico e il contenuto in fibre.

## 7.4 pH

Il pH può essere definito come l'inverso del logaritmo in base dieci della concentrazione molare degli ioni idrogeno ( $H^+$ ) e determina l'attività dello ione idrossonio (o idronio) ( $H_3O^+$ ) in una soluzione acquosa. Analiticamente è definito nel seguente modo:

$$pH = -\text{Log} [H^+]$$

La misura del pH generalmente è determinata per via potenziometrica attraverso un pH-metro il cui funzionamento si basa sulla misura di una differenza di potenziale di un elettrodo a vetro correlata a sua volta alla attività dello ione idronio ai due lati della membrana che costituisce il pH-metro.

Tale parametro risulta estremamente importante in un processo di DA, in quanto i batteri metanigeni sono molto sensibili al valore del pH nella soluzione e anche piccole variazioni della concentrazione possono avere effetti notevoli sulla produzione di biogas.

## 7.5 DETERMINAZIONE DEI SOLIDI TOTALI

I solidi totali ST (*Total Solids* - TS) sono le sostanze disciolte e in sospensione in una soluzione acquosa dopo che è stata fatta evaporare completamente l'acqua (Fot. 16). La determinazione dei ST si esegue sottoponendo un campione d'acqua per evaporazione completa in stufa termostata a  $105^\circ\text{C}$  fino a raggiungimento di peso costante (di solito 24 ore).



**Fot. 16.** Campioni di sansa essiccati al forno a  $105^\circ\text{C}$ .

Il contenuto di ST è dato da:

$$ST \text{ (mg/L)} = (M_1 - M_0) \times 1000 / V_{\text{Campione}}$$

dove:

$M_1$  = massa in mg della capsula e del residuo dopo essiccamento;

$M_0$  = massa in mg della capsula vuota;

$V_{\text{Campione}}$  = volume in mL di campione sottoposto ad analisi.

Per esprimere i ST e, più in generale, per determinare il contenuto di sostanza secca di una matrice organica viene utilizzato il seguente metodo:

1. Si pesano le capsule appositamente contrassegnate in modo da renderle distinguibili le une dalle altre registrando il peso della tara
2. Si versa all'interno il campione da analizzare e si registra il peso lordo
3. Si pongono le capsule nella stufa a 105 °C fino a raggiungimento di peso costante (per i nostri scopi sono state sufficienti 24 ore)
4. Si pesano le capsule e si determina il contenuto di solidi totali o, più in generale, il tenore percentuale di acqua del campione (Fot. 17).

$$\text{UR \%} = \left( 100 * \frac{P_{c+t} - P_{105\text{ }^\circ\text{C}}}{P_{c+t} - P_{tara}} \right)$$

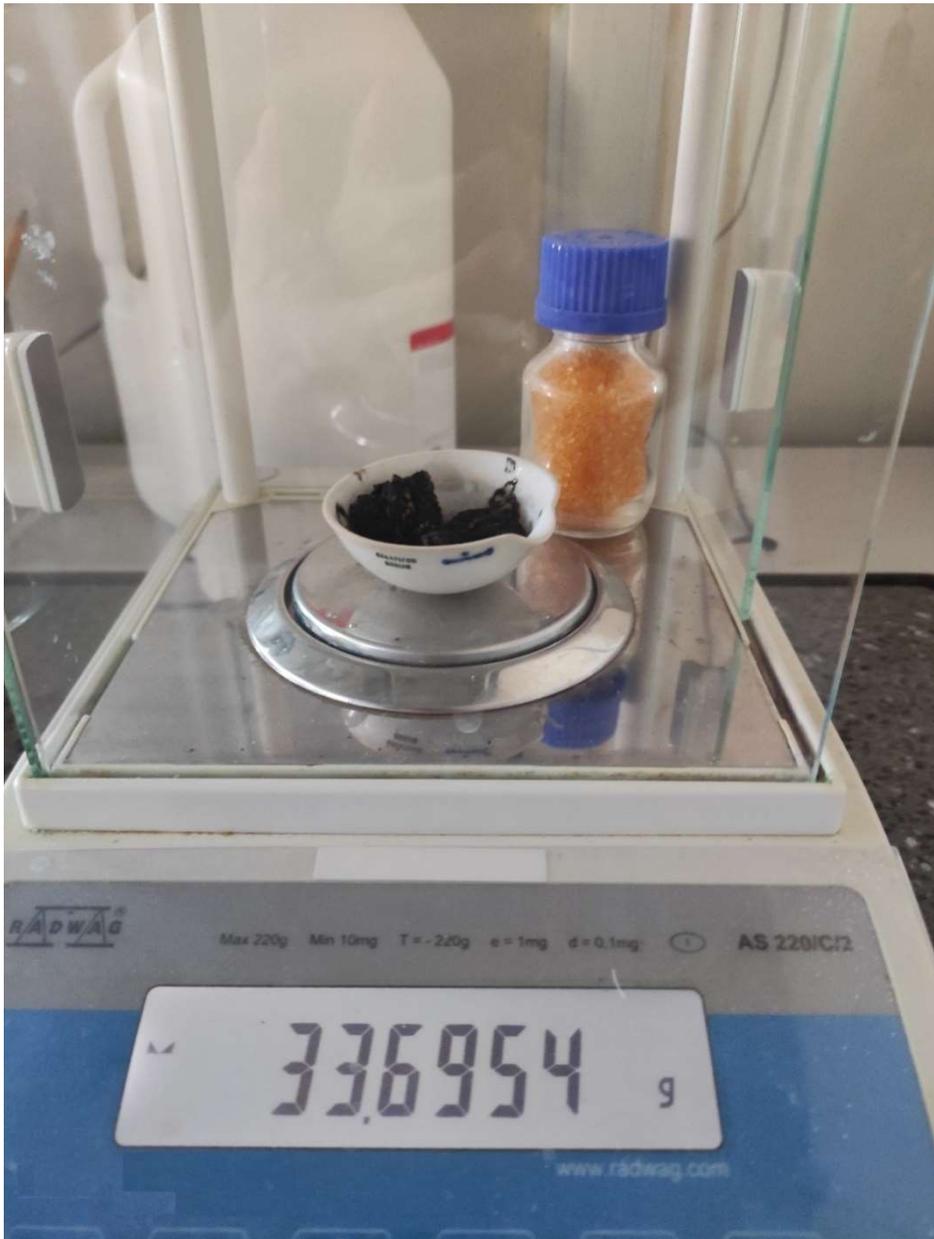
$$\text{ST \%} = \left( 100 * \frac{P_{105\text{ }^\circ\text{C}} - P_{tara}}{P_{c+t} - P_{tara}} \right)$$

Dove:

$P_{c+t}$  è il peso della capsula riempita con il campione fresco [g]

$P_{105\text{ }^\circ\text{C}}$  è il peso del campione con la tara dopo l'essiccazione [g]

$P_{tara}$  è il peso della capsula senza campione [g]



Fot. 17. Operazione di pesatura del campione essiccato

#### 7.6 DETERMINAZIONE DEI SOLIDI VOLATILI

I Solidi Volatili (SV) (*Volatile Solid - VS*), sono la frazione di sostanza secca che risulta volatilizzata per combustione a 550 °C fino a peso costante. Questi rappresentano, in prima approssimazione, la frazione organica della sostanza secca, calcolata come differenza dei valori di TS e le ceneri che rappresentano la frazione inerte, costituita per lo più, da composti inorganici, misurata per pesata dopo il trattamento in muffola a 550 - 600 °C (Fot. 18).

Operativamente si misurano in questo modo

$$SV \% = \left( 100 * \frac{P_{105^{\circ}C} - P_{ceneri}}{P_{c+t} - P_{tara}} \right)$$

Dove:

$P_{c+t}$  è il peso della capsula riempita con il campione fresco [g]

$P_{105\text{ }^{\circ}\text{C}}$  è il peso del campione con la capsula dopo l'essiccazione [g]

$P_{\text{tara}}$  è il peso della capsula senza campione [g]

$P_{\text{cenere}}$  è il peso della capsula con la cenere [g]



**Fot. 18.** Campioni di sansa in muffola prima della mineralizzazione

#### 7.7 DETERMINAZIONE DELLA SOSTANZA GRASSA - METODO RANDALL

La determinazione quantitativa della sostanza grassa (SG) presente nelle matrici oggetto di studio è stata eseguita con il metodo Randall utilizzando un SOXHTRACTION SER 148, ovvero un estrattore per la separazione quantitativa di una sostanza da un miscuglio mediante un solvente organico della VELP Scientifica (Fot. 19).



**Fot. 19.** Soxhtraction apparecchio per l'estrazione dei grassi attraverso il metodo Randall

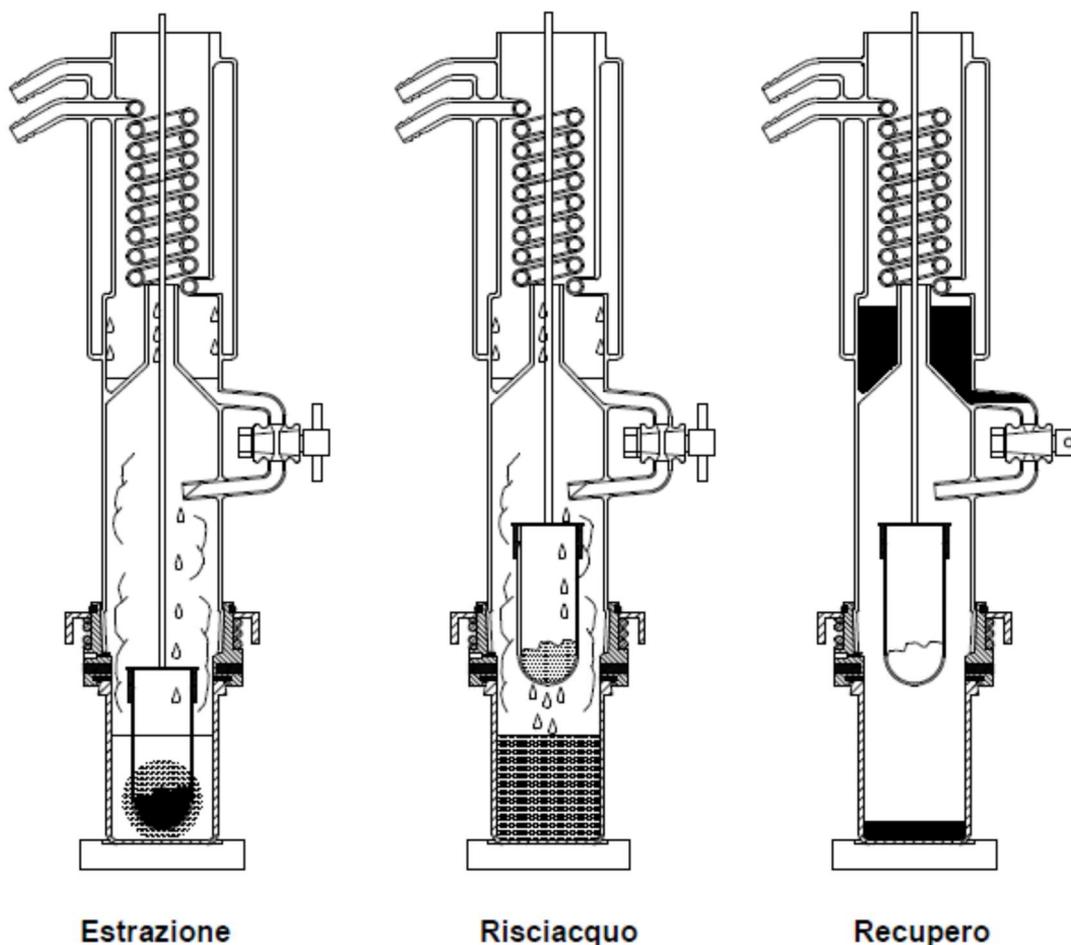
Le matrici dopo essere state essiccate a 105 °C per 24 h e finemente suddivise tramite un mixer della Büchi B-400 (Fot. 20) sono state sottoposte ad estrazione con solventi in accordo con la tecnica Randall. Questa tecnica opera in due fasi più una di recupero, riducendo sensibilmente i tempi di estrazione rispetto alla tecnica di riferimento che impiega un estrattore Soxhlet (Thiex et al., 2003).



**Fot. 20.** Sanse disidratate e pre-omogeneizzate prima di essere inserite nel mixer

Il metodo Randall prevede tre fasi. Nella prima fase un ditale poroso di cellulosa con all'interno il campione pesato viene alloggiato all'interno dell'estrattore dove successivamente viene immerso direttamente nel solvente che viene portato ad ebollizione (estrazione). Nella fase successiva il contenitore col campione viene rimosso dal solvente e lavato a ricadere (risciacquo). Una serpentina con acqua circolante permette di raffreddare i vapori del solvente e farlo ricondensare all'interno del sistema. L'ultima fase permette di recuperare gran parte del solvente utilizzato, già distillato e di misurare il contenuto dell'olio residuale estratto (Fig. 11).

## Sistema Randall



**Fig. 11.** Fasi di estrazione con il sistema Randall

La misura della gravimetrica della sostanza residua indica la percentuale di SG che è presente nella matrice iniziale secca. Per l'estrazione dell'olio residuo presente nelle sanse, nel caso specifico, è stato utilizzato il *n*-esano (p.e. 69 °C) con una temperatura programmata nel bicchiere di 180 °C nel ciclo di lavorazione. Le analisi sono state svolte in triplicato per entrambe le matrici.

$$SG \% = \left( 100 * \frac{P_{sg+b} - P_b}{P_{105\text{ }^\circ\text{C netto}}} \right)$$

$P_{sg+b}$  è il peso del bicchiere di raccolta assieme alla SG recuperata nell'estrazione [g]

$P_{105\text{ }^\circ\text{C netto}}$  è il peso netto del campione dopo l'essiccazione immesso nel ditale senza il contributo della tara [g]

$P_b$  è il peso del bicchiere di raccolta del sistema [g]

### 7.8 CONTENUTO IN FIBRE

Le matrici disoleate e finemente suddivise derivanti dalla la precedente estrazione con il Soxhtraction sono state sottoposte ad estrazione progressiva per determinare il contenuto in fibre.

Il concetto alla base dell'analisi della fibra al detergente è che le matrici vegetali possono essere divise in componenti più o meno facilmente depolimerizzabili dai batteri. I contenuti cellulari, come amidi e zuccheri, di solito più facilmente assimilabili dai microorganismi mentre le componenti fibrose, formate da emicellulosa, cellulosa e lignina, presentano capacità di essere assimilate dai batteri anaerobici via via minori, tanto che le lignine risultano poco o nulla biodegradabili in condizioni di anaerobiosi.

Le parti fibrose possono essere separate utilizzando dei detergenti secondo il metodo elaborato da Van Soest (van Soest et al., 1991). Per la determinazione sequenziale è stato impiegato il FIBRAMATIC della PBI (Fot. 21).



**Fot. 21.** Fibrumatic della pbi

Questo strumento permette di portare in soluzione le varie componenti in modo sequenziale con un'alta riproducibilità del metodo. Operativamente sono stati messi due grammi di sanse disoleate in dei crogioli sinterizzati Gooch a peso noto e le varie frazioni portate in soluzione sequenzialmente determinando:

- il Neutro Deterso Solubile (*Neutral Detergent Soluble* (NDS)). Il solvente descritto nel metodo di Van Soest lascia tutte le componenti poco solubili presenti nella matrice (cellulosa, emicellulosa, lignina, cutina e minerali) e porta in soluzione le componenti cellulari solubili: gli zuccheri e le proteine.
- La Fibra Neutro Detera (*Neutral Detergent Fiber* (NDF)). Nell'estrazione sequenziale vengono solubilizzate le emicellulose. Tale frazione rappresenta la componente della fibra più facilmente attaccabile dai batteri. Da questa estrazione vengono lasciate come parte residuale: la cellulosa, la lignina, la cutina e la parte minerale insolubile.

- La Fibra Acido Detersa (*Acid Detergent Fiber (ADF)*) solubilizza la cellulosa della matrice, che risulta essere una componente della matrice meno fermentescibile per i microorganismi, permettendo di valutare il contenuto di lignina, cutina e di minerali insolubili.

L'incenerimento della componente successiva a 550 °C permette la valutazione del contenuto minerale della parte insolubile all'ADF e, per differenza, permette la determinazione della componente in lignina e cutina delle matrici oggetto di studio.

## 7.9 ANALISI DEGLI ELEMENTI

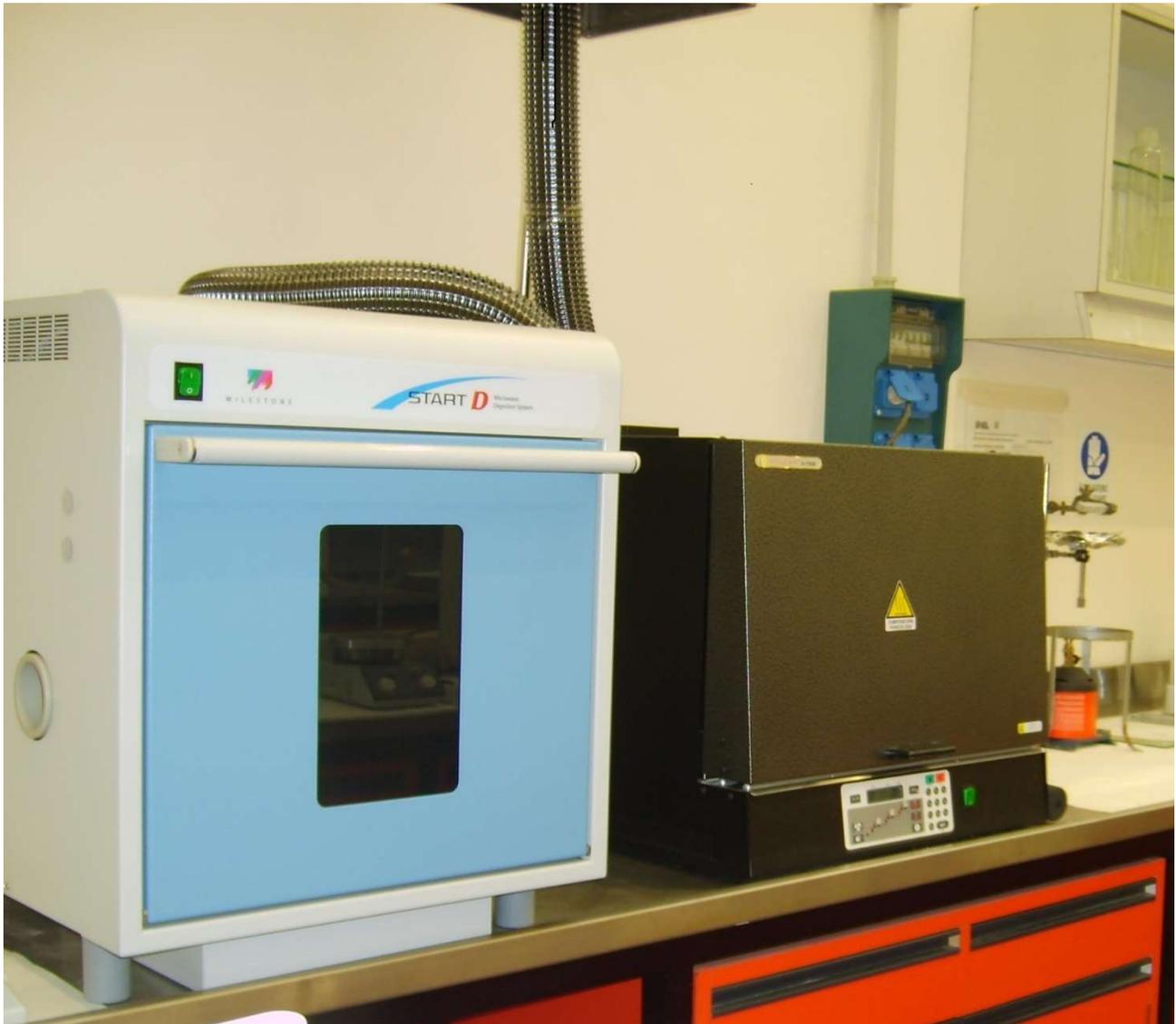
Nel lavoro sperimentale è stata effettuata anche la misurazione dei principali elementi metallici (K, Na, Fe, Mn, Zn, Cu) delle matrici. Si è quindi valutato l'apporto di minerali che le matrici utilizzate forniscono al processo di DA. La determinazione è stata effettuata utilizzando uno spettrometro ad emissione atomica Agilent 4210 MP-AES (*Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy*) (Fot. 22) (Zsigmond et al., 2021).

La mineralizzazione delle sanse, operazione propedeutica all'analisi e volta ad eliminare tutta la parte organica lasciando in soluzione solo la parte minerale attraverso la digestione acida, è stata condotta utilizzando un digestore a microonde START D della Milestone s.r.l. (Fot. 23) e avvalendosi della seguente Nota del Libro delle applicazioni del Rotore ad alta pressione SK-10: HPR-AG-03 *Ground Vegetable*.



**Fot. 22.** Spettrometro ad emissione atomica Agilent 4210 MP-AES

Operativamente per la mineralizzazione sono stati pesati 0,5 grammi di campione finemente suddiviso con un mixer ed essiccato preventivamente a 105 °C per 24 h fino a raggiungimento di peso costante, in un contenitore in PTFE.



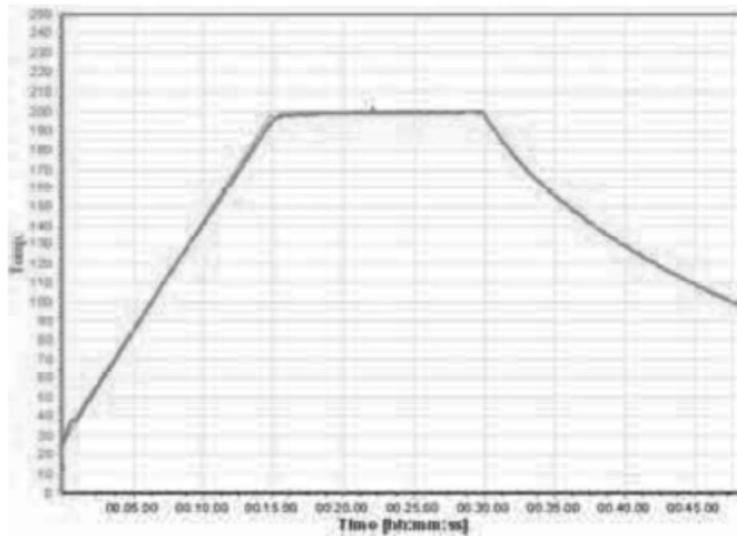
**Fot. 23.** Mineralizzatore a microonde START-D con accanto muffola Vulcan

Nel contenitore alla matrice da analizzare si uniscono 6 mL di acido nitrico per analisi in tracce ( $\text{HNO}_3$  al 65%) e 2 mL di  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% per analisi degli elementi. I contenitori così preparati sono stati sottoposti a digestione acida a microonde seguendo la seguente programmata (Tab. 4 e Fig. 12):

**Tab. 4** - Programmata temperature metodica HPR-AG-03

Step	Time (min)	T1 (°C)	T2 (°C)	Power (W)	Pressure (bar)
1	15:00	200	110	500	45
2	15:00	200	110	500	45

## Temperature profile



**Fig.12.** Profilo della temperatura di mineralizzazione

Il composto mineralizzato, una volta raffreddato, viene portato a volume con un matraccio tarato di 50 mL utilizzando acqua ultrapura (UP) acidulata al 2% con  $\text{HNO}_3$  al 65% puro per analisi in tracce. L'acqua UP (18.3 M $\Omega$ ) è stata prodotta dal sistema di purificazione dell'acqua Zeneer Power II, Human Corporation. Da questa soluzione di base sono effettuate diluizioni per l'analisi degli elementi presenti in maggior concentrazione (ad es. Fe e K).

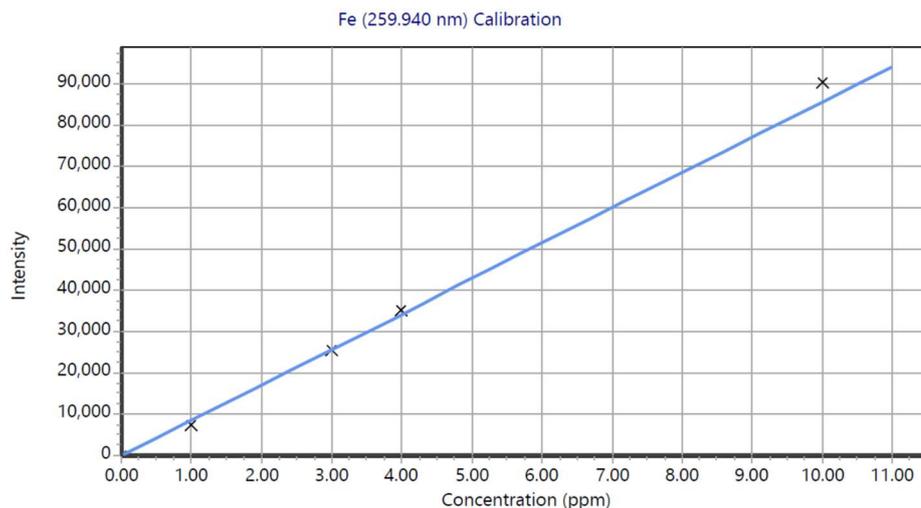
L'MP-AES, si caratterizza per utilizzare come fonte di atomizzazione ed eccitazione degli elementi un plasma generato dall'azoto molecolare ( $\text{N}_2$ ). La determinazione della concentrazione dell'elemento in soluzione viene effettuata dallo spettrometro per confronto dell'intensità del segnale alla lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) prescelta con i segnali ottenuti da una retta di taratura dello stesso elemento nelle medesime condizioni partendo da diluizioni di uno standard a concentrazione nota (Fig. 13). In Tab. 5 e Tab. 6 sono riportate le condizioni di uso dello spettrometro.

**Tab.5** - MP-AES Condizioni dello spettrometro comuni a tutte le analisi

Current software	Version 1.6.0.9255
Read time	3 s
Background correction	AUTO
Blank subtraction	On
Replicates	3
Calibration Fit	Linear Weighted
Sample introduction	Agilent SPS 4
Pump speed	15 rpm
Sample uptake time	60 s
Rinse Time	30 s
Stabilization time	15 s
Torch	Easy – fit torch for 4200
Nebulizer	MP-AES OneNeb
Spray chamber	Isomist MP-AES s/chamber
Sample uptake fast pump	On
Rinse time fast pump	On

**Tab. 6** - MP-AES Condizioni specifiche dello strumento per ciascun elemento

ELEMENT	$\lambda$ (Wavelength nm)	Nebulizer Flow (L/min)
K	766.491	0.75
Na	588.995	0.95
Fe	259.940	0.45
Mn	403.076	0.9
Zn	213.857	0.45
Cu	324.754	0.7



**Fig.13.** Retta di calibrazione per l'elemento Ferro con MP-AES

#### 7.10 ANALISI DEI FENOLI TOTALI

I fenoli totali delle SUV e delle SUD sono stati misurati attraverso una misura spettrofotometrica utilizzando il reattivo di Folin-Ciocalteu su estratti etanoliche delle sanse, a cui è stata aggiunta una soluzione al 20% di carbonato di sodio, confrontando le assorbanze misurate a 770 nm con una retta di taratura costruita attraverso sei concentrazioni note di acido gallico (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 e 1 g/L), nelle stesse condizioni operative (retta di regressione:  $Y=1.1933X$ ;  $R^2=0.99833$ ) (Singleton and Rossi, 1965).

La metodica si basa sulla reazione di due complessi acidi fosfomolibdeno/fosfotungsteno che costituiscono il reagente di Folin-Ciocalteu. I composti fenolici vengono ossidati dai metalli molibdeno e tungsteno presenti nei complessi in ambiente basico, la riduzione dei metalli fa assumere alla soluzione una colorazione blu. I valori finali della determinazione sono stati espressi in mg di acido gallico per kg di sostanza (Siano et al., 2022).

#### 7.11 POTENZIALE METANIGENO (BMP)

Il potenziale metanigeno statico (definito anche in batch o discontinuo) (*Biochemical Methane Potential – BMP*) delle matrici sotto esame è stato valutato attraverso l'uso del AMPTS II (*Automatic Methane Potential Test System*) della Bioprocess Control Sweden AB (Badshah et al., 2012).

Lo strumento, che permette di simulare in condizioni controllate quanto avviene in un digestore anaerobico, è un analizzatore multicanale costituito da 15 reattori paralleli (*test vessel*) dotato dello stesso numero di misuratori del flusso di gas (*flow cells*) collegati al sistema di acquisizione dei dati che consente la misura di ogni singolo reattore. Uno dei vantaggi del sistema è dato dalla compensazione, in tempo reale, della temperatura e della pressione e ciò permette la presentazione dei dati in forma standardizzata. La temperatura e pressione del gas sono misurate ogni volta che le celle si aprono, consentendo di ricavare l'esatta informazione cinetica compensata, nel tempo e per ogni variazione dei parametri misurati; anche il vapore contenuto nel biogas viene automaticamente detratto. I volumi normalizzati sono presentati in condizioni asciutte e alla temperatura di zero gradi Celsius e a 1 atm (Fot. 24).

Operativamente l'AMPTS II è schematizzabile in 3 parti (Fot. 25): la prima parte è costituita da 15 contenitori di vetro da 500 mL che fungono da reattori ciascuno sormontato da un sistema per tenere il campione in agitazione costituito da un motore elettrico che muove una bacchetta di metallo posta all'interno di un involucro in gomma. I mixer sono stati impostati in entrambe le prove per essere in funzione 50 secondi ed in pausa 40 secondi con una regolazione della velocità pari all'ottanta per cento. Tutti i reattori sono a loro volta

immersi in un bagno termostatico da 18 Litri. Per gli esperimenti condotti, la temperatura di processo è stata di 37 °C (condizioni mesofile di crescita batterica) per tutta la durata della prova. La biomassa di lavoro, per le prove sperimentali, è stata impostata a 400 grammi mentre il rapporto inoculo/substrato, secondo la letteratura (Esposito et al., 2012), è stato scelto in funzione dei SV e, nel caso delle SUV, è stato di 0,4 mentre per le SUD è stato di 0,5 (massa inoculo (g)/massa substrato (g)). Questo ha permesso di lasciare una concentrazione di fenoli nei reattori di prova delle sasse non trattate in un intervallo di concentrazione compreso tra 0,77 e 1,2 g/L.

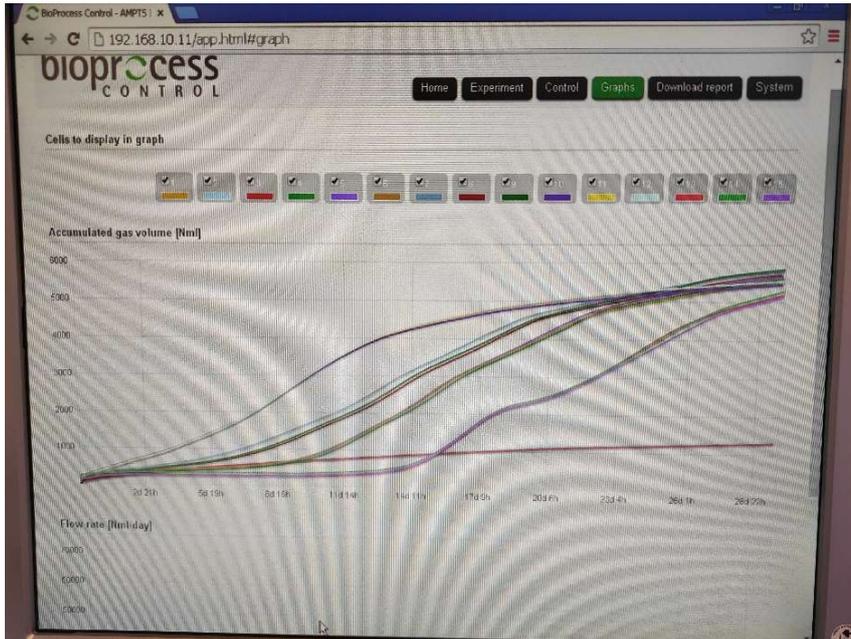
Tra i reattori e lo strumento di misurazione del volume del gas prodotto (biogas o biometano) possono essere inserite delle unità di assorbimento costituite da contenitori di vetro da 100 mL. Tale apparato rappresenta la seconda parte dello strumento ed ha la caratteristica di essere opzionale, in quanto può non far parte della configurazione dello strumento qualora si voglia misurare il volume di biogas prodotto piuttosto che il biometano. Le unità di assorbimento vengono riempite con 80 mL di una soluzione alcalina 3 M di NaOH ed un indicatore di viraggio, la Timolftaleina. Tali unità hanno quindi la funzione di bloccare le frazioni acide del biogas (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>S) e di trattenerle in soluzione permettendo solo al biometano di raggiungere lo strumento di misurazione volumetrica del gas. La Timolftaleina, che conferisce alla soluzione un caratteristico colore blu alla soluzione, serve a controllare che la soluzione assorbente sia capace di ritenere i gas acidi presenti nel biogas. In caso di viraggio, infatti, la soluzione diventa incolore e deve essere sostituita.

La terza parte è costituita dal dispositivo di misura del volume del gas. Questo dispositivo di misurazione funziona secondo il principio di spostamento e galleggiabilità del liquido (*liquid displacement & buoyancy*) e può monitorare flussi di gas ultra bassi; un impulso digitale viene generato quando un determinato volume di gas scorre attraverso il dispositivo. Un sistema integrato di acquisizione dati viene utilizzato per registrare, visualizzare e analizzare i risultati.

Nell'esecuzione delle prove tre reattori vengono dedicati alla valutazione del potenziale metanigeno residuo dell'inoculo, una volta valutato, questo viene sottratto e calcolato il biometano prodotto secondo la seguente formula:

$$CH_4 \text{ net} = CH_4 \text{ test vessel} - CH_4 \text{ Bianco} \frac{gSV_{\text{inoculo nel test vessel}}}{gSV_{\text{inoculo nel blank vesse}}}$$

Ovvero al metano prodotto viene sottratta un'aliquota di gas stimata sulla base della produzione media dei reattori contenenti solo l'inoculo e del rapporto tra i solidi volatili contenuti nel reattore di prova che contiene la matrice di cui vogliamo indagare il BMP e quello contenuto del bianco (*blank vessel*), che contiene solo l'inoculo.



Fot. 24. Visualizzazione a schermo dei *raw data* del software acquisizione del AMPTS II



Fot. 25. AMPTS II apparato sperimentale utilizzato per la misura del BMP.

## 7.12 ZOLFO TOTALE

Lo zolfo totale è stato misurato disciolto nelle unità di assorbimento del AMPTS II (Fot. 26) utilizzando uno spettrometro ad emissione ottica ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer*) della Varian 720-ES Series. Le soluzioni acquose, prima di essere analizzate, sono state acidificate con acido nitrico concentrato (65%) in modo da ottenere soluzioni un tenore di  $\text{HNO}_3$  al 2% (v/v). Poi sono state analizzate costruendo una curva di calibrazione 0,1 a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  partendo da una soluzione a concentrazione di  $1 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e misurando l'emissione dello zolfo alla lunghezza d'onda di 182 nm.



**Fot. 26.** Unità di assorbimento dei gas acidi dell'AMPTS II

### 7.13 ANALISI DEL BIOGAS AL GASCROMATOGRAFO

Occasionalmente sono stati effettuati dei controlli sulla linea di campionamento dell'AMPTS II per avere la conferma analitica che i gas misurati ( $\text{CH}_4$  e  $\text{H}_2$ ) dal contatore volumetrico fossero puri. Tali controlli sono stati effettuati attraverso un gascromatografo Focus GC della Thermo-Fisher USA dotato di un rivelatore TCD (*thermal conductivity detector*) a conducibilità termica e una colonna impaccata in acciaio inossidabile di 3 metri Hayesep Q (800/100 mesh). L'azoto è stato utilizzato come gas di trasporto ( $\text{N}_2$  *carrier gas*) ad una portata di  $35 \text{ ml min}^{-1}$ . La temperatura della colonna e dell'iniettore nelle condizioni di analisi sono state rispettivamente di  $120^\circ\text{C}$  per la colonna e di  $200^\circ\text{C}$  per il TCD. Il campionamento è avvenuto utilizzando una gas-tight syringe della Hamilton® da  $100 \mu\text{L}$ .

## 8 SET UP SPERIMENTALE

In questo capitolo verranno illustrati i trattamenti a cui sono state sottoposte le matrici SUV e SUD, il set up sperimentale seguito con cui sono state comparate le matrici trattate e non trattate per le prove di BMP e di BHP.

I pretrattamenti ossidativi proposti sono volti a superare gli ostacoli che frenano la valorizzazione energetica delle biomasse residuali attraverso la DA e la DF. In particolare, con il reattivo di Fenton si mira ad abbattere il contenuto di sostanze recalcitranti alla demolizione batterica superando l'effetto batteriostatico dei fenoli ed aprendo alla possibilità, nell'ottica dello sviluppo sostenibile e dell'economia circolare, di arrivare a dare un valore a tutta la materia organica legata alla filiera produttiva dell'olio d'oliva. Il trattamento, oltre a facilitare la produzione di biometano, bioidrogeno e digestato, (quest'ultimo utile al mantenimento della fertilità dei suoli) ha l'effetto di ridurre il tenore di idrogeno solforato nel biogas. Tale acido, che in basse concentrazioni ha il caratteristico odore di uova marce, è componente critico indesiderato presente nella produzione di energia da DA perché, oltre ad essere una sostanza tossica, contribuisce alla corrosione delle tubazioni in metallo e delle componenti dei motori stazionari utilizzati la produzione combinata di energia e calore; inoltre provoca la generazione di composti acidi nei fumi di combustione. Riducendo il tenore di H<sub>2</sub>S nel biogas, oltre a migliorare la qualità del biogas stesso, se ne favorisce l'*upgrading* rendendo più agevole la possibilità del biometano di essere utilizzato come fonte rinnovabile per l'autotrazione o per l'immissione come gas di rete.

La valutazione dell'effetto che i trattamenti ossidativi hanno sul BMP delle sansa è stata realizzata seguendo lo sviluppo del metano per 55 giorni, un tempo adatto per vedere pressoché esaurirsi l'intera fonte di carbonio per i microrganismi. Per il test BHP che ha coinvolto solo le SUD è stato sufficiente seguire la produzione di bioidrogeno per 11 giorni in quanto si è osservato essere un periodo di tempo idoneo per monitorare le cinetiche di produzione dell'idrogeno delle comunità batteriche coinvolte nel processo di DF.

### 8.1 TRATTAMENTI OSSIDATIVI

Per rendere più uniforme il contatto tra matrici e reagenti, i reattivi sono stati addizionati in soluzione. Le sansa di controllo sono state addizionate solo con l'acqua distillata per creare condizioni omogenee di confronto. Nelle soluzioni ossidative, il reattivo di Fenton con la concentrazione di perossido di idrogeno stabilita, è stato preparato immediatamente prima dell'incorporazione (forte reazione esotermica). Inoltre è stata preparata soluzione con in sospensione/soluzione il cloruro ferroso tetraidrato sia per incorporarlo meglio alla matrice sia come prova per valutare l'influenza che tale reattivo potesse avere da solo sul BMP della sansa (Girardi et al., 2022). (Fig. 27).



**Fot. 27.** SUV trattate e non trattate. Dopo i trattamenti ossidativi, si può notare la decolorazione delle sansa trattate con tenori di perossido d'idrogeno maggiori.

Al fine di proporre un pretrattamento realistico, facilmente implementabile su scala reale, è stato scelto di utilizzare una quantità di cloruro ferroso tetraidrato fissa normalmente impiegata nei digestori anaerobici per ridurre il tenore di idrogeno solforato nel biogas. La quantità di  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  scelta è stata di 13,5 g in grado di apportare 4,2 g di Fe per kg di sansa fresca.

Il primo set sperimentale ha visto 900 g di SUV addizionati con una soluzione di 230 mL contenente rispettivamente:

- SUV + 230 mL di acqua distillata (prova in bianco)
- SUV + 230 mL di acqua distillata + 13,5 g di  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- SUV + 230 mL di soluzione di 4,4 M di  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 13,5 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- SUV + 230 mL di soluzione di 8,9 M di  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 13,5 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Le prove di biometanazione con le SUV sono state condotte in triplicato.

Sulla scorta dei risultati ottenuti nel primo set sperimentale sulle SUV in considerazione delle differenze tra le due matrici (principalmente nel contenuto fenolico e nel diverso tenore di fibre) per le matrici denocciolate si è optato per ampliare la gamma dei trattamenti ossidativi effettuando alcune prove in duplicato e lasciando in triplicato le tesi a concentrazioni più basse (Girardi et al., 2022).

Il secondo set sperimentale ha visto la SUD 900 g di sansa addizionati con una soluzione di 230 mL contenente rispettivamente:

- SUD + 230 mL di acqua distillata (prova in bianco)
- SUD + 230 mL di acqua distillata + 13,5 g di  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- SUD + 230 mL di soluzione di 1,8 M di  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 13,5 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- SUD + 230 mL di soluzione di 3,5 M di  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 13,5 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- SUD + 230 mL di soluzione di 7,1 M di  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 13,5 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

I parametri dei test sono riassunti in Tab. 7.

**Tab. 7 - Parametri delle prove sperimentali**

Matrici	Repliche nelle prove di BMP	Umidità (Contenuto d'acqua) % + DS	Solidi Totali (ST) % + DS	Solidi Volatili (SV) % + DS	SV/TS % + DS	Quantità di sostanza in 500 mL reattore (g)		SV in 500 mL reattore (g)		SV inoculo /SV matrice	pH contenitore alla fine della prova	Contenuto netto di Zolfo (mg/L) *
						Inoculo	Sansa	Inoculo	Sansa			
<b>Inoculo SUV</b>	3	92,95 ± 0,02	7,05 ± 0,02	4,53 ± 0,03	64,26 ± 0,56	400,05	-	18,12	-	-	8,00	23,6 <sup>++</sup>
<b>SUV</b>	3	66,56 ± 0,32	33,44 ± 0,32	32,06 ± 0,33	95,87 ± 1,92	295,58	104,40	13,39	33,47	0,400	7,83	22,9
<b>SUV + FeCl<sub>2</sub></b>	3	68,12 ± 0,66	31,88 ± 0,66	30,02 ± 0,83	94,16 ± 4,55	290,44	109,53	13,16	32,88	0,400	7,73	2,8
<b>SUV + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4,4 M</b>	3	65,43 ± 0,57	34,57 ± 0,57	32,71 ± 0,61	94,63 ± 3,34	297,14	102,90	13,46	33,66	0,400	7,68	-11,5
<b>SUV + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 8,9 M</b>	3	67,53 ± 0,18	32,47 ± 0,18	30,58 ± 0,23	94,18 ± 1,22	291,91	108,31	13,22	33,12	0,399	7,75	-4,0
<b>Inoculo SUD</b>	3	93,13 ± 0,06	6,87 ± 0,06	4,44 ± 0,12	64,62 ± 2,30	400,02	-	17,76	-	-	7,93	31,4 <sup>++</sup>
<b>SUD</b>	3	75,15 ± 0,21	24,85 ± 0,21	23,28 ± 0,21	93,66 ± 1,63	289,56	110,51	12,86	25,73	0,500	7,66	9,2
<b>SUD + FeCl<sub>2</sub></b>	2	73,07 ± 0,28	26,93 ± 0,28	25,19 ± 0,31	93,53 ± 2,11	295,72	104,59	13,13	26,34	0,498	7,62	-21,5
<b>SUD + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,8 M</b>	3	75,81 ± 0,18	24,19 ± 0,18	22,57 ± 0,18	93,29 ± 1,45	287,07	113,50	12,75	25,62	0,498	7,53	-21,6
<b>SUD + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3,5 M</b>	2	75,91 ± 0,28	24,09 ± 0,28	22,36 ± 0,34	92,84 ± 2,50	292,26	109,08	12,98	25,48	0,509	7,56	-19,8
<b>SUD + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7,1 M</b>	2	74,44 ± 0,28	25,56 ± 0,28	23,66 ± 0,32	92,57 ± 2,25	290,86	112,46	12,91	26,61	0,486	7,48	-18,7

\*Contenuto netto di zolfo, eliminato il contributo proveniente dall'inoculo, presente nelle unità di assorbimento alla fine delle prove

\*\*Concentrazione dello zolfo proveniente dall'inoculo

## 8.2 TEST DI BMP DELLE SUV AD ALTA DILUIZIONE

La prova di BMP ad alta diluizione sulle SUV è stata condotta secondo le modalità riportate in Tab. 8. È stato posto il rapporto tra la massa di SV dell'inoculo rispetto alla massa di SV della matrice pari a circa 2 (nel test precedente era 0,4). Il fine della prova è stato quello d'indagare l'effetto del diverso rapporto inoculo/sansa sia sulla cinetica di formazione sia sul quantitativo massimo di biometano producibile.

**Tab. 8** - Parametri del test di BMP ad alta diluizione delle SUV

Matrice	Repliche nelle prove di BMP	Umidità (Contenuto d'acqua) % + DS	Solidi Totali (ST) % + DS	Solidi Volatili (SV) % + DS	SV/TS % + DS	Quantità di SV in 500 mL di reattore (g)				SV inoculo /SV matrice
						Inoculo	Sansa	Inoculo	Sansa	
<b>Inoculo SUV</b>	3	92,34 ± 0,04	7,66 ± 0,04	5,23 ± 0,06	68,31 ± 1,15	400,02	-	20,92	-	-
<b>SUV</b>	3	66,87 ± 0,45	33,13 ± 0,45	31,78 ± 0,45	95,94 ± 2,66	367,74	32,77	19,23	10,42	1,847
<b>SUV + FeCl<sub>2</sub></b>	3	68,55 ± 0,56	31,45 ± 0,56	29,77 ± 0,58	94,66 ± 3,52	367,75	32,45	19,23	9,66	1,991
<b>SUV + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4,4 M</b>	3	67,40 ± 0,69	32,60 ± 0,69	30,92 ± 0,66	94,85 ± 4,04	367,75	32,44	19,23	10,03	1,917
<b>SUV + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 8,9 M</b>	3	66,70 ± 0,38	33,30 ± 0,38	31,57 ± 0,23	94,83 ± 1,77	367,73	32,65	19,23	10,31	1,866

## 8.3 TEST DI BHP DELLE SUD

Le SUD sono state oggetto di una prova per valutare l'effetto che i pretrattamenti hanno sul BHP nella DF. Il test è stato eseguito utilizzando l'AMPTS II secondo il protocollo standardizzato per la determinazione del biodrogeno potenziale proposto in letteratura (Carrillo-Reyes et al., 2019). I parametri del test di BHP sono riassunti in Tab. 9.

**Tab. 9** - Parametri test BHP

Matrice	Repliche nelle prove di BHP	Umidità (Contenuto d'acqua) % + DS	Solidi Totali (ST) % + DS	Solidi Volatili (SV) % + DS	SV/TS % + DS	pH a fine prova	SV in 500 mL di reattore (g)			SV SUD /SV inoculo
							Inoculo	Sansa		
<b>Inoculo SUD</b>	3	95,36 ± 0,02	4,64 ± 0,02	3,30 ± 0,03	71,15 ± 0,98	7,11	0,9	-	-	
<b>SUD</b>	3	70,01 ± 0,60	29,99 ± 0,60	28,45 ± 0,45	94,85 ± 3,66	6,70	0,9	2,43	2,7	
<b>SUD + FeCl<sub>2</sub></b>	2	72,58 ± 0,54	27,42 ± 0,54	25,66 ± 0,50	93,58 ± 3,67	6,72	0,9	2,43	2,7	
<b>SUD + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,8 M</b>	3	74,26 ± 0,66	25,74 ± 0,66	24,07 ± 0,66	93,52 ± 4,97	6,61	0,9	2,43	2,7	
<b>SUD + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3,5 M</b>	2	73,89 ± 0,37	26,11 ± 0,37	24,33 ± 0,39	93,16 ± 2,80	6,72	0,9	2,43	2,7	
<b>SUD + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7,1 M</b>	2	70,76 ± 0,32	29,24 ± 0,32	27,28 ± 0,43	93,30 ± 2,51	6,75	0,9	2,43	2,7	

## 9 RISULTATI

La caratterizzazione chimica delle sanse ha evidenziato una concentrazione degli elementi in linea con i dati riportati in letteratura (Albuquerque et al., 2004). Le matrici oggetto di ricerca si sono differenziate per il tenore d'acqua e per il contenuto fenolico, più elevato in entrambi i casi nelle SUD.

Le matrici investigate presentano delle differenze significative anche nel contenuto in fibre, nello specifico le SUD sono più ricche in zuccheri e proteine (le sostanze facilmente degradabili dai microorganismi anaerobici) mentre le SUV sono maggiormente ricche in lignina a causa del maggior apporto di frammenti di nocciolino (Tab. 10).

**Tab. 10** - Principali caratteristiche delle SUV e delle SUD

<b>Parametri (Valore medio <math>\pm</math> DS)</b>	<b>SUV</b>	<b>SUD</b>
<b>Contenuto d'acqua (%)</b>		
Perdita in peso a 105°C	66,56 $\pm$ 0,32	75,15 $\pm$ 0,21
<b>Contenuto in olio (%)</b>		
Olio residuale (sul secco)	8,26 $\pm$ 0,34	10,46 $\pm$ 0,13
Olio residuale (sul fresco)	2,70 $\pm$ 0,15	2,60 $\pm$ 0,05
<b>Contenuto in fibre (peso secco) (%)</b>		
Zuccheri e proteine	18,88 $\pm$ 0,45	27,96 $\pm$ 0,87
Emicellulose	18,86 $\pm$ 0,19	13,68 $\pm$ 0,84
Cellulose	16,69 $\pm$ 0,45	13,56 $\pm$ 0,85
Lignina + cutina	37,30 $\pm$ 0,75	34,31 $\pm$ 2,56
Ceneri acido insolubili	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,002
<b>Condizioni acido/alcaline (unità di pH)</b>		
pH	4,72 $\pm$ 0,03	4,92 $\pm$ 0,02
<b>Contenuto in fenoli (mg kg<sup>-1</sup>)</b>		
Fenoli totali	2967 $\pm$ 82	4361 $\pm$ 95
<b>Composizione elementare (peso secco) (mg kg<sup>-1</sup>)</b>		
K	25320 $\pm$ 150	20260 $\pm$ 50
Na	560 $\pm$ 5	570 $\pm$ 6
Fe	239 $\pm$ 4,5	233 $\pm$ 7,2
Mn	1,0 $\pm$ 0,02	1,0 $\pm$ 0,05
Zn	13,8 $\pm$ 0,47	11,3 $\pm$ 0,45
Cu	3,3 $\pm$ 0,08	6,5 $\pm$ 0,04

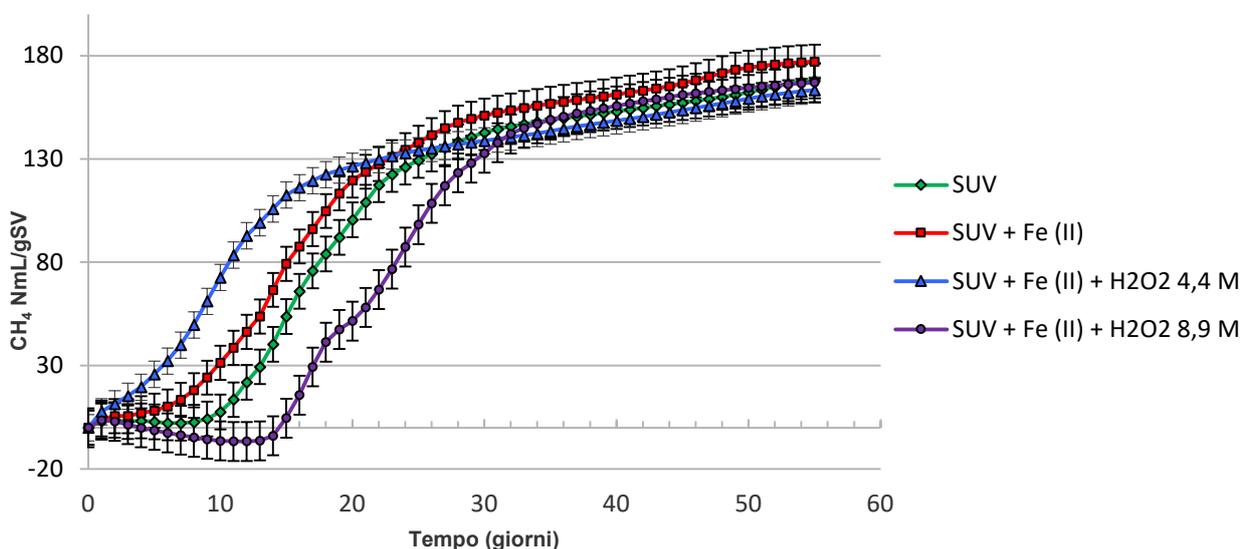
Questa differenza nel contenuto in fibre si riflette anche nelle prove di biometanazione; le SUD, se comparate alle SUV, presentano alla fine degli esperimenti una produzione di CH<sub>4</sub> superiore del 35%. Pur essendo presente nelle SUD un contenuto fenolico superiore, la quota di materia organica disponibile per la metanogenesi è maggiore rispetto alle SUV. Inoltre l'effetto inibitore della componente fenolica si esplica principalmente nelle fasi iniziali della biometanazione mentre, dai test condotti, risulta poco influente sulla produzione cumulata finale. Probabilmente anche le lignine hanno un effetto inibente sulla metanogenesi come evidenziato in letteratura (Messineo et al., 2020) mentre non viene rilevato alcun aumento della quota di materia organica disponibile per i microrganismi alla DA a seguito dell'interazione delle lignine con i radicali ossidrilici nemmeno nelle condizioni ossidative più estreme (Pellera and Gidarakos, 2018).

## 9.1 PROVE DI BIOMETANAZIONE

Come riportato in precedenza (capitolo 8), le prove di biometanazione sono state seguite per 55 giorni; i valori negativi riportati nei grafici, quando presenti, indicano che la produzione di biogas nel campione è inferiore a quella prodotta dal test in bianco dove è presente unicamente l'inoculo.

## 9.2 RISULTATI DELLE PROVE DI BIOMETANAZIONE DELLE SUV

Nell'esperimento con le SUV il trattamento ossidativo con la concentrazione di perossido di idrogeno 4,4 molare ( $H_2O_2$  4,4 M) ha eliminato l'effetto batteriostatico dei fenoli (Fig.14). Inoltre la metanogenesi, in tali condizioni (il trattamento ossidativo utilizzato è il più blando applicato alle sanse a due fasi intere) parte nei primi giorni e presenta un massimo di produzione intorno ai giorni ottavo e nono del test ( $>11$  NmL/gSV) (Fig. 15).

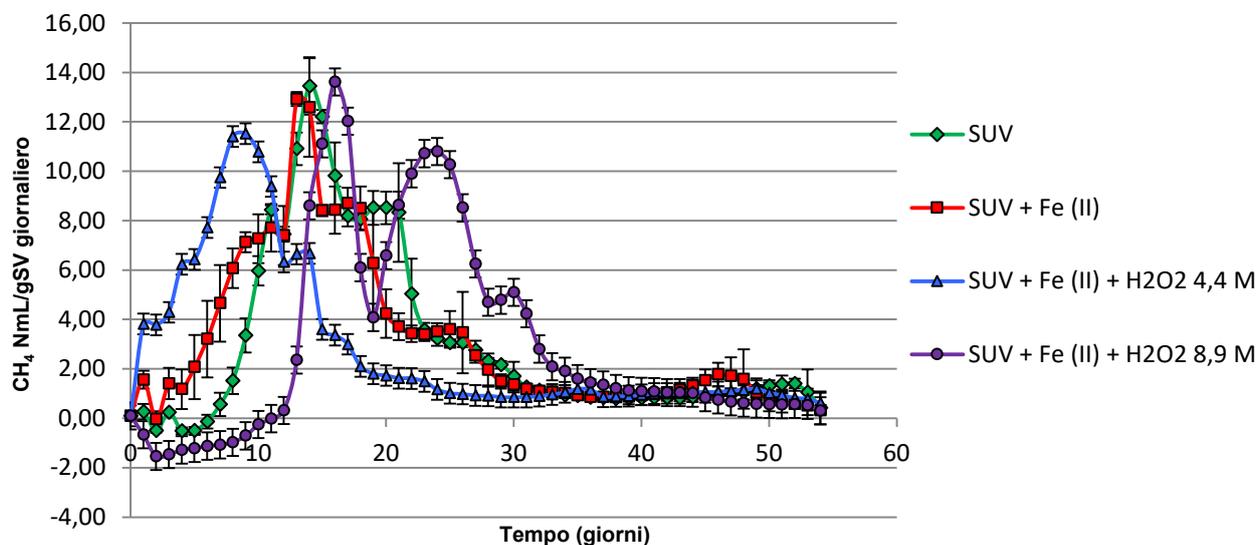


**Fig. 14.** Produzione cumulata di  $CH_4$  delle SUV. L'ampiezza delle barre di errore è relativa a 2 deviazioni standard (DS).

La sansa non trattata presenta un periodo di latenza nella produzione di metano di circa 7 giorni. L'inizio della biometanazione per la SUV comincia intorno all'ottavo giorno e presenta un picco pari a 13,46 NmL/gSV di produzione giornaliera di biometano intorno al 14° giorno. La SUV trattata solo con ferro nei primi 20 giorni di test presenta un trend di produzione di  $CH_4$  intermedio rispetto alla sansa trattata con  $H_2O_2$  4,4 M e la sansa non trattata.

La SUV sottoposta al trattamento ossidativo più intenso ( $H_2O_2$  8,9 M) ha iniziato la produzione di metano il 15° giorno con tre picchi produttivi rispettivamente, il 16° giorno (13,62 NmL/gSV), il 24° giorno (10,80 NmL/gSV) e il 30° giorno (5 NmL/gSV).

Alla fine dell'esperimento il biometano prodotto per tutti i campioni trattati varia tra 163 e 167 NmL/gSV eccezion fatta per la sansa trattata unicamente con il ferro che ha prodotto una quantità di metano leggermente superiore attestandosi intorno a 177 NmL/gSV.

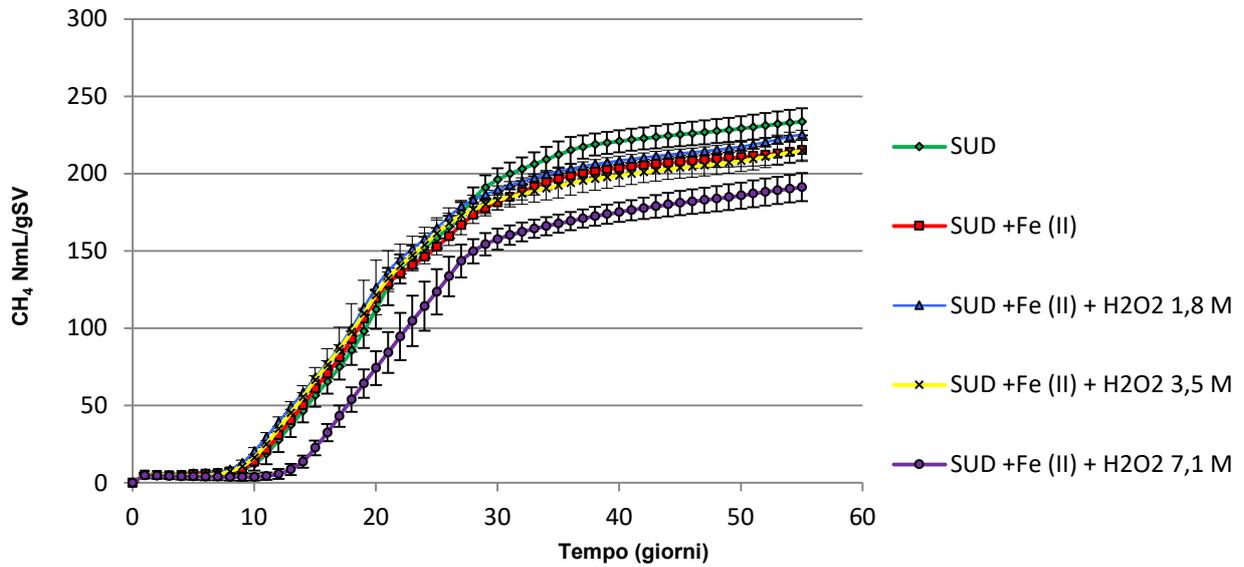


**Fig.15.** Produzione giornaliera di CH<sub>4</sub> delle SUV. L'ampiezza delle barre di errore è pari a 2 DS.

### 9.3 RISULTATI DELLE PROVE DI BIOMETANAZIONE DELLE SUD

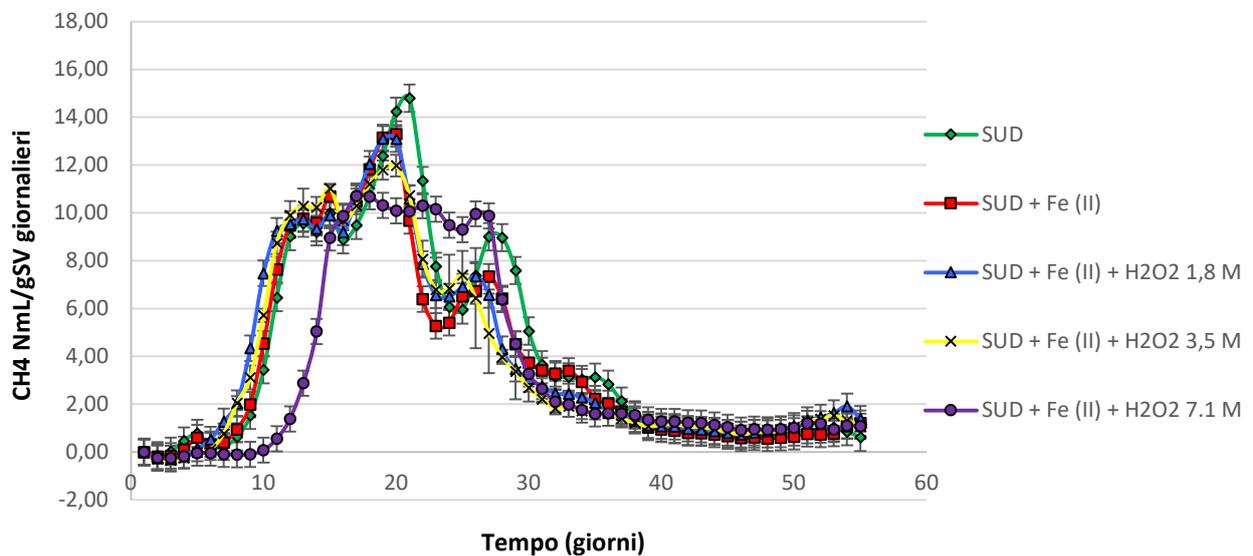
Nell'esperimento con le SUD la produzione di biometano resta comparabile per tutta la durata della prova (Fig. 16) con un massimo di produzione per tutti i trattamenti intorno al 20° giorno e un secondo picco di produzione compreso tra il 25° e il 28° giorno (Fig. 17). Solo la SUD sottoposta al trattamento ossidativo più intenso (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7,1 M), comparata alle altre prove, ha avuto un ritardo del processo di biometanazione di 3 – 4 giorni con l'inizio della metanogenesi al 10° giorno ed una produzione di metano giornaliera differente, con tre picchi di produzione di poco superiori a 10 NmL/gSV durante il 18°, il 22° e il 27° giorno di test; inferiori e diversamente distribuiti nel tempo rispetto al picco di 13 – 14 NmL/gSV raggiunto dalle altre prove intorno al 20° giorno.

Alla fine dell'esperimento la miglior produzione di CH<sub>4</sub> è stata raggiunta dal SUV non trattata con 233 NmL/gSV, poco inferiore è stata la produzione della SUD trattata con il processo ossidativo più leggero (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,8 M) con un valore finale corrispondente a 225 NmL/gSV.



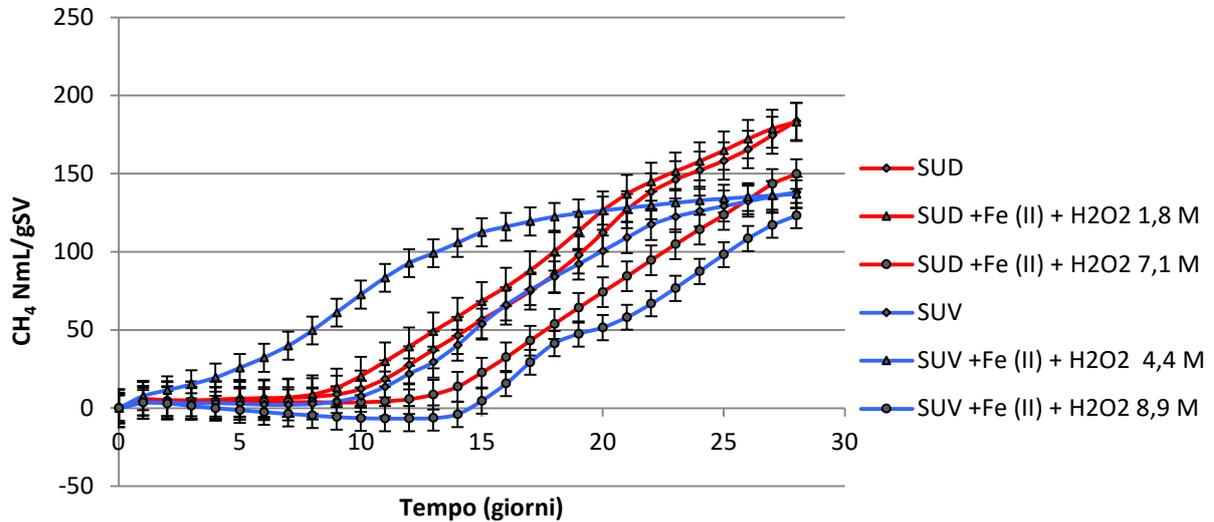
**Fig. 16.** Produzione cumulata di CH<sub>4</sub> delle SUD. L'ampiezza delle barre di errore è pari a 2 DS.

Le SUD trattate con solo Fe (II) e con il trattamento ossidativo medio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3,5 M) hanno prodotto entrambe alla fine del test 215 NmL/gSV. Solo la SUD trattata con il trattamento più ossidante ha mostrato la più bassa produzione di biometano 191 NmL/gSV.



**Fig.17.** Produzione giornaliera di CH<sub>4</sub> delle SUD. L'ampiezza delle barre di errore è pari a 2 DS.

#### 9.4 CONFRONTO DEGLI ESPERIMENTI DI BIOMETANAZIONE



**Fig. 18.** Produzione cumulata di CH<sub>4</sub> delle SUV e delle SUD nei primi 28 giorni. Solo le prove ossidative più leggere e più intense sono state comparate alle matrici non trattate. L'ampiezza delle barre di errore è pari a 2 DS.

Data la lunghezza dei test di BMP eseguiti, risulta utile confrontare le produzioni delle due matrici a metà del tempo di prova (28 giorni). In entrambe le prove, nel lasso di tempo considerato, i trattamenti ossidativi più leggeri (4,4 M per SUV e 1,8 M per SUD) hanno avuto un effetto migliorativo sia sui tempi di inizio della metanogenesi sia sulla produzione di biometano considerando le matrici non trattate e quelle sottoposte ai trattamenti ossidativi più spinti (Fig. 18).

Le concentrazioni più alte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sempre associate al Fe<sup>2+</sup>, hanno avuto un effetto inibitore sulla metanogenesi, ritardandone l'inizio e nel caso delle SUD anche abbassando la produzione di biogas complessiva in modo statisticamente rilevante. Questo peggioramento delle performance di BMP alle condizioni ossidative più estreme è spiegabile principalmente con la presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residuo nella matrice che ha avuto un effetto inibitorio sui batteri metanigeni ed in parte può essere giustificato con l'intensa acidificazione delle matrici sottoposte ai trattamenti ossidativi (Tab. 11).

**Tab. 11** - Andamento dei valori di pH

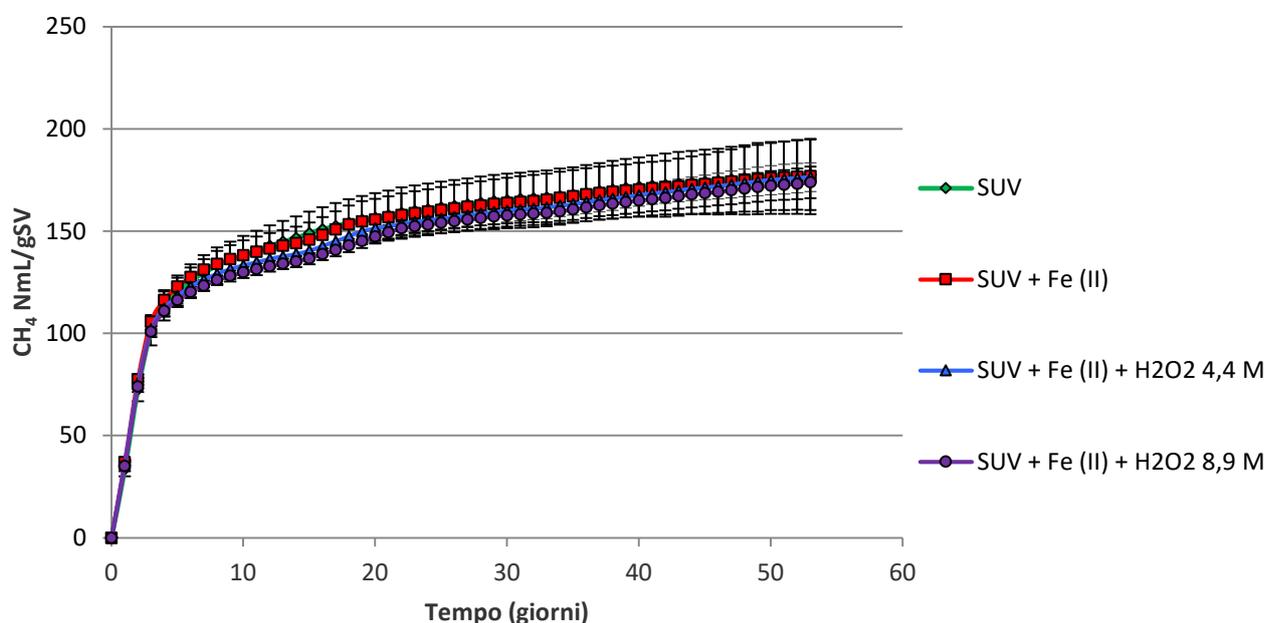
<b>Campione</b>	<b>pH del campione</b>	<b>pH dei reattori all'inizio della prova</b>	<b>pH dei reattori alla fine della prova</b>
<b>Inoculo SUV</b>	7,55	7,55	8,00
<b>SUV</b>	4,72	7,22	7,83
<b>SUV + FeCl<sub>2</sub></b>	3,33	7,04	7,73
<b>SUV + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4,4 M</b>	2,98	6,91	7,68
<b>SUV + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 8,9 M</b>	2,75	6,95	7,75
<b>Inoculo SUD</b>	7,78	7,78	7,93
<b>SUD</b>	4,92	7,38	7,66
<b>SUD + FeCl<sub>2</sub></b>	3,41	7,10	7,62
<b>SUD + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,8 M</b>	3,00	7,03	7,53
<b>SUD + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3,5 M</b>	2,83	6,85	7,56
<b>SUD + FeCl<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7,1 M</b>	2,65	6,80	7,48

Anche se l'inoculo ha la capacità di mitigare l'acidificazione indotta agendo come un tampone, l'introduzione nei reattori di matrici rese più acide dai trattamenti potrebbe aver contribuito a ritardare l'inizio della metanogenesi. È possibile che per la comunità di microorganismi dell'inoculo che partecipano alla DA sia stato necessario un periodo di "acclimatazione" alle mutate condizioni di pH.

La quantità di Fe<sup>2+</sup> introdotta per sviluppare i trattamenti ossidativi effettuati, oltre ad aver un effetto sul BMP nel caso delle SUV, ha dimostrato la capacità di eliminare dal biogas pressoché tutto il contenuto di H<sub>2</sub>S apportato dalla sansa, andando a compensare parzialmente anche il contributo di tale composto apportato dall'inoculo (vedi valori negativi ultima colonna della Tab. 7).

## 9.5 RISULTATI DEL TEST DI BMP DELLE SUV AD ALTA DILUIZIONE

Le SUV, come riportato in precedenza, sono state oggetto di un ulteriore test di BMP le cui condizioni sono riportate in Tab. 8. L'effetto del diverso rapporto inoculo/sansa, se comparato al precedente test, ha avuto un'influenza sulla cinetica di formazione ma non sul quantitativo massimo di biometano producibile. La diluizione operata dall'inoculo in questo test ha portato all'eliminazione dell'effetto batteriostatico delle sostanze fenoliche anche nelle sansa non trattate. La metanogenesi, infatti, come si può osservare dal grafico in Fig. 19 è iniziata per tutti i campioni con una cinetica analoga e con andamenti piuttosto simili per tutta la durata dell'esperimento; inoltre, sebbene il grafico suggerisca una produzione leggermente superiore per le sansa non sottoposte a trattamenti ossidativi in particolare tra il quarto ed il ventiquattresimo giorno, le differenze rientrano nelle barre di errore e risultano statisticamente poco significative. La produzione massima di biometano, si attesta intorno 176 NmL/gSV indipendentemente dal trattamento effettuato, questa risulta in linea con i dati ottenuti nella precedentemente prova che coinvolge la medesima matrice.

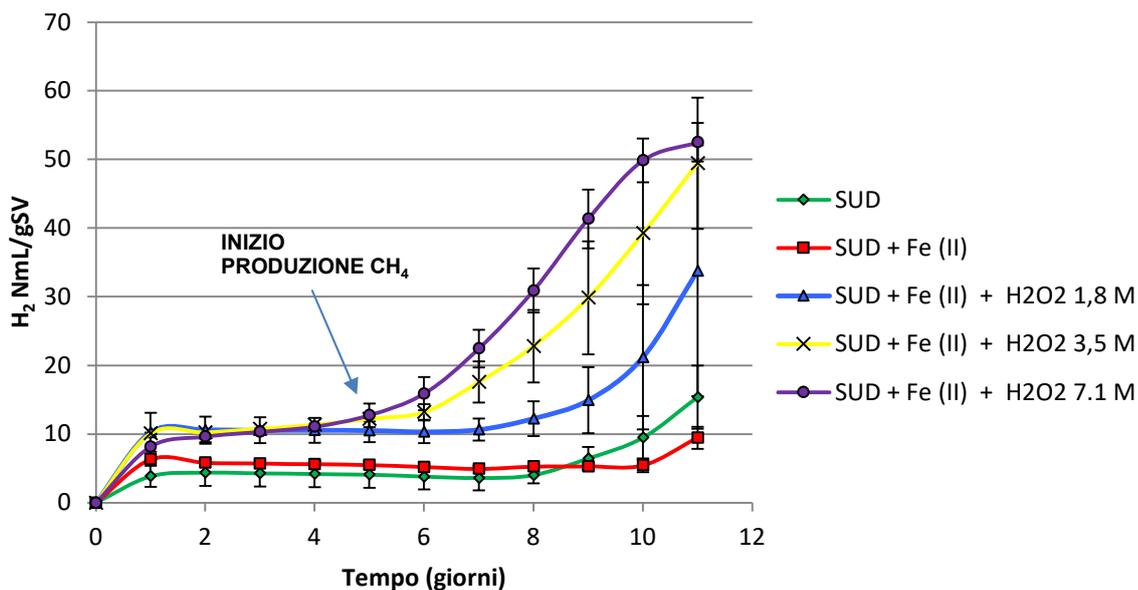


**Fig. 19.** Produzione cumulata di CH<sub>4</sub> delle SUV – Test ad alta diluizione. L'ampiezza delle barre di errore è pari a 2 DS.

## 9.6 RISULTATI DEL TEST DI BHP DELLE SUD

Le SUD, che presentano il BMP più elevato tra le matrici prese in considerazione, sono state oggetto di una prova per valutare se i pretrattamenti ossidativi avessero un effetto anche sul BHP.

Lo sviluppo del bioidrogeno nella prova effettuata è avvenuto nell'arco di 24 h (Fig. 20). Le sansa trattate con trattamenti ossidativi hanno sviluppato una quantità di H<sub>2</sub> approssimativamente pari a 10 mL/gSV ed è risultata essere doppia rispetto alle sansa denocciolate non trattate e alle sansa trattate unicamente con il cloruro di ferro tetraidrato, la cui produzione si è attestata intorno ai 4 – 5 mL/gSV.



**Fig. 20.** Produzione cumulata di H<sub>2</sub> delle SUD. L'incremento di gas misurato dopo il 4° giorno è dovuto allo sviluppo di CH<sub>4</sub> dovuto all'azione dei microrganismi metanigeni. L'ampiezza delle barre di errore è pari a 2 DS.

Alla produzione di bioidrogeno che si è verificata nel primo giorno è seguito un periodo di stasi fino al 4° giorno. I successivi incrementi di gas registrati dal misuratore di flusso del AMPTS II riportati nel grafico a partire dal 5° giorno sono attribuibili allo sviluppo di biometano da parte delle comunità batteriche presenti nei reattori. La generazione di CH<sub>4</sub> è stata confermata analizzando al GC-TCD il gas campionato lungo la linea di misura (paragrafo 7.13). A seguito dello sviluppo di metano nei vari reattori la prova è stata arrestata l'undicesimo giorno.

## DISCUSSIONE

L'industria olearia in UE, con una raccolta media annua di 12,6 milioni di tonnellate di olive dedicate esclusivamente alla produzione di olio (media delle annate 2016-2020) (COI, 2022; FAO, 2022), ha la potenzialità per produrre, se il sistema estrattivo impiegato fosse unicamente il sistema centrifugo a due fasi circa 10,4 milioni di tonnellate di sansa umida (SUV) (vedi dati in tabella 3) di cui 2,5 milioni di tonnellate costituite dal nocciolino (pressappoco il 20% del frutto (Bianchi, 2003)).

Il lavoro realizzato e riportato in questa tesi di dottorato evidenzia che se tale quantità di SUV prodotta annualmente venisse impiegata totalmente in processi di DA, prendendo in analisi i risultati dalle prove di BMP ottenuti e un tempo di ritenzione idraulica (HRT) di 20 giorni, come suggerito in letteratura (Tekin and Dalgıç, 2000), si potrebbe supporre un potenziale produttivo per l'area dell'UE di 335 milioni di Nm<sup>3</sup> annui di CH<sub>4</sub>. Applicando alla SUV il trattamento ossidativo con 4,4 M di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4,2 g Fe<sup>2+</sup>, la produzione di biometano, a parità di condizioni, risulterebbe incrementata del 25,6% portando il potenziale produttivo teorico dell'area UE da 335 a 420 milioni di Nm<sup>3</sup> annui.

Sebbene i trattamenti ossidativi applicati alle matrici non abbiano aumentato la quantità assoluta di biometano prodotto alla fine del test di BMP, questi hanno dimostrato la capacità di ridurre e/o eliminare i tempi di latenza nella metanogenesi. Ciò si traduce in un indubbio vantaggio sia nell'uso dei digestori, da subito produttivi, sia nella riduzione dei tempi di biometanazione, permettendo un più rapido turnover della materia organica da trattare.

Nel test la SUV trattata con la soluzione 4,4 M di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presenta un picco di produzione di 11,41 NmL/gSV l'ottavo giorno, lo stesso giorno in cui la SUV non trattata inizia il processo di metanogenesi. Con la sansa libera da composti inibenti l'attività microbica, si ha un'immediata produzione di biogas in un digestore anaerobico ed i limiti di OLR nell'impianto non sono condizionati dalla concentrazione di sostanze batteriostatiche presenti nella matrice ma solo dal carico organico che il sistema in oggetto è in grado di gestire.

Il biogas prodotto con il trattamento ossidativo, inoltre, ha un tenore di H<sub>2</sub>S estremamente basso, in quanto l'apporto di idrogeno solforato generato nella DA è pressoché tutto compensato dal ferro introdotto nel trattamento. Un basso tenore di H<sub>2</sub>S costituisce un duplice beneficio per i sistemi di DA in quanto, limitando la corrosione delle tubazioni e degli impianti di produzione dell'energia, riduce i costi di manutenzione e, inoltre, permette in modo più agevole l'impiego delle tecnologie di *upgrading* che consentono al biogas non solo di essere utilizzato per la produzione combinata di energia e calore attraverso l'uso di motori stazionari ma anche di essere impiegato come materia prima in grado di fornire metano per usi ad alto valore aggiunto (ad es. immissione in rete o autotrazione) in linea con i principi della strategia dell'UE "*waste-to-energy*" (EU Commission, 2017).

Per quanto riguarda l'utilizzo della DA nel trattamento delle SUV, oltre a considerare gli aspetti relativi al miglioramento del BMP delle sansa dal punto di vista tecnico ci sono altri effetti positivi. La DA, confrontata con altre opzioni di utilizzo quali l'estrazione dell'olio di sansa e lo spandimento al suolo, risulta l'opzione preferibile anche dal punto di vista ambientale. Diversi studi basati sull'analisi del ciclo di vita (*Life Cycle Assessment* – LCA) confermano che l'uso di digestori anaerobici per la valorizzazione della sansa umida sono preferibili dal punto di vista ecologico rispetto alle opzioni appena citate (Alonso-Fariñas et al., 2020; Batuecas et al., 2019).

Bisogna considerare che, nell'ottica della sostenibilità, è importante produrre beni e servizi essenziali limitando gli impatti legati alle produzioni stesse; i decanter a due fasi, diffusisi negli anni novanta, sono stati definiti "ecologici" (Azbar et al., 2004) proprio perché, a capacità estrattive paragonabili con le tecnologie in quei tempi diffuse, coniugavano caratteristiche di risparmio di energia e di acqua di processo.

Alla luce dei risultati ottenuti, particolarmente utile ci sembra l'approccio "frazionale" per la valorizzazione i sottoprodotti solidi dell'industria olearia (Ribeiro et al., 2020). Il nocciolino per il suo potere calorifico elevato (16,7 – 17,6 MJ/kg), la generazione di ceneri in minime quantità e la scarsa presenza di composti solforati e azotati nei fumi risulta essere un ottimo combustibile e una biomassa rinnovabile con un valore di mercato. Quindi separare la frazione legnosa costituita dal nocciolino permette già di valorizzare una parte della biomassa solida. Inoltre, sebbene possa essere separato convenientemente da sanse provenienti da entrambi i sistemi (a due e tre fasi), la percentuale di recupero è maggiore se il separatore lavora con le sanse a due fasi (di Serio et al., 2011).

Il recupero del nocciolino permette di inviare alla DA solo la frazione più idonea della sansa ad essere trasformata in biogas come è possibile apprezzare in figura 18. La produzione di biometano delle sanse denocciolate è risultata essere più alta del +35% rispetto alle sanse a due fasi integrali a causa del diverso contenuto in fibre, soprattutto legato alla minor percentuale di lignina (Tab. 10). Inviare ai digestori la frazione della sansa con la produzione più alta di biometano per grammo di SV potrebbe, superata l'inibizione dei fenoli, aumentare la sostenibilità economica ed ambientale di tutto il processo di DA come trattamento finale della frazione residua organica incidendo favorevolmente sulla eliminazione dei principali impatti legati all'industria estrattiva dell'olio d'oliva.

Un possibile effetto negativo apportato dai trattamenti ossidativi che deve essere attentamente valutato è dato dall'intensa acidificazione delle sanse (Tab.11). Il pH risulta essere un parametro cruciale per l'attività di produzione del biogas quindi l'ingresso di una matrice con valori di acidità elevati deve essere attentamente valutata nell'economia di un digestore soprattutto in termini di capacità del sistema di tamponare le possibili variazioni dello stesso. Questo effetto potrebbe essere parzialmente ovviato abbinando ai trattamenti ossidativi i digestori bi-stadio dove i microrganismi idrolitici, acidogenici e acetogenici hanno un optimum di crescita in un intervallo di pH inferiore rispetto ai microrganismi metanigeni. Inoltre la fase di DF che si realizzerebbe nel primo reattore potrebbe essere sfruttata per la produzione di bioidrogeno, un gas sempre più strategico per la transizione ecologica che tutte le economie mondiali, soprattutto quelle avanzate, dovranno affrontare nei prossimi decenni. Anche in questo caso i trattamenti ossidativi, limitando il contenuto fenolico, hanno mostrato la capacità di favorire i processi di produzione dell'idrogeno raddoppiando la quantità generata. Probabilmente i consorzi microbici che partecipano alle fasi idrolitiche e acidogene, come suggerito anche in letteratura (Borja et al., 2005), non sono in grado di demolire questa classe di composti e sono influenzati dall'effetto batteriostatico che i fenoli esercitano in condizioni di anaerobiosi.

D'altro canto il trattamento con il reattivo di Fenton permette di abbattere il contenuto fenolico senza lasciare tracce di sostanze indesiderabili nella matrice e nel digestato configurandosi come un vero e proprio processo di chimica verde applicato alla gestione dei sottoprodotti dell'industria olearia. Lo sfruttamento del biogas potrebbe permettere ai frantoi di sopperire, almeno parzialmente, alle richieste di energia e calore che necessitano per le attività produttive oltre che avere un prodotto finale in grado di aiutare la fertilità dei suoli.

Dal punto di vista economico, inoltre, il costo del trattamento dovrebbe essere ascrivibile soltanto al perossido di idrogeno in quanto il ferro è già normalmente impiegato nei digestori di taglia medio-piccola nelle quantità applicate nei correnti esperimenti per tenere sotto controllo il tenore di idrogeno solforato presente nel biogas. L'introduzione di sali di ferro nella matrice o nei digestori risulta essere una delle soluzioni impiantistiche più semplici da adottare, in quanto necessita semplicemente di serbatoi per lo stoccaggio di tali reagenti, di una pompa per il dosaggio degli stessi e di un sistema di mescolamento degli stessi alle matrici interessate. Quindi si tratta a tutti gli effetti di soluzioni impiantistiche semplici che non comportano elevata tecnologia e che per questo risultano particolarmente idonee ad essere gestite anche da impianti medio piccoli.

In entrambi gli esperimenti che hanno coinvolto le matrici in questione (SUV e SUD) i trattamenti ossidativi più leggeri sono quelli che hanno dimostrato una migliore prestazione nel miglioramento della

biometanazione, questo fa ben sperare nell'ottica dell'ottimizzazione del processo e nella riduzione dei costi stessi del trattamento, ovviamente un'attenta valutazione degli oneri e della fattibilità economica complessiva e non solo tecnica di tutto il processo dovrà essere demandata a future ricerche.

## CONCLUSIONI

I trattamenti ossidativi proposti basati sul reattivo di Fenton hanno dimostrato la capacità tecnica di migliorare il processo di biometanazione e il potenziale produttivo di bioidrogeno delle sanse umide. A questo va associato anche un miglioramento della qualità del biogas prodotto grazie al contenimento/eliminazione di uno dei composti meno desiderabili presenti nel biogas stesso, l'idrogeno solforato. I risultati ottenuti aprono interessanti scenari sul possibile impiego dei trattamenti proposti che però sono legati all'ottimizzazione del processo ossidativo e, successivamente, alla valutazione della sostenibilità economica di tutto il procedimento.

Qualora l'anticipo della metanogenesi, la migliore qualità del biogas prodotto, l'incremento produttivo del bioidrogeno giustificassero i costi relativi al trattamento ossidativo delle sanse si potrebbe avere un'industria olearia ad impatto ambientale ridotto capace di soddisfare, almeno parzialmente, le proprie richieste energetiche. Verrebbe, inoltre, valorizzata tutta la biomassa trattata producendo olio alimentare e materia organica in grado di contribuire al mantenimento della fertilità dei suoli nell'ottica di uno sviluppo economico sostenibile a cui dovranno sempre più tendere tutte le imprese produttive capaci di erogare beni e servizi.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbattista, R., Ventura, G., Calvano, C.D., Cataldi, T.R.I., Losito, I., 2021. Bioactive compounds in waste by-products from olive oil production: Applications and structural characterization by mass spectrometry techniques. *Foods* 10(6), 1236. <https://doi.org/10.3390/foods10061236>
- Albuquerque, J., Gonzàlvez, J., Garcia, D., Cegarra J., 2004. Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology* 91, 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00177-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00177-9)
- Al-Imarah, K.A., Lafta, T.M., Jabr, A.K., Abrar, N.M., 2017. Desulfurization for Biogas Generated by Lab Anaerobic Digestion unit. *Journal of Agriculture and Veterinary Science* 10, 66–73.
- Alonso-Fariñas, B., Oliva, A., Rodríguez-Galán, M., Esposito, G., García-Martín, J.F., Rodríguez-Gutiérrez, G., Serrano, A., Feroso, F.G., 2020. Environmental Assessment of Olive Mill Solid Waste Valorization via Anaerobic Digestion Versus Olive Pomace Oil Extraction. *Processes* 8, 626. <https://doi.org/10.3390/pr8050626>
- Amirante, P., 2013. *Lezioni di macchine ed impianti per la conservazione, estrazione e trasformazione dei prodotti alimentari*. Bari.
- Amirante, P., Clodoveo, M.L., Leone, A., Tamborrino, A., 2009. Innovation in olive oil processing plants to produce an excellent olive oil and to reduce environmental impact. *Italian Journal of Agronomy* 4, 147. <https://doi.org/10.4081/ija.2009.s1.147>
- Anastas, P.T., Kirchoff, M.M., 2002. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. *Accounts of Chemical Research*. 35, 686–694. <https://doi.org/10.1021/ar010065m>
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B.K., 1999. A Comprehensive Model of Anaerobic Bioconversion of Complex Substrates to Biogas. *Biotechnology and Bioengineering*. 63, 363–372. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990505\)63:3%3C363::AID-BIT13%3E3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990505)63:3%3C363::AID-BIT13%3E3.0.CO;2-Z)
- Antónia Nunes, M., Costa, A.S.G., Bessada, S., Santos, J., Puga, H., Alves, R.C., Freitas, V., Oliveira, M.B.P.P., 2018. Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid- and water-soluble components. *Science of the Total Environment* 644, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.350>
- Azbar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoglu, A., Sengul, F., Ozer, A., 2004. A Review of Waste Management Options in Olive Oil Production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34, 209–247. <https://doi.org/10.1080/10643380490279932>
- Babuponnusami, A., Muthukumar, K., 2014. A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2, 557–572. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.011>
- Badshah, M., Lam, D.M., Liu, J., Mattiasson, B., 2012. Use of an Automatic Methane Potential Test System for evaluating the biomethane potential of sugarcane bagasse after different treatments. *Bioresource Technology* 114, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.022>
- Bampalioutas, K., Vlysidis, A., Lyberatos, G., Vlyssides, A., 2019. Detoxification and methane production kinetics from three-phase olive mill wastewater using Fenton’s reagent followed by anaerobic digestion. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 94, 265–275. <https://doi.org/10.1002/jctb.5772>

- Batuecas, E., Tommasi, T., Battista, F., Negro, V., Sonetti, G., Viotti, P., Fino, D., Mancini, G., 2019. Life Cycle Assessment of waste disposal from olive oil production: Anaerobic digestion and conventional disposal on soil. *Journal of Environmental Management* 237, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.021>
- Beauchamp, G.K., Keast, R.S.J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C.-H., Smith, A.B., Breslin, P.A.S., 2005. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437, 45–46. <https://doi.org/10.1038/437045a>
- Benemann, J.R., Pedroni, P., 2007. Produzione biologica H<sub>2</sub>: meccanismi e processi. *Enciclopedia degli idrocarburi*.
- Benincasa, C., Pellegrino, M., Romano, E., Claps, S., Fallara, C., Perri, E., 2022. Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolic Compounds in Spray-Dried Olive Mill Wastewater. *Frontiers in Nutrition*, 8 (782693). doi: 10.3389/fnut.2021.782693
- Benincasa, C., Pellegrino, M., Veltri, L., Claps, S., Fallara, C., Perri, E., 2021. Dried Destoned Virgin Olive Pomace: A Promising New By-Product from Pomace Extraction Process. *Molecules*, 26, 4337. <https://doi.org/10.3390/molecules26144337>
- Bianchi, G., 2003. Lipids and phenols in table olives. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105, 229–242. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390046>
- Borja, R., Rincón, B., Raposo, F., Alba, J., Martín, A., 2003. Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the two-phase olive mill solid waste. *Biochemical Engineering Journal* 15, 139–145. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00194-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00194-8)
- Borja, R., Rincón, B., Raposo, F., Alba, J., Martín, A., 2002. A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature. *Process Biochemistry* 38, 733–742. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00202-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00202-9)
- Borja, R., Sánchez, E., Rincón, B., Raposo, F., Martín, M.A., Martín, A., 2005. Study and optimisation of the anaerobic acidogenic fermentation of two-phase olive pomace. *Process Biochemistry* 40, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.002>
- Bressan, M., Liberatore, L., d'Alessandro, N., Tonucci, L., Belli, C., Ranalli, G., 2004. Improved Combined Chemical and Biological Treatments of Olive Oil Mill Wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1228–1233. <https://doi.org/10.1021/jf035128p>
- Brozzoli, V., Bartocci, S., Terramocchia, S., Contò, G., Federici, F., D'Annibale, A., Petruccioli, M., 2010. Stoned olive pomace fermentation with *Pleurotus* species and its evaluation as a possible animal feed. *Enzyme and Microbial Technology* 46, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.09.008>
- Caponio, F., Catalano, P., 2001. Hammer crushers vs disk crushers: the influence of working temperature on the quality and preservation of virgin olive oil. *European Food Research and Technology* 213, 219–224. <https://doi.org/10.1007/s002170100364>
- Carrillo-Reyes, J., Tapia-Rodríguez, A., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Aguilar Juárez, O., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., Maluf Braga, A.F., Braga, L., Castelló, E., Chatellard, L., Etchebere, C., Fuentes, L., León-Becerril, E., Méndez-Acosta, H.O., Ruiz-Filippi, G., Tapia-Venegas, E., Trably, E., Wenzel, J., Zaiat, M., 2019. A standardized biohydrogen potential protocol: An international round robin test approach. *International Journal of Hydrogen Energy* 44, 26237–26247. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.124>
- Castellani, F., Vitali, A., Bernardi, N., Marone, E., Palazzo, F., Grotta, L., Martino, G., 2017. Dietary supplementation with dried olive pomace in dairy cows modifies the composition of fatty acids and the

- aromatic profile in milk and related cheese. *Journal of Dairy Science* 100, 8658–8669. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12899>
- Cecchi, F., Battistoni, P., Pavan, P., Bolzonella, D., Innocenti, L., 2005. *Digestione anaerobica della frazione organica dei rifiuti solidi*. Rome.
- Christoforou, E., Fokaidis, P.A., 2016. A review of olive mill solid wastes to energy utilization techniques. *Waste Management* 49, 346–363. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.012>
- COI, 2022. International Olive Council [WWW Document]. World Olive Oil and Table olive Figures. URL <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2021/12/OT-CE-901-07-12-2021-P.pdf> (accessed 2.20.22).
- Commissione Europea, 2021. Comunicazione della Commissione al Parlamento Europeo: “Pronti per il 55 %”: realizzare l’obiettivo climatico dell’UE per il 2030 lungo il cammino verso la neutralità climatica. Bruxelles.
- Costagli, G., 2018. The use of disc stack centrifuge in the virgin olive oil industry. *Journal of Agricultural Engineering* 49, 75–80. <https://doi.org/10.4081/jae.2018.784>
- Deepanraj, B., Sivasubramanian, V., Jayaraj, S., 2014. Biogas generation through anaerobic digestion process-an overview. *Research Journal of Chemistry and Environment* 18, 80–94.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P., 2013. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry* 48, 1532–1552. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.010>
- di Giacomo, G., Romano, P., 2022. Evolution of the Olive Oil Industry along the Entire Production Chain and Related Waste Management. *Energies (Basel)* 15(2), 465. <https://doi.org/10.3390/en15020465>
- di Giovacchino, L., 2010. *Tecnologie di lavorazione delle olive in frantoio. Rese di estrazione e qualità dell’olio. Tecniche Nuove*.
- di Giovacchino, L., Costantini, N., Ferrante, M.L., Serraiocco, A., 2002. Influence of malaxation time of olive paste on oil extraction yields and chemical and organoleptic characteristics of virgin olive oil obtained by a centrifugal decanter at water saving. *Grasas y Aceites* 53. <https://doi.org/10.3989/gya.2002.v53.i2.302>
- di Giovacchino, L., Preziuso, S.M., di Serio, M.G., Mucciarella, M.R., di Loreto, G., Lanza, B., 2017. Double extraction of olive oil in large oil mills of Southern Italy: Effects on extraction efficiency, oil quality, and economy of the process. *European Journal of Lipid Science and Technology* 119, 1600161. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600161>
- di Giovacchino, Luciano, Sestili, S., di Vincenzo, D., 2002. Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 587–601.
- di Giovacchino, L., Solinas, M., Miccoli, M., 1994. Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71(11), 1189–1194. <https://doi.org/10.1007/BF02540535>
- di Serio, M.G., Lanza, B., Iannucci, E., Russi, F., di Giovacchino, L., 2011. Valorization of wet olive pomace produced by 2 and 3-phases centrifugal decanter. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 88, 111–117.
- Difonzo, G., Troilo, M., Squeo, G., Pasqualone, A., Caponio, F., 2021. Functional compounds from olive pomace to obtain high-added value foods – a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 101, 15–26. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10478>

- Elalami, D., Carrere, H., Abdelouahdi, K., Garcia-Bernet, D., Peydecastaing, J., Vaca-Medina, G., Oukarroum, A., Zeroual, Y., Barakat, A., 2020. Mild microwaves, ultrasonic and alkaline pretreatments for improving methane production: Impact on biochemical and structural properties of olive pomace. *Bioresource Technology* 299, 122591. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.122591>
- El-Gohary, F.A., Badawy, M.I., El-Khateeb, M.A., El-Kalliny, A.S., 2009. Integrated treatment of olive mill wastewater (OMW) by the combination of Fenton's reaction and anaerobic treatment. *Journal of Hazardous Materials* 162, 1536–1541. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.098>
- Esposito, G., Frunzo, L., Liotta, F., Panico, A., Pirozzi F., 2012. Bio-Methane Potential Tests To Measure The Biogas Production From The Digestion and Co-Digestion of Complex Organic Substrates. *The Open Environmental Engineering Journal* 5, 1–8. <https://doi.org/10.2174/1874829501205010001>
- EU Commission, 2017. The role of waste-to-energy in the circular economy [WWW Document]. COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL, THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE AND THE COMMITTEE OF THE REGIONS. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017DC0034&from=en> (accessed 2.20.22).
- EUROPEAN COMMISSION, 2020. A hydrogen strategy for a climate-neutral Europe.
- European Commission website, 2022. Olive oil. An overview of the production and marketing of olive oil in the EU. [WWW Document]. [https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/olive-oil\\_en](https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/olive-oil_en). URL [https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/olive-oil\\_en](https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/olive-oil_en) (accessed 6.4.22).
- FAO, 2022. FAOSTAT [WWW Document]. FAO, Food Agriculture Organization License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed 2.20.22).
- Frankel, E., Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2013. Literature Review on Production Process To Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(22), 5179–5188. <https://doi.org/10.1021/jf400806z>
- García Martín, J.F., Cuevas, M., Feng, C.-H., Álvarez Mateos, P., Torres García, M., Sánchez, S., 2020. Energetic Valorisation of Olive Biomass: Olive-Tree Pruning, Olive Stones and Pomaces. *Processes* 8, 511. <https://doi.org/10.3390/pr8050511>
- Ghimire, A., Sposito, F., Frunzo, L., Trably, E., Escudié, R., Pirozzi, F., Lens, P.N.L., Esposito, G., 2016. Effects of operational parameters on dark fermentative hydrogen production from biodegradable complex waste biomass. *Waste Management* 50, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.044>
- Giovannini, G., Donoso-Bravo, A., Jeison, D., Chamy, R., Ruiz-Filippi, G., vande Wouwer, A., 2016. A review of the role of hydrogen in past and current modelling approaches to anaerobic digestion processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 41(39), 17713–17722. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.012>
- Girard, M., Palacios, H., J. Belzile, M., Godbout, S., Pelletier, F., 2013. Biodegradation in Animal Manure Management, in: *Biodegradation - Engineering and Technology* 10, 251–274. InTechOpen. <https://doi.org/10.5772/56151>
- Girardi, F., Cichelli, A., Perri, E., Basti, C., d'Alessandro, N., 2014. Oxidative treatments of solid olive residues: Effects on phenolic and fatty acid fractions. *European Journal of Lipid Science and Technology* 116, 352–359. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300083>

- Girardi, F., Mascitti, A., D'Alessandro, N., Tonucci, L., Marzo, G.A., Remetti, R., 2022. Effects of oxidative treatments on biomethane potential of solid olive residues. *Waste and Biomass Valorization*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01987-4>
- Gucci, R., Perri, E., Servili, M., 2012. Il miglioramento delle caratteristiche organolettiche tipiche degli oli extra vergini di oliva rispetto alle esigenze di mercato, UNAPROL pubblicazioni.
- Gutierrez, O., Balart, R., Lascano, D., Quiles-Carrillo, L., Fages, E., Sanchez-Nacher, L., 2020. Development and Characterization of Environmentally Friendly Insulation Materials for the Building Industry from Olive Pomace Waste. *Fibers and Polymers* 21, 1142–1151. <https://doi.org/10.1007/s12221-020-9701-6>
- Kinigopoulou, V., Hatzigiannakis, E., Guitonas, A., Oikonomou, E.K., Stefanou, S., Gasparatos, D., 2022. Evaluation of Biobed Bio-Mixture from Olive Oil Mill Wastewater Treatment as a Soil Organic Amendment in a Circular Economy Context. *Applied Sciences* 12, 7347. <https://doi.org/10.3390/app12147347>
- Lettinga, G., Rebac, S., Zeeman, G., 2001. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment, *TRENDS in Biotechnology* 19(9) 363-370. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01701-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01701-2).
- Lucas, M.S., Peres, J.A., 2009. Treatment of olive mill wastewater by a combined process: Fenton's reagent and chemical coagulation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 44, 198–205. <https://doi.org/10.1080/10934520802539889>
- Maass, D., Moya Ramírez, I., García Román, M., Jurado Alameda, E., Ulson de Souza, A.A., Borges Valle, J.A., Altmajer Vaz, D., 2016. Two-phase olive mill waste (alpeorujo) as carbon source for biosurfactant production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 91, 1990–1997. <https://doi.org/10.1002/jctb.4790>
- Martínez Moreno, J., Gomez Herrera, C., Pereda, J., 1964. Estudios fisico-químicos sobre las pastas de aceitunas molidas. La presada de la pasta como un proceso de filtración. *Grasas y Aceites* 15, 299–309.
- Martínez Moreno, J.M., Gomez Herrera, C., Janer del Valle C., 1963. Estudios fisico-químicos sobre las pastas de aceitunas molidas. Diseños de modelos analogicos para la prensada. *Grasas y Aceites* 14, 197–204.
- Martínez-Gallardo, M.R., Jurado, M.M., López-González, J.A., Toribio, A., Suárez-Estrella, F., Sáez, J.A., Moral, R., Andreu-Rodríguez, F.J., López, M.J., 2022. Biorecovery of olive mill wastewater sludge from evaporation ponds. *Journal of Environmental Management* 319, 115647. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115647>
- Mekki, A., Dhouib, A., Sayadi, S., 2007. Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters. *Journal of Environmental Management* 84(2), 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.05.015>
- Merlin Christy, P., Gopinath, L.R., Divya, D., 2014. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.010>
- Messineo, A., Maniscalco, M.P., Volpe, R., 2020. Biomethane recovery from olive mill residues through anaerobic digestion: A review of the state-of-the-art technology. *Science of The Total Environment* 703, 135508. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135508>
- Montané, D., Salvadó, J., Torras, C., Farriol, X., 2002. High-temperature dilute-acid hydrolysis of olive stones for furfural production. *Biomass Bioenergy* 22, 295–304. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00007-7)
- Mugnai, G., Borruso, L., Mimmo, T., Cesco, S., Luongo, V., Frunzo, L., Fabbricino, M., Pirozzi, F., Cappitelli, F., Villa, F., 2021. Dynamics of bacterial communities and substrate conversion during olive-mill waste dark

- fermentation: Prediction of the metabolic routes for hydrogen production. *Bioresource Technology* 319, 124157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124157>
- Muñoz, R., Meier, L., Diaz, I., Jeison, D., 2015. A review on the state-of-the-art of physical/chemical and biological technologies for biogas upgrading. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 14(4), 727–759. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9379-1>
- Nucciarelli, D., Esposito, S., Veneziani, G., Daidone, L., Urbani, S., Taticchi, A., Selvaggini, R., Servili, M., 2022. The Use of a Cooling Crusher to Reduce the Temperature of Olive Paste and Improve EVOO Quality of Coratina, Peranzana, and Moresca Cultivars: Impact on Phenolic and Volatile Compounds. *Food and Bioprocess Technology* 15(9), 1988–1996. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02862-9>
- Panizzi, L., Scarpati, M.L., Oriente, E.G., 1960. Structure of the bitter glucoside oleuropein. *Gazzetta Chimica Italiana* 90, 1449–1485.
- Pellera, F.-M., Gidakos, E., 2018. Chemical pretreatment of lignocellulosic agroindustrial waste for methane production. *Waste Management* 71, 689–703. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.04.038>
- Pellera, F.-M., Santori, S., Pomi, R., Poletti, A., Gidakos, E., 2016. Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of olive mill solid waste. *Waste Management* 58, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.08.008>
- Polari, J.J., Garcí-Aguirre, D., Olmo-García, L., Carrasco-Pancorbo, A., Wang, S.C., 2018. Impact of industrial hammer mill rotor speed on extraction efficiency and quality of extra virgin olive oil. *Food Chemistry* 242, 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.003>
- Ramprakash, B., Lindblad, P., Eaton-Rye, J.J., Incharoensakdi, A., 2022. Current strategies and future perspectives in biological hydrogen production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112773>
- Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., di Febo, M., Marchegiani, D., di Fonzo, V., 2006. Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(2), 434–440. <https://doi.org/10.1021/jf051647b>
- Ranalli, A., de Mattia, G., Ferrante, M.L., 1997. Comparative evaluation of the olive oil given by a new processing system. *International Journal of Food Science and Technology* 32(4), 289–297. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1997.00116.x>
- Ranalli, A., Marchegiani, D., Contento, S., Girardi, F., Nicolosi, M.P., Brullo, M.D., 2009. Variations of iridoid oleuropein in Italian olive varieties during growth and maturation. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111(7), 678–687. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800268>
- Ranalli, Alfonso, Marchegiani, D., Pardi, Diana, Contento, S., Pardi, Davide, Girardi, F., Kotti, F., 2009. Evaluation of Functional Phytochemicals in Destoned Virgin Olive Oil. *Food Bioproc Tech* 2, 322–327. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0128-0>
- Raposo, F., Fernández-Cegrí, V., de la Rubia, M.A., Borja, R., Béline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernández, B., Fernández-Polanco, M., Frigon, J.C., Ganesh, R., Kaparaju, P., Koubova, J., Méndez, R., Menin, G., Peene, A., Scherer, P., Torrijos, M., Uellendahl, H., Wierinck, I., de Wilde, V., 2011. Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 86, 1088–1098. <https://doi.org/10.1002/jctb.2622>

- Ribeiro, T.B., Oliveira, A.L., Costa, C., Nunes, J., Vicente, A.A., Pintado, M., 2020. Total and Sustainable Valorisation of Olive Pomace Using a Fractionation Approach. *Applied Sciences* 10, 6785. <https://doi.org/10.3390/app10196785>
- Roberti Giovanni, 2022. I Fiscoli nel sistema di estrazione tradizionale dell'olio d'oliva [WWW Document]. URL <http://fiscoliroberti.com/i-fiscoli/> (accessed 6.4.22).
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A., 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* 26(9), 960–969. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.07.024>
- Ruggeri, B., Battista, F., Bernardi, M., Fino, D., Mancini, G., 2015. The selection of pretreatment options for anaerobic digestion (AD): A case study in olive oil waste production. *Chemical Engineering Journal* 259, 630–639. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.08.035>
- Ruschioni, S., Loreto, N., Foligni, R., Mannozi, C., Raffaelli, N., Zamporlini, F., Pasquini, M., Roncolini, A., Cardinali, F., Osimani, A., Aquilanti, L., Isidoro, N., Riolo, P., Mozzon, M., 2020. Addition of Olive Pomace to Feeding Substrate Affects Growth Performance and Nutritional Value of Mealworm (*Tenebrio Molitor* L.) Larvae. *Foods* 9(3), 317. <https://doi.org/10.3390/foods9030317>
- Sánchez-Sánchez, C., González-González, A., Cuadros-Salcedo, F., Cuadros-Blázquez, F., 2020. Two-phase Olive mill waste: A circular economy solution to an imminent problem in Southern Europe. *Journal of Cleaner Production* 274, 122789. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122789>
- Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Biasci, A., Riffaldi, R., 2001. Suitability of moist olive pomace as soil amendment. *Water Air Soil Pollut* 128, 13–22. <https://doi.org/10.1023/A:1010361807181>
- Schuchmann, K., Müller, V., 2016. Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 82(14), 4056–4069. <https://doi.org/10.1128/AEM.00882-16>
- Serramiá, N., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A., 2012. Soil mineralization of two-phase olive mill wastes: effect of the lignocellulosic composition on soil C dynamics. *Journal of Environmental Monitoring*. 14(2), 499–509. <https://doi.org/10.1039/C1EM10490J>
- Serrano, A., Feroso, F.G., Rodríguez-Gutierrez, G., Fernandez-Bolaños, J., Borja, R., 2017. Biomethanization of olive mill solid waste after phenols recovery through low-temperature thermal pre-treatment. *Waste Management* 61, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.12.033>
- Serrano, A., Villa-Gomez, D., Feroso, F.G., Alonso-Fariñas, B., 2021. Is anaerobic digestion a feasible alternative to the combustion of olive mill solid waste in terms of energy production? A critical review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 15, 150–162. <https://doi.org/10.1002/bbb.2159>
- Servili, M., Piacquadio, P., de Stefano, G., Taticchi, A., Sciancalepore, V., 2002. Influence of a new crushing technique on the composition of the volatile compounds and related sensory quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 104, 483–489.
- Siano, F., Vasca, E., Picariello, G., 2022. Accurate determination of total biophenols in unfractionated extra-virgin olive oil with the fast blue BB assay. *Food Chemistry* 370, 130990. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130990>
- Siciliano, A., Stillitano, M., Limonti, C., 2016a. Energetic Valorization of Wet Olive Mill Wastes through a Suitable Integrated Treatment: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with Lime and Anaerobic Digestion. *Sustainability* 8(11), 1150. <https://doi.org/10.3390/su8111150>

- Siciliano, A., Stillitano, M.A., de Rosa, S., 2016b. Biogas production from wet olive mill wastes pretreated with hydrogen peroxide in alkaline conditions. *Renewable Energy* 85, 903–916. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.029>
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* 16, 144–158.
- Tekin, A.R., Dalgıç, A.C., 2000. Biogas production from olive pomace Resources, Conservation and Recycling 30(4), 301–313. [https://doi.org/10.1016/S0921-3449\(00\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0921-3449(00)00067-7)
- Thiex, N.J., Anderson, S., Gildemeister, B., Adcock, W., Boedigheimer, J., Bogren, E., Coffin, R., Conway, K., DeBaker, A., Frankenius, E., Gramse, M., Hogan, P., Knese, T., MacDonald, J., Møller, J., Royle, R., Russell, M., Shafiee, F., Shreve, B., Sieh, J., Spann, M., Töpler, E., Watts, M., 2003. Crude Fat, Diethyl Ether Extraction, in Feed, Cereal Grain, and Forage (Randall/Soxtec/Submersion Method): Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 86(5), 888–898. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.5.888>
- van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science* 74(10), 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Verstraete, W., Morgan-Sagastume, F., Aiyuk, S., Waweru, M., Rabaey, K., Lissens, G., 2005. Anaerobic digestion as a core technology in sustainable management of organic matter. *Water Science and Technology* 52(1-2), 59–66. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0498>
- Wang, X., Zhang, L., 2018. Kinetic study of hydroxyl radical formation in a continuous hydroxyl generation system. *RSC Advances* 8(71), 40632–40638. <https://doi.org/10.1039/C8RA08511K>
- Williams, O., Eastwick, C., Kingman, S., Giddings, D., Lormor, S., Lester, E., 2017. Overcoming the caking phenomenon in olive mill wastes. *Industrial Crops and Products* 101, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.02.036>
- Yahaya, E., Lim, S.W., Yeo, W.S., Nandong, J., 2022. A review on process modeling and design of biohydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy* 47(71), 30404–30427. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.06.317>
- Zahi, M.R., Zam, W., el Hattab, M., 2022. State of knowledge on chemical, biological and nutritional properties of olive mill wastewater. *Food Chemistry* 381, 132238 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132238>
- Zsigmond, A.R., Száraz, A., Urák, I., 2021. Macro and trace elements in the black pine needles as inorganic indicators of urban traffic emissions. *Environmental Pollution* 291, 118228. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118228>