



Resum

La digestió anaeròbica és una tecnologia basada en la utilització de diferents microorganismes que treballen conjuntament per transformar grans quantitats de residus orgànics en recursos d'alt valor econòmic, com poden ser químics o energètics. Malauradament, una gran part dels residus orgànics contenen compostos lignocel·lulòsics, components típics d'origen vegetal que es troben en plantes o arbres, que són difícilment degradables pels microorganismes. Això fa que la transformació dels residus mitjançant la digestió anaeròbica es vegi limitada, i que afecti negativament la viabilitat econòmica de la tecnologia. Per una altra banda, els microorganismes presents en l'estómac dels rumugants (bous, ovelles, cabres, etc.) poden degradar els compostos lignocel·lulòsics eficientment. En aquesta investigació, els camps de l'enginyeria, la microbiologia i la ciència animal s'ajunten per a l'elaboració d'un nou tipus de digestor anaeròbic inspirat en el funcionament de l'estómac dels rumugants (rumen). Amb tot, es desitja que, mitjançant un nou disseny del digestor i l'aplicació de paràmetres operacionals adients, microorganismes típics dels rumens es desenvolupin en el digestor per millorar la transformació dels compostos lignocel·lulòsics, difícilment degradables en els digestors convencionals.

Aquest nou procés no produeix el típic producte de la digestió anaeròbica (biogàs), sinó que produeix productes químics d'alt valor econòmic i d'alt interès per a la indústria química.

Xavier Fonoll i Almansa

Doctor en Enginyeria i
Tecnologies Avançades per
la Universitat de Barcelona,
investigador postdoctoral al
Civil & Environmental
Engineering Department
de la Universitat de
Michigan



Xavier Fonoll i Almansa

**Transformació
dels residus
orgànics en
productes químics
i energètics d'alt
valor econòmic
mitjançant l'ús de
biotecnologies
inspirades en la
natura**



Figura 1. Digestor anaerobi de la Michigan State University (Lansing, EUA)

Introducció

El 2010 es van generar 0,5 bilions de tones de la fracció orgànica dels residus sòlids urbans a 161 països. Degut al creixement de la població mundial, s'estima que el 2025 la producció de residus orgànics urbans sigui d'1,1 bilions de tones.¹ A Andorra es van generar durant el 2015, 597 kg de residus sòlids urbans per habitant, i 34% eren orgànics. Els residus orgànics tenen un alt contingut d'energia química. Per exemple, la quantitat de fracció orgànica dels residus municipals que es genera als Estats Units anualment seria suficient per generar la potència necessària per a 4,5 milions de llars.² Una de les tecnologies disponibles per capturar l'energia dels residus orgànics és la digestió anaeròbica (DA) (figura 1).³

La DA és un procés en què la matèria orgànica es degrada degut a l'acció conjunta de microorganismes per transformar-la en productes químics i energètics d'alt valor econòmic. La DA s'ha implementat majoritàriament per a la generació de biogàs (una barreja de CH₄ i CO₂ que es pot fer servir per produir electricitat) i un sòlid amb característiques fertilitzants a través dels residus orgànics, però el procés es pot modificar per obtenir hidrogen o productes químics d'alt interès industrial.⁴

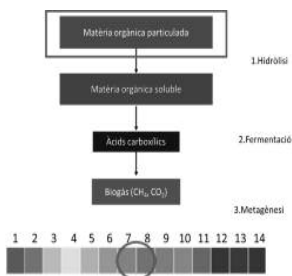


Figura 2. Procés de la DA simplificat

El procés de la digestió anaeròbica

El procés de la DA està dividit en tres etapes: hidròlisi, fermentació i metanogènesi (figura 2).

Durant la primera etapa, la hidròlisi, la matèria orgànica particulada és hidrolitzada per l'acció de microorganismes i enzims i esdevé matèria orgànica soluble. La matèria orgànica soluble és de fàcil accés per a la resta de les poblacions microbianes. Aquesta matèria soluble és llavors fermentada a àcids carboxílics i després aquests es converteixen en biogàs durant la metanogènesi. Cada etapa del procés la realitzen diferents poblacions microbianes i és molt important mantenir un pH entre 7 i 8 per poder obtenir biogàs.⁵ Si es trenca l'equilibri entre l'activitat de les poblacions microbianes es poden acumular productes intermediaris com els àcids carboxílics. Aquest desequilibri pot afectar negativament la producció de biogàs, perquè si els àcids carboxílics s'acumulen el pH pot disminuir per sota de 7 i els microorganismes s'inhibeixen.

Un repte pendent: l'etapa hidrolítica

La DA s'ha implementat globalment per reduir el volum de residus orgànics, produir energia i disminuir les emissions de gasos d'efecte d'hivernacle. Per exemple, a Europa hi ha 18.000 plantes de DA amb una capacitat de potència elèctrica de 10.000 MW.⁶ A més a més, la legislació vigent en el tractament de residus orgànics i energies renovables (2008/98/EC i 2009/28/EC) està promovent la instal·lació de més plantes de DA. Malgrat això, els components lignocel·lulòsics presents en alguns dels residus orgànics són molt difícils de degradar durant el procés de DA, especialment durant l'etapa hidrolítica.⁷ Els compostos lignocel·lulòsics es componen de polímers de cel·lulosa, hemicel·lulosa i lignina enllaçats entre si i són difícilment biodegradables, la qual cosa fa que l'etapa hidrolítica de la DA sigui molt lenta i que l'eficiència del procés sigui baixa. Aquests compostos es poden trobar en molts residus orgànics, com els residus de ramaderia o de menjar. Per accelerar l'etapa hidrolítica s'han estudiat diversos pretractaments físics, químics o biològics que poden trencar l'estructura lignocel·lulòsica; però, malauradament, la seva implementació és limitada degut a l'alt cost energètic.⁷

No obstant això, la natura té processos capaços de degradar els compostos lignocel·lulòsics en medis anaeròbics, molt similars al medi de la DA.^{7,8} Per exemple, la comunitat microbiana de l'estómac dels remugants (rumen) pot degradar els compostos lignocel·lulòsics que es troben en l'aliment del remugant de manera molt eficient.⁹ El contingut ruminal s'ha fet servir en experiments de laboratori com a inòcul o com a cosubstrat durant la DA de residus lignocel·lulòsics.¹⁰ Tot i així, encara no és clar quins són els mecanismes que ha de seguir la DA per mantenir l'activitat dels microorganismes provinents del rumen i degradar els compostos lignocel·lulòsics.

En aquest estudi s'ha analitzat l'ús del contingut ruminal durant la DA de residus lignocel·lulòsics per esbrinar quins són els mecanismes clau per biodegradar els compostos lignocel·lulòsics. Els resultats s'han fet servir per al disseny d'un nou digestor anaerobi que imita el comportament del rumen per hidrolitzar de manera eficient els compostos lignocel·lulòsics.



Figura 3. Dispositiu experimental per als experiments A i B

Materials i mètodes

Experiment A: ús del contingut ruminal com a inòcul durant la digestió anaeròbica

Durant aquest experiment es van utilitzar dos inòculs. Un inòcul era l'efluent d'una planta de DA que tracta residus de menjar i fems de vaca a Lansing, Michigan (inòcul DA).¹¹ El segon inòcul era contingut ruminal obtingut d'una vaca fistulada (inòcul rumen). Com a substrats es van fer servir *Pennisetum purpureum* i fems de vaca. La *Pennisetum purpureum* és un cultiu lignocel·lulòsic energètic de segona generació collida a Waimanalo Research Station (Waimanalo, HI, EUA). Abans d'utilitzar la *Pennisetum purpureum* es va triturar a una mida de 2 mm i es va assecar fins a disminuir el contingut d'humitat a un 10%.

Per a l'experiment A es van fer servir com a digestors dos ampolles de 2 litres (figura 3).

Els digestors es van operar amb una agitació permanent a 130 rpm i a una temperatura de treball de 39 °C per simular la temperatura del rumen (*gyrotory water bath shaker g76*, New Brunswick Scientific, NJ, EUA).¹² Els digestors s'operaven de manera semicontínua; cada dia s'obrien per treure digestat i alimentar el substrat. Els dos digestors contenien 1,3 L d'inòcul. El digestor Inoc_DA va ser inoculat amb 1,3 L de l'inòcul DA i el digestor Inoc_R va ser inoculat amb 1,3 L de contingut ruminal. Ambdós digestors van utilitzar com a substrat una barreja 30:70 (en pes humit) de *Pennisetum purpureum* i fems de vaca.

Per estudiar el rendiment dels digestors es va analitzar la quantitat d'àcids carboxílics (AGV) i el pH i es va mesurar la quantitat de metà produït. Les anàlisis es van efectuar seguint els procediments estandarditzats dels *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.¹³ La comunitat microbiana dels digestors també es va analitzar mitjançant la seqüenciació de l'ARN ribosòmic 16S a través d'illumina.

Experiment B: ús del contingut ruminal com a cosubstrat durant la digestió anaeròbica

Per a aquest experiment es van operar els digestors de manera similar a l'experiment A. La diferència és que ambdós digestors es van inocular amb 1.3 L d'inòcul DA i els substrats eren diferents. Per al digestor Co_FR es va utilitzar una barreja 25:60:15 (en pes humit) de *Pennisetum purpureum*, fems de vaca i contingut ruminal. Per al Co_R es va utilitzar una barreja

85:15 (en pes humit) de *Pennisetum purpureum* i contingut ruminal. Les anàlisis químiques i microbiològiques efectuades van ser les mateixes que durant l'experiment A.

Experiment C: disseny i operació d'un digestor que simula activitat ruminal

En el rumen, la part líquida i la part sòlida tenen un temps de retenció diferent (5-20 h per a la part líquida i 20-90 h per a la part sòlida).¹² Aquesta diferència és deguda a una acumulació de partícules en el conducte estret que uneix el rumen (primer estómac) amb el reticle (segon estómac). Aquestes partícules s'acumulen en aquest passatge estret fins que la mida de partícula disminueix degut a la degradació microbiana.¹² L'acumulació d'aquestes partícules entre el rumen i el reticle crea un biofilm que és ideal per al creixement de poblacions microbianes que poden degradar la lignocel·lulosa.¹⁴ Per simular aquest comportament natural, una malla d'acer inoxidable de 100 µm es va instal·lar a la part inferior del digestor, fet que va permetre el desenvolupament d'un biofilm (figura 4).

Per crear el biofilm, el contingut del digestor sedimentava durant 50 minuts sobre la malla. Un cop el biofilm és creat, una bomba peristàltica suciona el contingut del digestor cap a fora i a través del biofilm durant 2 minuts. En aquest cas, el biofilm es comporta com a membrana fent que el digestor operi a diferents temps de residència per al líquid (12 h) i el sòlid (60 h). Per evitar la saturació de la membrana, el contingut del digestor s'agita amb una vareta d'agitació equipada amb un raspall durant 8 minuts per trencar el biofilm. El digestor es va inocular amb 6 L de contingut ruminal i es va alimentar diàriament amb residus de menjar obtinguts al menjador de la Universitat de Michigan. Per tal de poder mantenir la comunitat microbiana del rumen, el pH es va controlar a 6,3.¹² Es van efectuar les mateixes anàlisis químiques i microbiològiques realitzades durant l'experiment A i B. A més a més, es va analitzar la quantitat de lignocel·lulosa a l'aliment i a l'efluent del digestor per estudiar la degradació.

Resultats i discussió

Experiment A: els bacteris del rumen acceleren la hidròlisi però desapareixen amb el temps

Durant els primers dies de l'experiment A, el digestor Inoc_Rumen presentava un pH molt baix (5.5-6.5) (figura 5).



Figura 4. Digestor que imita el comportament del rumen

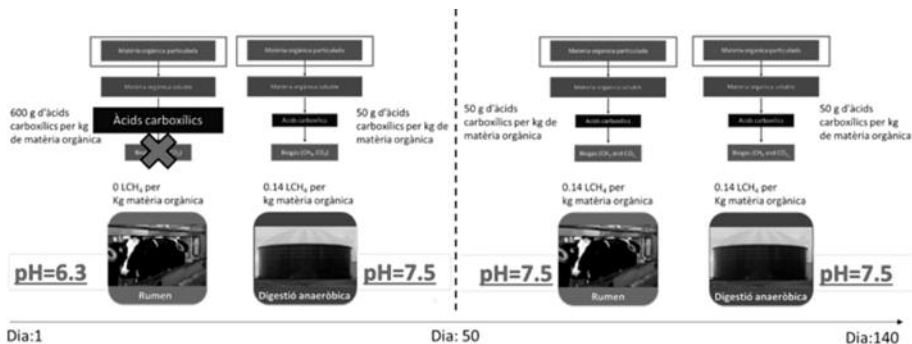


Figura 5. Evolució de l'experiment A

Es va intentar augmentar el pH mitjançant l'addició d' NH_4HCO_3 , però el pH disminuïa al cap d'un o dos dies d'afegir-hi NH_4HCO_3 . Durant aquest període la producció de biogàs en Inoc_Rumen era nul·la i la concentració d'àcids carboxílics era molt elevada (600 g/kg de matèria orgànica alimentada), motiu pel qual el pH del sistema disminuïa constantment. El digestor Inoc_DA no presentava inestabilitats, el pH era de 7,5, la concentració d'àcids carboxílics era de només 60 g/kg de matèria orgànica alimentada i produïa 0,14 L CH_4 /kg de matèria orgànica alimentada. Durant els dies següents (50-140), el pH al digestor Inoc_Rumen va augmentar i es va situar en 7,5, i la concentració d'àcids carboxílics va disminuir i la producció de biogàs va augmentar.

Quan es va analitzar la comunitat microbiana es va poder veure que Inoc_Rumen tenia microorganismes del rumen durant els 50 primers dies. Entre ells hi havia el bacteri *Fibrobacter*, un bacteri important per a la hidròlisi de la lignocel·lulosa. El fet de tenir bacteris hidrolítics accelerava les etapes d'hidròlisi i de fermentació, i les feia més ràpides que la metanogènesi. Degut a això, els àcids carboxílics s'acumulaven al sistema, fet que feia disminuir el pH i inhibir la producció de biogàs. Amb el temps, aquesta població de bacteris hidrolítics va disminuir i va ser completament substituïda per una nova comunitat microbiana desenvolupada a partir de les condicions del digestor (diferents de les del rumen) i de l'addició contínua de fems de vaca i *Pennisetum purpureum*. Com que ambdós digestors operaven de manera similar, la comunitat microbiana

en Inoc_Rumen i Inoc_DA era molt similar i no hi havia la presència de bacteris hidrolítics.

Conclusió: quan el contingut ruminal s'utilitza com a inòcul, la hidròlisi s'accelera només durant els primers 50 dies. Després, els bacteris hidrolítics desapareixen del sistema.

Experiment B: els microorganismes del rumen només s'activen a pH baixos (6,0)

En aquest experiment el contingut ruminal es va utilitzar com a cosubstrat per poder incorporar els bacteris hidrolítics i accelerar la hidròlisi de manera contínua. No obstant això, Co_R i Co_FR tenien la mateixa producció de biogàs i no hi havia indicis d'una acceleració de l'etapa hidrolítica (figura 6).

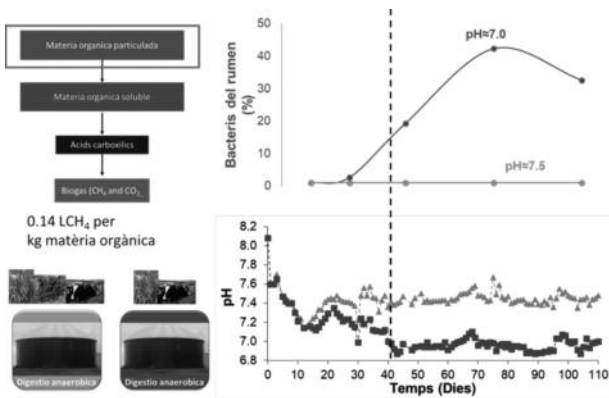


Figura 6. Resum dels resultats de l'experiment B

L'única diferència entre els dos digestors era que el pH a Co_R disminuïa contínuament. Per tal de mantenir el pH al voltant de 7 i no inhibir el sistema, s'hi va afegir NH₄HCO₃ diàriament. El contingut ruminal és un cosubstrat àcidic i els fens de vaca són un cosubstrat amb una capacitat de *buffer* alta que permet mantenir el pH entre 7 i 8. Per aquesta raó, el pH només disminuïa a Co_R.

Amb les anàlisis de la comunitat microbiana es va poder veure que el percentatge de bacteris provinent del contingut ruminal augmentava en Co_R mentre el pH disminuïa. Co_FR tenia un pH de 7,5, ideal per a la producció de biogàs però no per al desenvolupament de bacteris provinent del rumen. El pH del

Bibliografia

- (1) HOORNWEG, D.; BHADA-TATA, P. "What a Waste: A Global Review of Solid Waste Management". *World Bank, Washing. DC* 2012.
- (2) BECKER, A. M.; YU, K.; STADLER, L. B.; SMITH, A. L. "Co-Management of Domestic Wastewater and Food Waste: A Life Cycle Comparison of Alternative Food Waste Diversion Strategies". *Bioresour. Technol.* 2017, 223, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.031>.
- (3) MATA-ÁLVAREZ, J.; DOSTA, J.; ROMERO-GUÍZA, M. S.; FONOLL, X.; PECES, M.; ASTALS, S. A. "Critical Review on Anaerobic Co-Digestion Achievements between 2010 and 2013". *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2014, 36. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.039>.
- (4) SURENDRA, K. C.; SAWATDEENARUNAT, C.; SHRESTHA, S.; SUNG, S.; KHANAL, S. K. "Anaerobic Digestion-Based Biorefinery for Bioenergy and Biobased Products." *Ind. Biotechnol.* 2015, 11 (2), 103–112. <https://doi.org/10.1089/ind.2015.0001>.
- (5) APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGRÈVE, J.; DEWIL, R. "Principles and Potential of the Anaerobic Digestion of Waste-Activated Sludge". *Prog. Energy Combust. Sci.* 2008, 34 (6), 755–781. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>.
- (6) European Biogas Association. EBA Statistical Report 2017 <http://european-biogas.eu/2017/12/14/eba-statistical-report-2017-published-soon/> (accessed Feb 7, 2018).
- (7) SHRESTHA, S.; FONOLL, X.; KHANAL, S.; RASKIN LUTGARDE. "Biological Strategies for Enhanced Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass during Anaerobic Digestion: Current Status and Future Perspectives". *Bioresour. Technol.* 2017, 245, 1245–1257.
- (8) BAYANÉ, A.; GUIOT, S. R. "Animal Digestive Strategies versus Anaerobic Digestion Bioprocesses for Biogas

rumen és d'entre 5,5 i 6,5, un pH que no és compatible amb la producció de biogàs.¹² Co_R tenia un pH de 7,0, que és molt a prop del pH òptim per als bacteris del rumen. No obstant això, el fet que el pH estigués fora del rang de 5,5-6,5 permetia que els bacteris hi fossin presents però no estiguessin actius, i l'etapa hidrolítica no es va accelerar.

Conclusió: quan el contingut ruminal s'utilitza com a cosubstrat, els bacteris hidrolítics només acceleren la hidròlisi a pH si estan al voltant de 6,0.

Experiment C: canvi d'estratègia. Disseny i operació d'un digestor que simula activitat ruminal per a la producció de productes químics

El fet que els bacteris hidrolítics del rumen necessitin un pH inferior a 6,5 per créixer fa que no sigui possible utilitzar-los en un digestor anaerobi per degradar compostos lignocel·lulòsics i produir biogàs. Llavors, per poder degradar eficientment els compostos lignocel·lulòsics i recuperar la majoria de l'energia continguda en els residus orgànics, és preferible utilitzar la DA per produir productes químics com els àcids carboxílics. L'efluent de la DA amb una alta concentració en àcids carboxílics pot introduir-se en un altre procés per a la producció d'àcid caproic. L'àcid caproic s'utilitza com a agent antimicrobià, com a additiu alimentari per als animals o per a la producció de biocombustibles. Produir àcid caproic pot ser fins i tot més beneficiós que produir biogàs perquè els preus de l'àcid caproic són molt alts (1,88 and 2,09 €/kg).¹⁵ Amb motiu d'aquest experiment es va decidir dissenyar un nou tipus de digestor que imités el rumen per poder fer créixer els bacteris hidrolítics del rumen i produir un efluent amb una alta concentració d'àcids carboxílics. El digestor va treballar de manera semicontínua durant 110 dies. Al voltant del 60% de la matèria lignocel·lulòsica va ser degradada durant el procés, un valor bastant alt especialment en comparació amb el rumen en què un 25-60% de la matèria lignocel·lulosa es degrada.¹² A més a més, el 60% de la comunitat microbiana eren microorganismes que es troben també en el rumen. Un dels bacteris presents era el bacteri hidrolític *Fibrobacter*. Aquestes condicions van permetre que el 40% de la matèria orgànica es convertís en àcids carboxílics. Altres sistemes de fermentació poden arribar a convertir el 40% de la matèria orgànica en àcids carboxílics. No obstant això, el digestor dissenyat durant aquest projecte pot fer-ho el doble de ràpid gràcies a la

presència de bacteris hidrolítics. Això implica una disminució de costos de capital i que no es requereixi una gran àrea per a la instal·lació d'un digestor, un factor important per a Andorra, on el terreny és limitat.

Conclusió

La utilització de microorganismes del rumen per accelerar la hidròlisi i produir biogàs en un digestor anaerobi no és possible. Els microorganismes hidrolítics del rumen només poden treballar en un pH al voltant de 6,3, condicions que inhibeixen els microorganismes responsables de la producció de biogàs. El disseny i operació d'un digestor que imita el rumen va permetre la degradació del 60% de la matèria lignocel·lulòsica i la transformació del 40% de la matèria orgànica en àcids carboxílics. Aquest digestor es pot utilitzar com a precursor per a la producció de biogàs o d'altres productes com l'àcid caproic, un *commodity* d'alt interès industrial. El digestor es va operar amb un temps de residència hidràulic de 12 hores, molt més baix que el de la DA (mínim de 15 dies). Per tant, la instal·lació del digestor que imita el rumen necessitaria menys àrea i presentaria un cost d'instal·lació més baix que un digestor anaerobi per a la producció de biogàs.

Agraiments

Part d'aquest projecte va ser finançat per la Fundació Crèdit Andorrà.

Production from Lignocellulosic Biomass". *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 2011, 10 (1), 43–62. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9209-4>.

(9) YUE, Z.-B.; LI, W.-W.; YU, H.-Q. "Application of Rumen Microorganisms for Anaerobic Bioconversion of Lignocellulosic Biomass". *Bioresour. Technol.* 2013, 128, 738–744. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.073>.

(10) FONOLL, X.; MEUWISSEN, T.; ALEY, L.; SHRESTHA, S.; RASKIN, L. "Development of Dynamic Membrane Bioreactor Based on Rumen Physiology for Efficient Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass". In *In IWA 16th Anaerobic digestion conference*; 2019.

(11) ADREC MSU digester <https://www.egr.msu.edu/bae/adrec/> (accessed May 12, 2017).

(12) McDONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D.; MORGAN, C. A.; SINCLAIR, L. A.; WILKINSON, R. G. *Animal Nutrition*, Seventh.; Benjamin-Cummings Publishing Company, 2010.

(13) APHA; AWWA; WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd ed.; Washington DC, 2012.

(14) MASON, P. M.; STUCKEY, D. C. "Biofilms, Bubbles and Boundary Layers – A New Approach to Understanding Cellulolysis in Anaerobic and Ruminant Digestion". *Water Res.* 2016, 104, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.063>.

(15) MOSCOVIZ, R.; TRABLY, E.; BERNET, N.; CARRÈRE, H. *The Environmental Biorefinery: State of the Art on the Production of Hydrogen and Value-Added Biomolecules in Mixed-Culture Fermentation*. 2018. <https://doi.org/10.1039/c8gc00572a>.