

## OTRZYMYWANIE BIOWODORU Z ODPADÓW LIGNOCELULOZOWYCH

**Edyta Słupek<sup>a</sup>, Karolina Kucharska<sup>a</sup>, Marian Kamiński<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Katedra Inżynierii Procesowej i Technologii Chemicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk*

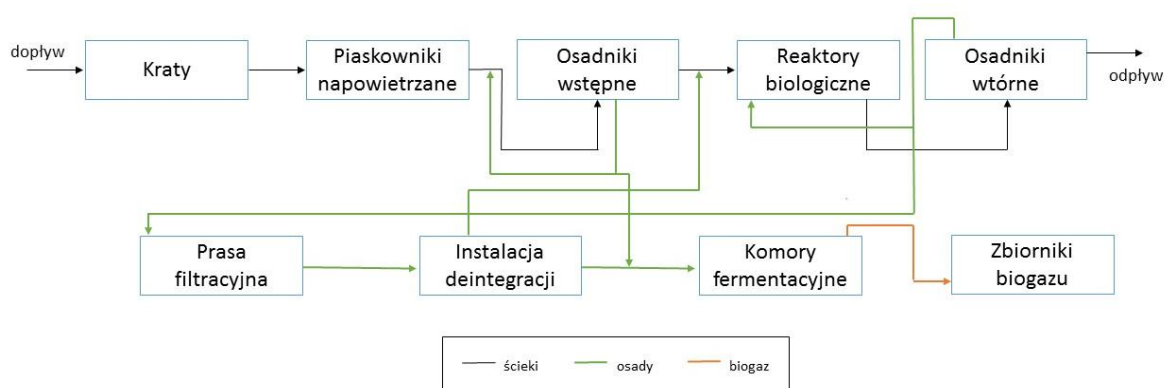
[edyta.slupek@pg.edu.pl](mailto:edyta.slupek@pg.edu.pl)

Słowa kluczowe: odpady lignocelulozowe, fermentacja ciemna, inoculum, biowodór

### 1. WPROWADZENIE

Energia elektryczna obecnie jest przede wszystkim wytwarzana na drodze spalania węgla, ciężkiego oleju opałowego z ropy naftowej lub gazu ziemnego, które są nieodnawialnymi źródłami energii. Globalne zapotrzebowanie oraz zużycie energii wzrasta w tempie 2-3% rocznie. Dlatego poszukuje się alternatywnych odnawialnych surowców o szczególnym znaczeniu w wytwarzaniu biopaliw [1]. Alternatywne biopaliwo kwalifikuje się jako opłacalne jeżeli zapewnia poprawę stanu środowiska (zmniejsza emisję gazów cieplarnianych do atmosfery), a także odznacza się wysokim potencjałem produkcji (w tym dodatkowych użytecznych związków chemicznych), co łączy się z ekonomicznymi korzyściami [2]. Odpady lignocelulozowe stanowią surowiec ciągle dostępny bądź szybko odnawiający się. Przykładem odpadów są pozostałości rolnicze, odpady leśne, stałe odpady komunalne oraz inne odpady przemysłowe [3].

Energia wytwarzana z odpadów w tym lignocelulozowych, powinna mieć coraz większe znaczenie w aspekcie pozyskiwania biopaliw drugiej generacji w postaci biopaliw ciekłych (etanol) oraz gazowych (biowodór, biometan), szczególnie w powiązaniu z procesami biorafinacji. Do dnia dzisiejszego nie opracowano efektywnej, ciągłej oraz opłacalnej technologii przemysłowej, w której przetwarza się odpady lignocelulozowe w biopaliwa. W procesach konwersji odpadów lignocelulozowych wyróżnia się trzy najistotniejsze etapy. Pierwszy z nich polega na obróbce wstępnej odpadów, drugi natomiast na hydrolizie polisacharydów zawartych w materiale odpadowym. Ostatni etap to proces uwalniania cukrów prostych oraz fermentacja z wykorzystaniem różnych kultur bakterii (fermentacja alkoholowa lub ciemna) [5–8].



Rys.1. Schemat poglądowy części oczyszczalni Saur Neptun Gdańsk według [4].

Przykładem wytwarzania biopaliw z odnawialnych surowców odpadowych jest Elektrociepłownia Biogazowa znajdująca się na terenie Gdańskiej Oczyszczalni Ścieków. Efektem realizowanej tam fermentacji metanowej jest wykorzystanie odpowiedniej grupy bakterii auto- i heterotroficznych, które przekształcają związki organiczne zawarte w odpadach lignocelulozowych w biogaz (65% metanu, 30% dwutlenku węgla oraz ok. 5% wodoru, azotu i siarkowodoru) [9]. Na rysunku 1. przedstawiono poglądowy schemat części instalacji technologicznej oczyszczalni wschód, znajdującej się na terenie Saur Neptun Gdańsk – oczyszczalnia ścieków komunalnych z terenów aglomeracji Gdańska, Sopotu oraz gmin sąsiednich [4].

Celem pracy było przeprowadzenie fermentacji ciemnej z wykorzystaniem różnych odpadów lignocelulozowych (procesy rzeczywiste) oraz wykorzystując glukozę (proces modelowy). W procesach zastosowano inoculum składające się z czystych kultur bakterii *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Otrzymane wartości wydajności biowodoru (badania własne), porównano z wartościami wydajności otrzymanymi w literaturze (gdzie jako inoculum wykorzystywano osad nadmierny - mieszane kultury bakterii) [7,8].

## 2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### 2.1. Odpady lignocelulozowe

Badanymi odpadami lignocelulozowymi były słoma pszeniczna, kolby kukurydzy oraz trawa polna. Powyższe odpady zebrano latem 2016r. w okolicach Wejherowa, w północnej części Polski. Odpady lignocelulozowe poddano suszeniu (w temperaturze pokojowej) oraz wstępnie rozdrobniono za pomocą rozdrabniacza ogrodowego (Mec Tools, Skara, Szwecja). Wstępnie rozdrobnione odpady lignocelulozowe zmielono za pomocą młyna ZM 200 (RETCHE, Haan, Niemcy) stosując średnicę oczek 0,75 mm. Materiał po zmieleniu przechowywano w zamkniętych pojemnikach w temperaturze pokojowej. W celu standaryzacji próbek wejściowych, przed dalszymi etapami obróbki wstępnej materiał suszono w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 105 °C przez 4 godziny, a następnie przechowywano w ekcykatorze z substancją suszącą (granulat NaOH). Materiał poddano dwuetapowej obróbce wstępnej w optymalnych warunkach: hydroliza zasadowa (6% NaOH, 6h, 65 °C); hydroliza enzymatyczna (95% Viscozyme L, 5% β-Glukozydaza, 24h, 37 °C) [5]. Otrzymany hydrolizat z odpadów lignocelulozowych wykorzystano jako wsad cukrowy w fermentacji ciemnej.

### 2.2. Fermentacja ciemna

Biowódór otrzymywano w procesie fermentacji ciemnej, w którym zastosowano inoculum w formie czystych mikroorganizmów *Enterobacter aerogenes* ATCC 13029. Proces prowadzono w sterylnych 1200 ml szklanych bioreaktorach (przygotowanych we własnym zakresie), wykorzystując jako objętość roboczą 1000 ml. Początkowy skład brzezki fermentacyjnej posiadał stężenie cukrów redukujących (TRS) na poziomie 5,5 g/L. Do celów fermentacji zastosowano hydrolizaty z odpadów lignocelulozowych, uzyskane w optymalnych warunkach opisanych w pracy [10]. Wartość pH brzezki fermentacyjnej doprowadzono do 7,00 za pomocą 1 M NaOH (pH = 7,0 ± 0,1 - system kontroli pH przygotowany we własnym zakresie).

Każdy bioreaktor zaszczipiono 100 ml czystych hodowli bakterii *Enterobacter aerogenes* ATCC 13029 (Selectrol TCS Biosciences Ltd.) propagowanych w jałowym roztworze Thioglycollate Broth Alternative (Biomaxima). Warunki anaerobowego wzrostu *Enterobacter aerogenes* w bioreaktorze wytworzono poprzez azotowanie reaktorów do osiągnięcia stężenia tlenu 0,1 mg O<sub>2</sub>/L. Wartości robocze fermentacji ciemnej: temperatura

37 °C, szybkość mieszania 320 obr./min. Eksperyment prowadzono w trzech powtórzeniach przez 72 godziny.

### 2.3. Metody analityczne

#### 2.3.1. Oznaczanie cukrów

Zawartości sacharydów określano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*ang. high-performance liquid chromatography* – HPLC - warunki wymiany ligandów) z kolumną Rezex Pb<sup>2+</sup> (300x7,8mm, 8µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) i detektorem RID (Knauer, Berlin, Niemcy). Jako eluent stosowano wodę o natężeniu przepływu 0,6 ml/min. [11].

#### 2.3.2. Oznaczanie gazów

Skład biogazów oznaczono za pomocą chromatografu gazowego (Perkin-Elmer AutoSystem XL) z kolumną (6,5m x 1/8”) typu pakowana - wypełnioną Porapakem Q (100-120 mesh (PPQ)), ciśnienie na wlocie 200 kPa) w temperaturze termostatu 60 °C. W badaniach wykorzystano detektor ciepło-przewodnościowy (TCD) o temperaturze 100 °C. Jako gaz nośny stosowano azot z płaszcza zbiornika z ciekłym azotem o wysokiej czystości (przepływ azotu 30 ml/min.). Objętość dozowanej próbki gazowej wynosiła 0,2 ml; czas rozdzielania 15 minut; wykorzystano oprogramowanie Turbochrom.

## 3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

W Tabeli 1. przedstawiono początkowe wartości stężeń cukrów redukujących (TRS – *ang. Total Reducing Sugars*). Stężenie TRS oznaczono po przeprowadzeniu dwóch etapów konwersji odpadów lignocelulozowych (hydroliza zasadowa oraz enzymatyczna) [5]. TRS w brzeczkach fermentacyjnych ustalono na poziomie 5,5 g/L.

Tabela 1. Zmiana wartości TRS podczas fermentacji ciemnej dla glukozy oraz rzeczywistych hydrolizatów materiałów lignocelulozowych.

| Źródło węgla                   | Czas [h] | Stężenie TRS [g/L] |         |         |
|--------------------------------|----------|--------------------|---------|---------|
|                                |          | Dwucukry           | Heksozy | Pentozy |
| Glukoza                        | 0        | 0,00               | 5,50    | 0,00    |
|                                | 72       | 0,00               | 0,00    | 0,00    |
| Kolby kukurydzy<br>hydrolizat  | 0        | 0,12               | 4,91    | 0,47    |
|                                | 72       | 0,02               | 0,00    | 0,08    |
| Słoma pszeniczna<br>hydrolizat | 0        | 0,16               | 4,69    | 0,65    |
|                                | 72       | 0,04               | 0,00    | 0,00    |
| Trawa polna<br>hydrolizat      | 0        | 0,07               | 4,58    | 0,85    |
|                                | 72       | 0,00               | 0,00    | 0,00    |

Proces fermentacji ciemnej przeprowadzono jako proces modelowy (całkowite stężenie cukrów redukujących TRS - 5,5 g/L czystej glukozy) oraz procesy rzeczywiste (całkowite stężenie cukrów redukujących TRS - zależne od rodzaju odpadu

lignocelulozowego (Tabela 1.)). W trakcie trwania fermentacji ciemnej objętość powstającego biowodoru kontrolowano oraz oznaczano za pomocą GC (Tabela 2.).

Tabela 2. Zmiany objętości biowodoru wytwarzanego w fermentacji ciemnej dla glukozy oraz różnych materiałów odpadowych.

| Czas [h] | Objętość biowodoru [ml] |                 |                  |             |
|----------|-------------------------|-----------------|------------------|-------------|
|          | Glukoza                 | Kolby kukurydzy | Słoma pszeniczna | Trawa polna |
| 0        | 0,0                     | 0,0             | 0,0              | 0,0         |
| 72       | 256,2                   | 159,0           | 190,5            | 66,6        |

Otrzymane wydajności biowodoru porównano z wynikami literaturowymi, gdzie procesy fermentacji ciemnej przeprowadzono jako procesy modelowe [7,8] o całkowitym stężeniu cukrów redukujących wynoszących 10 g/L. Jako inoculum wykorzystywano hodowlę bakterii w postaci osadu nadmiernego (ścieki z Darvill - Pietermaritzburg, Południowa Afryka). Inoculum tego typu to szlam bogaty w proste węglowodany, disacharydy i peptydy. Wytworzenie biowodoru jako głównego składnika gazu w fermentacji ciemnej z wykorzystaniem osadów ściekowych wymaga obróbki wstępnej tego typu inoculum. Obróbka wstępna osadu nadmiernego eliminuje mikroorganizmy wykorzystujące wodór w procesach metabolicznych (szczególnie metanogeny). Tabela 3. przedstawia metody obróbki wstępnej osadu nadmiernego [7,8].

Tabela 3. Warunki obróbki wstępnej osadu nadmiernego opisane w projektach RSM (metody powierzchni odpowiedzi - ang. *Response Surface Methodology*).

| Nr. | Optymalizacja                    | Skrót | Parametr 1 | Parametr 2         | Parametr 3    | Pub. |
|-----|----------------------------------|-------|------------|--------------------|---------------|------|
| 1   | Central Composite Designer (CCD) | PHA   | pH         | Autoklaw           |               | [8]  |
|     |                                  |       |            | Czas               | -             |      |
| 2   | Box-Behnken                      | PHS   | pH         | Szok temperaturowy |               |      |
|     |                                  |       |            | Czas               | Różnica temp. |      |
| 3   | Box-Behnken                      | PHMW  | pH         | Fale mikrofalowe   |               | [7]  |
|     |                                  |       |            | Czas               | Intensywność  |      |

W pracach [7,8] procesy fermentacji ciemnej prowadzono w temperaturze 35 °C w łaźni wodnej z wytrząsaniem 150 obr./min. Eksperyment prowadzono przez 72 godziny z pH = 6,5. Obróbkę wstępną inoculum wykorzystano optymalizując parametry:

- pH i czas autoklawowania (PHA),
- pH i szok temperaturowy (czas, różnica temperaturowa) (PHS),
- pH i fale mikrofalowe (czas trwania, intensywność mikrofal) (PHMW).

W Tabeli 4. przedstawiono wydajności otrzymanego biowodoru podczas fermentacji ciemnej z wykorzystaniem czystych kultur bakterii (badania własne) oraz z zastosowaniem osadu nadmiernego [7,8]. Zamieszczono również dokładne parametry obróbki wstępnej odpadów lignocelulozowych oraz inoculum.



Tabela 4. Porównanie wydajności biowodoru.

| Lp. | Materiał<br>(Źródło<br>węgla) | Obróbka wstępna  |  | Rodzaj<br>kultury<br>bakterii                      | Wydajność<br>biowodoru            |      | Pub.              |
|-----|-------------------------------|--|--|--|-----------------------------------|------|-------------------|
|     |                               | Materiału  | Inoculum   |  | [mol H <sub>2</sub> /<br>mol TRS] | [%]  |                   |
| 1   | Glukoza                       | -  | Propagacja<br>czystych<br>kultur<br>bakterii,<br>sterylizacja<br>pożywek | <i>Enterobacter<br/>aerogenes</i><br>ATCC<br>13029 | 1,81                              | 67,0 | Badania<br>własne |
| 2   | Kaczany<br>kukurydzy          | Hydroliza<br>zasadowa:<br>6% NaOH,<br>6h, 65°C             |  |  | 1,12                              | 41,5 |                   |
| 3   | Słoma<br>pszeniczna           | Hydroliza<br>enzymatyczna:<br>(95%<br><i>Viscozyme L</i> , |  |  | 1,34                              | 49,6 |                   |
| 4   | Trawa<br>polna                | 5% β-<br>Glukozydaza)<br>24h, 37 °C                        |  |  | 0,46                              | 17,0 |                   |
| 5   | Glukoza                       | -  | pH = 8,93<br>Autoklaw<br>15 min  | Osad<br>nadmierny                                  | 0,98                              | 36,3 | [8]               |
| 6   | Glukoza                       |  | pH = 8,36<br>Szok temp.<br>89°C, 68 min                                  |  | 0,65                              | 24,1 |                   |
| 7   | Glukoza                       |  | pH = 11,0<br>Fale<br>mikrofalowe<br>2 min.,<br>860W                      |  | 1,45                              | 53,7 |                   |

Teoretyczną wydajność biowodoru można obliczyć z równania 1 (ciemna fermentacja glukozy).



W warunkach stechiometrycznych na jeden mol glukozy przypadają 4 mole wodoru. W praktyce, w procesie fermentacji ciemnej powstaje ok. 1-2,7 mola wodoru. Jest to spowodowane jednoczesnym powstawaniem kwasu masłowego, który obniża produktywność biowodoru [12,13]. Procentowe wartości wydajności fermentacji ciemnej uwzględniono w Tabeli 4.

#### 4. WNIOSKI

Badania wykazały, że odpady lignocelulozowe typu słoma pszeniczna, kaczany kukurydzy czy trawa polna, są materiałami przydatnymi do wytwarzania biopaliwa drugiej generacji (biowodoru). Uzyskano wyniki wydajności biowodoru zbliżone do wyników przeprowadzanych w procesach modelowych. W przypadku wykorzystania odpadów pochodzących ze słomy pszenicznej otrzymano wydajności na poziomie 1,34 mol H<sub>2</sub>/mol TRS, niższe wartości otrzymano dla odpadów z kaczanów kukurydzy (1,12 mol H<sub>2</sub>/mol TRS), natomiast znacznie mniejsze wykorzystując trawę polną (0,46 mol H<sub>2</sub>/mol TRS).





Wydajność biowodoru otrzymanego z przeprowadzonego procesu fermentacji ciemnej z wykorzystaniem czystych kultur bakterii (1,81 mol H<sub>2</sub> / mol glukozy) jest wyraźnie wyższa niż z zastosowaniem osadu nadmiernego poddanego obróbce wstępnej. Uwzględniając koszty oraz energię zużytą podczas wytworzenia biowodoru, najkorzystniejszą metodą okazuje się obróbka inoculum z wykorzystaniem mikrofal (PHMW - 1,45 mol H<sub>2</sub>/mol glukozy) w porównaniu z tradycyjnym ogrzewaniem.

*Badania sfinansowano w ramach grantu „Badania hydrolizy biomasy lignocelulozowej oraz warunków konwersji produktów do biogazów” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki na podstawie umowy nr UMO-2014/13/ST8/04258.*

## LITERATURA

- [1] Łukajtis R, Hołowacz I, Kucharska K, Glinka M, Rybarczyk P, Przyjazny A, et al. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renew Sustain Energy Rev* 2018. doi:10.1016/j.rser.2018.04.043.
- [2] Bansal A, Illukpitiya P, Tegegne F, Singh SP. Energy efficiency of ethanol production from cellulosic feedstock. *Renew Sustain Energy Rev* 2016;58:141–6. doi:10.1016/j.rser.2015.12.122.
- [3] Cardona Alzate CA, Sánchez Toro OJ. Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. *Energy* 2006;31:2111–23. doi:10.1016/j.energy.2005.10.020.
- [4] Gda SN. Oczyszczalnia Wschód n.d.
- [5] Łukajtis R, Kucharska K, Hołowacz I, Rybarczyk P, Wychodnik K, Słupek E, et al. Comparison and Optimization of Saccharification Conditions of Alkaline Pre-Treated Triticale Straw for Acid and Enzymatic Hydrolysis Followed by Ethanol Fermentation. *Energies* 2018. doi:10.3390/en11030639.
- [6] Łukajtis R, Rybarczyk P, Kucharska K, Konopacka-Łyskawa D, Słupek E, Wychodnik K, et al. Optimization of saccharification conditions of lignocellulosic biomass under alkaline pre-treatment and enzymatic hydrolysis. *Energies* 2018. doi:10.3390/en11040886.
- [7] Faloye FD, Gueguim Kana EB, Schmidt S. Optimization of biohydrogen inoculum development via a hybrid pH and microwave treatment technique - Semi pilot scale production assessment. *Int J Hydrogen Energy* 2014;39:5607–16. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.01.163.
- [8] Faloye FD, Gueguim Kana EB, Schmidt S. Optimization of hybrid inoculum development techniques for biohydrogen production and preliminary scale up. *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:11765–73. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.06.129.
- [9] Pham et al. Validation and recommendation of methods to measure biogas production potential of animal manure. *Asian-Australas J Anim Sci* 2013;26:864–73. doi:10.5713/ajas.2012.12623.
- [10] Łukajtis R, Rybarczyk P, Kucharska K, Konopacka-Łyskawa D, Słupek E, Wychodnik K, et al. Optimization of saccharification conditions of lignocellulosic biomass under alkaline pre-treatment and enzymatic hydrolysis. *Energies* 2018;11. doi:10.3390/en11040886.
- [11] Sluiter a, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of Extractives in Biomass Laboratory Analytical Procedure ( LAP ) Issue Date : 7 / 17 / 2005 Determination of Extractives in Biomass Laboratory Analytical Procedure ( LAP ). *Natl Renew Energy Lab* 2005;12. doi:NREL/TP-510-42619.
- [12] Yokoi H, Tokushige T, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y. H<sub>2</sub> production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol Lett* 1998;20:143–7. doi:10.1023/A:1005372323248.
- [13] Kucharska K, Hołowacz I, Konopacka-Łyskawa D, Rybarczyk P, Kami M. Key issues in modeling and optimization of lignocellulosic biomass fermentative conversion to gaseous biofuels. *Renew Energy* 2018;129:384–408. doi:10.1016/j.renene.2018.06.018.