

**Biorafineryjne
wytwarzanie paliw
alternatywnych
– uwarunkowania
procesowe**



Monografia wchodzi w skład serii wydanej w ramach Programu Strategicznego Narodowego Centrum Badań i Rozwoju pn. *Zaawansowane technologie pozyskiwania energii*. Zadanie Nr 4
Opracowanie zintegrowanych technologii wytwarzania paliw i energii z biomasy, odpadów rolniczych i innych koordynowanego przez Instytut Maszyn Przepływowych im. Roberta Szewalskiego Polskiej Akademii Nauk w Gdańsku

Biorafineryjne wytwarzanie paliw alternatywnych – uwarunkowania procesowe

pod redakcją
Michała K. Łuczyńskiego
i Janusza Gołaszewskiego



Kolegium Wydawnicze UWM
Przewodniczący
ZBIGNIEW CHOJNOWSKI

Recenzenci
MAREK KUŁAŻYŃSKI, MARCIN ŁUKASZEWCZ

Zespół autorów (w obrębie instytucji kolejność alfabetyczna)
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie: MACIEJ GÓRA, BARTŁOMIEJ KOZIK
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN w Krakowie:
ZBIGNIEW ADAMCZYK, DOROTA DRONKA-GÓRA, KRZYSZTOF JAMROZY, MALGORZATA NATTICH-RAK
Politechnika Warszawska: KATARZYNA DĄBKOWSKA, MACIEJ PILAREK, KRZYSZTOF W. SZEWczyk
Politechnika Gdańsk: MILENA JABŁOŃSKA, MAREK LIEDER, MARIA RYBACZYK, MARCIN SOLSKI
Instytut Chemii i Techniki Jadrowej w Warszawie: MAGDALENA ANTONIAK, DAGMARA CHMIELEWSKA,
MICHAŁ DUBIEL, URSZULA GRYCZKA, WOJCIECH MIGDAL
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu: ANDRZEJ BIAŁOWIEC, JAKUB PULKA
Państwowy Instytut Motoryzacyjny w Warszawie: ARTUR MAŁINOWSKI
Instytut Maszyn Przepływowych im. Roberta Szewalskiego PAN w Gdańsku:
ŁUKASZ HEDA, DARIUSZ KARDAŚ, PAWEŁ KAZMIERSKI, MAREK KLEIN, MAREK RZADKIEWICZ
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie: WŁODZIMIERZ BEDNARSKI, MARCIN DĘBOWSKI,
JANUSZ GOŁASZEWSKI, JAROSŁAW GONERA, MICHAŁ JANULIN, NATALIA KORDALA,
MIROSŁAW KRZEMIENIEWSKI, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA, MICHAŁ K. ŁUCZYŃSKI, RYSZARD MICHALSKI,
BOGUSŁAW PIEROZYŃSKI, MAGDALENA ŚWIATEK, KAROLINA ŚWIATEK, DARIUSZ WIŚNIEWSKI,
MARCIN ZIELIŃSKI

Redaktorzy naukowi
MICHAŁ K. ŁUCZYŃSKI, JANUSZ GOŁASZEWSKI

Opracowanie wydawnicze
ELŻBIETA PIETRASZKIEWICZ

Przygotowanie okładki
ADAM GŁOWACKI
na podstawie projektu Mirosława Sawczaka

Skład i łamanie
URSZULA TRZECIECKA

ISBN 978-83-8100-036-9

© Copyright by Wydawnictwo UWM • Olsztyn 2015

Wydawnictwo UWM
ul. Jana Heweliusza 14, 10-718 Olsztyn
tel. 89 523 36 61, fax 89 523 34 38
www.uwm.edu.pl/wydawnictwo/
e-mail: wydawca@uwm.edu.pl

Ark. wyd. 18,44; ark. druk. 15,75
Druk: Zakład Poligraficzny UWM w Olsztynie, zam. nr 589

Spis treści

1. Wprowadzenie do monografii – wytwarzanie nośników energii w procesach biorafineryjnych

Janusz Gołaszewski

1.1. Struktura monografii	11
1.1.1. Ogólne założenia procesowe wytwarzania etanolu celulozowego	11
1.1.2. Etanol celulozowy – uwarunkowania procesowe: założenia badawcze, kluczowe wnioski	15
1.1.3. Autogeneracja energii w biorafinerii lignocelulozowej: założenia badawcze, kluczowe wnioski	17
1.1.4. Furfural: założenia badawcze, kluczowe wnioski	18
1.1.5. Paliwo z glonów (bioolej): założenia badawcze, kluczowe wnioski	19
1.2. Podsumowanie	20
Literatura	20

CZĘŚĆ I. ETANOL CELULOZOWY – UWARUNKOWANIA PROCESOWE

2. Wydajność degradacji materiałów lignocelulozowych pod wpływem promieniowania jonizującego

Wojciech Migdał, Urszula Gryczka, Dagmara Chmielewska, Magdalena Antoniak,
Michał Dubiel

2.1. Wprowadzenie	23
2.2. Materiały i metody	25
2.3. Wyniki	26
2.3.1. Pomiar dozymetryczne	26
2.3.2. Analiza sitowa	27
2.3.3. Zawartość substancji rozpuszczalnych w gorącej i zimnej wodzie	28
2.3.4. Analiza termiczna	29
2.3.5. Analiza morfologiczna	30
2.3.5.1. Skaningowa mikroskopia elektronowa	30
2.3.5.2. Mikrotomografia komputerowa	31
2.3.5.3. Charakterystyka powierzchni właściwej oraz porowatości	33
2.4. Dyskusja i podsumowanie	34
Literatura	35

3. Wpływ soli nieorganicznych i środków powierzchniowo czynnych na proces wstępnej hydrolizy celulozy i materiałów lignocelulozowych

Maciej Góra, Zbigniew Adamczyk, Małgorzata Nattich-Rak, Bartłomiej Kozik,
Krzysztof Jamroży, Dorota Dronka-Góra

3.1. Wprowadzenie i cel badań	37
3.2. Aparatura i metodyka badań	37
3.3. Materiały i odczynniki	40
3.4. Wyniki pomiarów i dyskusja	41
3.4.1. Wpływ ilości dodatku soli i jej rodzaju na stopień degradacji mikrokryystalicznej celulozy	41
3.4.2. Wpływ temperatury na hydrolizę mikrokryystalicznej celulozy dla układów zawierających NaH_2PO_4 i H_3PO_4	43
3.4.3. Wyznaczenie wpływu surfaktantów jonowych i niejonowych na stopień dyspersji krystalitów celulozy	45
3.4.4. Wpływ dodatku surfaktantów na zmiany morfologii oraz właściwości fizykochemicznych celulozy	47
3.5. Rezultaty optymalizacji metody i warunków degradacji	50
3.6. Wstępna hydroliza biomasy lignocelulozowej	51
3.6.1. Warunki prowadzenia eksperymentów	51
3.6.2. Wyniki pomiarów i dyskusja	52
3.7. Podsumowanie i wnioski	53
Literatura	54

4. Obróbka wstępna w procesie hydrolizy biomasy lignocelulozowej

Marek Klein, Łukasz Heda, Paweł Kazimierski, Marek Rzadkiewicz, Dariusz Kardaś

4.1. Wprowadzenie – hydroliza biomasy	55
4.2. Wprowadzenie – metody hydrolizy biomasy	56
4.2.1. Obróbka fizyczna	56
4.2.2. Hydroliza kwasowa	56
4.2.3. Hydroliza z wodorosiarczanem wapnia	57
4.2.4. Hydroliza zasadowa	58
4.2.5. Hydroliza z wykorzystaniem nadtlenku wodoru	58
4.2.6. Hydroliza enzymatyczna	59
4.2.7. Hydroliza fizykochemiczna – eksplozja pary	60
4.3. Cel i zakres badań	61
4.4. Metodyka badawcza	61
4.4.1. Układ badawczy	61
4.4.2. Analiza zawartości cukrów	62
4.5. Część eksperimentalna	62
4.6. Wyniki	63
4.6.1. Stabilność glukozy	63
4.6.2. Hydroliza celulozy	64
4.6.3. Hydroliza robini	65
4.6.4. Hydroliza wierzby	66
4.6.5. Hydroliza ślazowca	67
4.7. Podsumowanie i wnioski	67
Literatura	68

5. Hydroliza enzymatyczna surowca lignocelulozowego

**z wierzby energetycznej (*Salix viminalis L.*) poddanego
obróbce wstępnej metodą eksplozji pary**

Katarzyna Dąbkowska, Maciej Pilarek, Krzysztof W. Szewczyk

5.1. Wprowadzenie	71
5.2. Materiały	73
5.2.1. Surowiec lignocelulozowy	73
5.2.2. Preparaty enzymatyczne	73
5.3. Metodyka badań	73
5.3.1. Hydroliza enzymatyczna surowca lignocelulozowego	73
5.3.2. Plan eksperymentów	74
5.3.3. Metody analityczne	76
5.4. Wyniki i dyskusja	76
5.4.1. Wpływ dawki preparatu Cellic® CTec2 na szybkość reakcji	77
5.4.2. Wpływ warunków prowadzenia hydrolizy na jej efektywność	77
5.4.3. Statystyczna obróbka danych doświadczalnych	82
5.4.4. Model kinetyczny badanej reakcji hydrolizy	85
5.4.5. Wpływ dawki preparatu Cellic® CTec2 na stopień przemiany	86
5.5. Wnioski	87
Literatura	88

6. Optymalizacja warunków hydrolizy enzymatycznej

substratów lignocelulozowych

Małgorzata Lewandowska, Włodzimierz Bednarski, Magdalena Świątek

6.1. Wprowadzenie	91
6.2. Metody	93
6.2.1. Surowce badawcze	93
6.2.2. Preparaty enzymatyczne	93
6.2.3. Obróbka wstępna	94
6.2.3.1. Metoda biologiczna	94
6.2.3.2. Metoda fizykochemiczna	94
6.2.3.3. Hydroliza enzymatyczna	95

6.3. Wyniki i dyskusja	95
6.4. Podsumowanie	104
Literatura	104

7. Dobór oraz doskonalenie warunków fermentacji etanolowej hydrolizatów lignocelulozowych

Małgorzata Lewandowska, Karolina Świątek, Natalia Kordala

7.1. Wprowadzenie	107
7.2. Materiał i metody	109
7.2.1. Surowce badawcze	109
7.2.2. Szczepy drożdży	109
7.2.3. Preparaty enzymatyczne	110
7.2.4. Podłożą hodowlane	110
7.2.4.1. Podłoże do prowadzenia inoculum	110
7.2.4.2. Brzeczki modelowe	110
7.2.4.3. Hydrolizat enzymatyczny syrowca lignocelulozowego pozyskanego z wierzby wiciowej	110
7.2.4.4. Zagęszczony hydrolizat biomasy lignocelulozowej pozyskanej z wierzby	111
7.2.5. Fermentacja	111
7.2.6. Symultaniczna hydroliza i fermentacja (SSF)	112
7.3. Omówienie wyników i dyskusja	112
7.4. Podsumowanie	121
Literatura	122

CZEŚĆ II. AUTOGENERACJA ENERGII W BIORAFINERII LIGNOCELULOZOWEJ

8. Katalityczne aspekty procesu elektroutleniania etanolu

Bogusław Pierożyński

8.1. Wprowadzenie	125
8.2. Metody	126
8.3. Dyskusja uzyskanych wyników	127
8.3.1. Proces utleniania etanolu na Pt w roztworze $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ H_2SO_4	127
8.3.2. Proces utleniania etanolu na Pt w roztworze $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH	130
8.3.3. Proces utleniania etanolu na kompozytowych katalizatorach CF (NiCCF)/Pd	133
8.4. Wnioski	135
Literatura	136

9. Produkcja wodoru z biomasy z użyciem mikrobiologicznego ogniw elektrolitycznego

Marek Lieder, Milena Jabłońska, Marcin Solski, Maria Rybczak

9.1. Wprowadzenie	137
9.2. Metodologia badań	145
9.3. Rozruch ogniw	151
9.4. Bioelektrolityczne wydzielanie wodoru	157
9.5. Stopień konwersji paliwa do wodoru	159
9.6. Wydajność kulombowska	159
9.7. Wydajności energetyczne	160
9.8. Praca biofilmu	162
9.9. Degradação biofilmu	163
9.10. Podsumowanie	163
Literatura	164

**10. Termiczne przetwarzanie pozostałości
z produkcji bioetanolu z biomasy lignocelulozowej**
Dariusz Wiśniewski, Jakub Pulka, Andrzej Białowiec

10.1. Wprowadzenie	169
10.2. Materiały i metody	171
10.2.1. Materiały	171
10.2.2. Przebieg eksperymentu	172
10.2.3. Analizy odpadów po produkcji bioetanolu oraz karbonizatu	173
10.3. Wyniki	174
10.3.1. Piroliza odpadów z produkcji bioetanolu	174
10.4. Podsumowanie	177
10.4.1. Zgazowanie odpadów z produkcji bioetanolu	178
Literatura	181

CZĘŚĆ III. FURFURAL

**11. Katalityczna konwersja surowca drzewnego do furfuralu
i jego waloryzacja do produktów biorafineryjnych**

Artur Malinowski

11.1. Wprowadzenie	183
11.1.1. Otrzymywanie furfuralu z surowca drzewnego	185
11.1.2. Waloryzacja furfuralu w wyniku kondensacji aldolowej z acetonom	188
11.2. Metodyka badań	189
11.3. Wyniki i dyskusja	193
11.4. Podsumowanie	197
Literatura	198

CZĘŚĆ IV. PALIWO Z GLONÓW – BIOOLEJ

**12. Możliwość wykorzystania ścieków mleczarskich
w procesie hodowli biomasy glonów olejowych**

Marcin Dębowski, Marcin Zieliński, Mirosław Krzemieniewski

12.1. Wprowadzenie	203
12.1.1. Wstęp teoretyczny	204
12.1.1.1. Wykorzystanie ścieków w procesach hodowli glonów	204
12.1.1.2. Wykorzystanie glonów w procesach produkcji biooleju	206
12.2. Metodyka badań	207
12.2.1. Pierwszy etap badań	207
12.2.2. Drugi etap badań	208
12.2.3. Trzeci etap badań	210
12.3. Wyniki	213
12.3.1. Pierwszy etap badań	213
12.3.2. Drugi etap badań	216
12.3.3. Trzeci etap badań	218
12.4. Dyskusja	223
12.5. Podsumowanie i wnioski	225
Literatura	225

**13. Wytwarzanie i badanie właściwości biodiesla otrzymanego
z oleju glonowego**

Ryszard Michalski, Jarosław Gonera, Michał Janulin

13.1. Wprowadzenie	229
13.2. Metody produkcji biopaliwa pozyskanego z oleju wytwarzanego przez glony	231
13.3. Metody badań właściwości biopaliwa pochodzącego z oleju glonowego	237
13.4. Wyniki badań właściwości paliwa pozyskanego z oleju glonowego	243
13.5. Podsumowanie	248
Literatura	249

1. Wprowadzenie do monografii

– wytwarzanie nośników energii w procesach biorafineryjnych

Janusz Gołaszewski

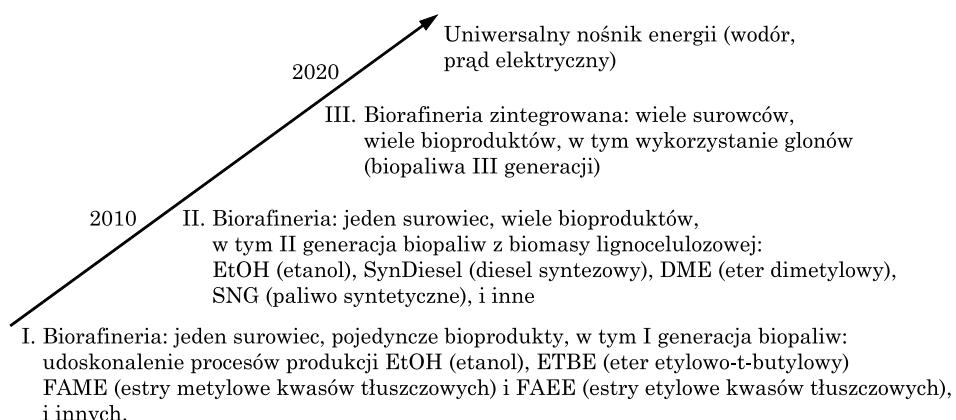
Biopaliwa i bioenergia to produkty procesów biorafineryjnych, analogicznych do procesów rafinerii petrochemicznej. Przetwórstwo biorafineryjne zakłada wieloproduktowość w efekcie pewnej kaskady szeregowych lub równoległych procesów przetwórczych. Głównym produktem biorafinerii, która jest nową instalacją przemysłu biosurowców, może być biopaliwo (np. etanol), a w dalszej kolejności inne bioprodukty (biochemikalia, biomateriały) lub też główny produkt biorafinerii może nie być energetyczny, lecz komplementarny – produkty energetyczne (biopaliwo, bioenergia). Szczególny potencjał rozwojowy przypisuje się procesom wytwarzania etanolu II generacji z biomasy lignocelulozowej pochodzącej z plantacji agroenergetycznych. Przy czym produkcja tego typu surowca nie konkuruje z uprawami roślin na cele paszowe i spożywcze, gdyż może być prowadzona na gruntach o niskiej zyznoscie (marginalnych, zdegradowanych).

Przymuje się, że wykorzystanie energii ze źródeł odnawialnych będzie się systematycznie zwiększało, a dominującym źródłem pozostanie biomasy. Jednakże udział biomasy w strukturze zużycia energii ze źródeł odnawialnych będzie malał w miarę, jak coraz większy potencjał biomasy będzie wykorzystywany na wytwarzanie produktów innych niż energia (biochemikalia, biomateriały). Współczesne wykorzystanie olejów roślinnych, ziarna zbóż i trzciny cukrowej do produkcji biopaliw ma wymiar globalny; z jednej strony sprzyja dywersyfikacji źródeł energii i poprawia bezpieczeństwo energetyczne, z drugiej – może skutkować wyczerpywaniem strategicznych zasobów żywnościowych świata. Przeznaczanie tych surowców roślinnych na cele energetyczne może powodować trudności w zbilansowaniu światowego rynku zbóż, roślin paszowych i oleistych. W przypadku produkcji bioetanolu dochodzą do tego oczywiste ograniczenia ekologiczne rozwoju technologii produkcji z tradycyjnych źródeł biomasy, kwestionowany wkład tego paliwa w redukcję emisji gazów cieplarnianych, a także mała konkurencyjność cenowa względem benzyny (Stolarski, Gołaszewski 2015).

Aktualne priorytety rozwojowe rynku biopaliw w Unii Europejskiej i na świecie są zorientowane na wykorzystanie surowca lignocelulozowego. Jest

to tradycyjne źródło energii a jego naturalnym bogatym źródłem są lasy. Jednakże w tym przypadku występują ograniczenia ekonomiczne, wynikające m.in. z długiego czasu niezbędnego do odtworzenia drzewostanu oraz wysokiej wartości przemysłowej drewna, co sprawia, że energetycznie wykorzystuje się głównie pozostałość. Istotne są też wzgłydy środowiskowe, w tym nadzwędna rola lasu w globalnej cyrkulacji węgla (Gołaszewski i in. 2014). Jako przyszłościowe źródła biomasy lignocelulozowej wskazuje się uprawy roślin drzewiastych o krótkiej rotacji (SRWC – *short rotation woody crops*) oraz lignocelulozowe odpady przemysłu rolno-spożywczego. Wśród źródeł roślinnych surowca wymienić należy szczególnie te ekotypy, które nie stanowią konkurencji dla produkcji żywnościowej, a jednocześnie mogą stanowić o celowości wykorzystania gruntów o niskiej żyzności. Walor niskich wymagań glebowych mają m.in. takie rośliny takie, jak: *Salix* sp., *Populus* sp. oraz *Robinia pseudoacacia* L.

Proces produkcji etanolu jest znany od wieków, ale pierwsze jego zastosowanie w transporcie do napędu samochodów Forda miało miejsce pod koniec XIX wieku (Kovarik 1998). W kolejnych dziesięcioleciach etanol rolniczy nie stanowił jednak alternatywy dla benzyny z uwagi na różnicę w cenie. Rozwojowi tej technologii nie sprzyjał również brak programów prośrodowiskowych, stymulujących jego pozyskanie z trudniejszych w przetwórstwie etanolowym surowców lignocelulozowych. Należy podkreślić, że bioetanol I generacji jest istotnym elementem paliwowego portfolio w Stanach Zjednoczonych (kukurydza) i Brazylii (trzcina cukrowa). W Stanach Zjednoczonych wzrost zapotrzebowania przemysłu bioetanolowego na ziarno kukurydzy spowodował zmianę struktury upraw kosztem soi – rośliny paszowej, co spowodowało podwyżkę cen pasz dla zwierząt i w konsekwencji cen żywności (FAOSTAT 2008; Gołaszewski i in. 2010).



Rys. 1. Scenariusz rozwoju biorafinerii i generacje biopaliw

Obecnie na celowość rozwijania procesów produkcji paliw alternatywnych, w tym z surowca drzewnego, wskazują zarówno względy ekonomiczne, jak i środowiskowe (Campbell i Laherrere 1998), mimo że poziom wiedzy w tym zakresie nie osiągnął jeszcze masy krytycznej skutkującej powszechnością zastosowań. Aktualnie na świecie funkcjonują dziesiątki instalacji pilotażowych wytwarzania etanolu z lignocelulozy, szczególnie w UE, jak również pojedyncze instalacje komercyjne, w tym we Włoszech, USA i Brazylii¹. Można przyjąć, że implementacja rynkowa biorafinerii lignocelulozowej wytwarzających paliwa II generacji osiągnęła fazę II, w której procesy biorafineryjne są zorientowane na przetwarzanie pojedynczego surowca i wchodzi w fazę III, w której dokonuje się integracji surowca i procesów przetwórczych o określonej platformie chemicznej, podobnie jak w przypadku rafinerii petrochemicznej (rys. 1).

1.1. Struktura monografii

W kolejnych rozdziałach monografii ujęto wyniki badań dotyczące przetwórstwa biorafineryjnego lignocelulozy z upraw SRWC do bioetanolu i bioenergii oraz wstępne opracowania procesowe w zakresie potencjalnych źródeł innych paliw alternatywnych – furfuralu z lignocelulozy i oleju z glonów.

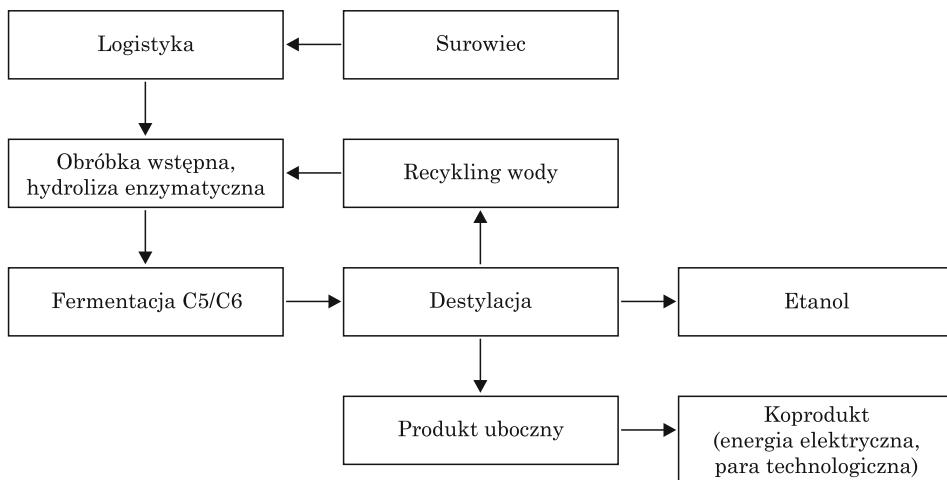
- Część I: *Etanol celulozowy – uwarunkowania procesowe* omawia procesy biorafineryjne związane z wytwarzaniem etanolu celulozowego.
- Część II: *Autogeneracja energii w biorafinerii lignocelulozowej* dotyczy energetycznego zagospodarowania odpadów poprocesowych w towarzyszących procesach termochemicznych i w mikrobiologicznym ogniwie elektrolitycznym organicznym oraz etanolu w ogniwie paliwowym DEFC.
- Część III: *Furfural* przybliża proces wytwarzania furfuralu – w niniejszych badaniach bioproduktu alternatywnego względem etanolu – oraz waloryzację pochodnych furfuralu.
- Część IV: *Paliwo z glonów – bioolej* opisuje produkcję alg olejowych, pozyskiwanie oleju i jego energetyczne wykorzystanie.

1.1.1. Ogólne założenia procesowe wytwarzania etanolu celulozowego

Wytwarzanie etanolu z masy lignocelulozowej obejmuje kolejne etapy procesowe, począwszy od źródeł surowcowych, jego kondycjonowania i logistyki poprzez obróbkę wstępную i hydrolizę enzymatyczną, następnie fermentację

¹ Beta Renewables (Włochy: <http://www.betarenewables.com/>), POET (USA: <http://www.poet.com/pr/first-commercial-scale-cellulosic-plant>), IOGEN (Brazylia: <http://www.igen.ca/raizen-project/>).

alkoholową i destylację etanolu aż po możliwości wykorzystania pozostałości procesowych – zwrócenie fazy ciekłej pozostałości po destylacji do procesu oraz przetworzenie fazy stałej do nośników energii (rys. 2).



Rys. 2. Ogólny schemat etapów procesowych wytwarzania etanolu z masy lignocelulozowej

Biomasa SRWC, logistyka. W aspekcie produkcyjnym zakłada się, że biomasa SRWC będzie pozyskiwana z gruntów niekonkurencyjnych z produkcją na cele żywnościowe, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiego potencjału produkcyjnego biomasy, możliwości pozyskiwania w krótkich rotacjach, łatwości rozmnażania wegetatywnego i zdolności do odrostu pędów po wielokrotnych zbiorach. Skład chemiczny surowca lignocelulozowego różni się w zależności od gatunku. W tabeli 1 przedstawiono wybrane dane porównawcze ilustrujące zasadnicze dysproporcje składu chemicznego słomy zbożowej oraz wierzby.

Tabela 1
Analiza porównawcza składu chemicznego słomy pszenicznej i wierzby (% s.m.)

Surowiec	Ksylian	Araban	Galaktoza	Mannoza	Lignina Klasona	Popiół
Słoma	23,7	3,1	–	–	17,9	3,5
Wierzba	11,1	1,2	1,3	1,1	28,5	1,9

Źródło: High efficiency consolidated bioprocess technology for lignocellulose ethanol. Raport projektu HYPE. 2012.

W aspekcie efektywności pozyskiwania dużych ilości biomasy istotna jest hodowla twórcza nowych wysoko produktywnych form roślin lignocelulozowych na bazie genotypów roślin energetycznych, takich jak wierzba krzewista (*Salix spp.*) i topola (*Populus L.*) oraz opracowanie adekwatnej technologii produkcji. Z kolei w aspekcie środowiskowym, socioekonomicznym i prawnym celowa jest ocena konsekwencji środowiskowych, dokonanie bilansu socioekonomicznego oraz ustalenie procedur prawnych związanych z przygotowaniem inwestycji i funkcjonowaniem biorafinerii. Wymienione kwestie związane z surowcem, logistiką oraz bilansami środowiskowymi, energetycznymi i ekonomiczno-społecznymi były przedmiotem prac badawczych ujętych w monografii „Założenia systemowe funkcjonowania biorafinerii lignocelulozowej” (red. Stolarski i Gołaszewski 2015). Dodatkowo, otoczenie prawne związane z funkcjonowaniem biorafinerii lignocelulowej przedstawiono w publikacji „Regulacje prawne dotyczące budowy i eksploatacji biorafinerii lignocelulozowej” (Zięty i Krzykowski 2015).

Obróbka wstępna, hydroliza. Proces obróbki wstępnej jest kluczowym dla powodzenia rozkładu lignocelulozy do związków prostych. Szacuje się, że może stanowić do 25% kosztów całego procesu. Ma na celu degradację ścian komórkowych i poprawę penetracji przez enzymy. Obejmuje proces delignifikacji (separacja ligniny) oraz rozkład hemiceluloz, które tworzą fizyczną barierę wokół celulozy. Degradação ligniny ułatwia rozkład celulozy do cukrów prostych, ale także powoduje uwolnienie związków, które mogą działać toksycznie względem enzymów hydrolitycznych. Drugim istotnym nakładem są enzymy. Mimo testowania różnych metod hydrolizy enzymatycznej, w tym często stosowanej z jednoczesnym scukrzaniem i fermentacją (SSF), oraz wykorzystania enzymów w różnych konfiguracjach (np. celulaza, hemicelulaza, celobiazza) oraz procesem detoksykacji, to ten proces ma wciąż duży potencjał poprawy efektywności.

Proces obróbki wstępnej zależy od rodzaju biomasy. Obecnie najczęściej wykorzystywany surowcem lignocelulozowym w produkcji etanolu w instalacjach komercyjnych jest słoma z produkcji zbóż oraz surowiec lignocelulozowy pozyskiwany z upraw roślin energetycznych, w tym SRWC. W niniejszych badaniach surowiec stanowiły głównie zrębki wierzby, a ponadto topoli i robinii akacjowej. W procesie kondycjonowania zrębki były rozdrabniane i poddane hydrolizie chemicznej w warunkach alkalicznych i kwasowych, a także procesowi eksplozji pary wodnej oraz w warunkach wysokiej temperatury i ciśnienia w zróżnicowanym środowisku chemicznym, w tym rozcięczonego kwasu ortofosforowego, a następnie hydrolizie enzymatycznej. Prace badawcze w tym zakresie uwzględniały:

1. Wykorzystanie promieniowania jonizującego w degradacji surowca lignocelulozowego (rozdział 2).
2. Określenie wpływu roztworów soli nieorganicznych na stopień degradacji celulozy oraz zmiany w dystrybucji rozmiaru jej ziaren oraz wpływ surfaktantów (rozdział 3).
3. Eksplozja pary wodnej, hydrolizę enzymatyczną prowadzono z wykorzystaniem przemysłowych preparatów enzymatycznych Cellic® CTec2 i Cellic® HTec2 dobierając eksperymentalnie stężenia enzymów (rozdział 4 i 5).
4. Analiza porównawcza trzech procedur obróbki wstępnej: (i) metoda biologiczna (hodowla *Pleurotus ostreatus* lub *T. versicolor* na podłożu z substratem), (ii) hydroliza kwasowa (z kwasem siarkowym, w wariantach z rozprzężaniem i bez) (iii) alkaliczna (rozdział 6).

Fermentacja etanolowa. Proces fermentacji etanolowej przebiega na pozór analogicznie jak w przypadku procesów z klasycznymi substratami z roślin skrobiowych i cukrowych. Problem polega na tym, że przy stosowanej zazwyczaj 10% zawartości suchej masy w substracie, wydatek alkoholu nie przekracza 2–3% (w/w), a generuje wysokie koszty wykorzystanej energii, w tym na pretreatment i destylację. Hydrolizaty lignocelulozy zawierają zarówno heksozy (C6) jak i pentozy (C5). Klasyczne droździe *Saccharomyces cerevisiae* nie prowadzą fermentacji pentoz. Wciąż na etapie badawczym są organizmy zmutowane lub genetycznie modyfikowane po kątem fermentacji pentoz, przy czym szacunki dowodzą, iż teoretyczne zwiększenie ilości etanolu poprzez sfermentowanie wszystkich dostępnych cukrów może być o 30% większe (Viikari i in. 2007). W badaniach prezentowanych w niniejszej monografii testowano 5 szczepów drożdży predysponowanych do fermentacji pentoz oraz 4 szczepy drożdży przemysłowych z gatunku *S. cerevisiae*, jednak żadne z nich nie przyczyniły się do istotnego zróżnicowania w ilości uzyskanego etanolu. Zdecydowanie korzystniejszy efekt dało płukanie hydrolizatu w wodzie – sprawność fermentacji zwiększyła się o 30%. Zatężanie hydrolizatu przed fermentacją pozwoliło na uzyskanie ok. 3% etanolu w odfermentowanej brzeczce przy zachowaniu sprawności całego procesu na poziomie 60% (rozdział 8). Analizując potencjał energetyczny etanolu można przyjąć, że produkcyjność procesu może wynosić 100–300 l etanolu na 1 tonę suchej masy przy kaloryczności (wartość opałowa) 21 MJ/l i wydatku energii w szerokich granicach 2,3–6,3 GJ/t. Warto podkreślić, że analiza porównawcza paliw II generacji wytworzonych z tego samego surowca lignocelulozowego metodą biochemicalną (etanol) i termochemiczną (syngaz) dowodzi, iż na tym etapie rozwoju prowadzą one do podobnych wydajności (Sims i in. 2010).

Pozostałości poprocesowe, koprodukty. Przy obecnych cenach rynkowych paliw kopalnych proces wytwarzania etanolu z masy lignocelulozowej musi być komplementarny względem innych procesów, których produkty ostatecznie przesądzają o dochodowości przetwarzania. W niniejszych badaniach

testowano potencjał wykorzystania etanolu w ogniwie paliwowym DEFC, zaś pozostałości po obróbce wstępnej i hydrolizie (głównie lignina) jako surowiec energetyczny w procesie zgazowania lub w mikrobiologicznym ogniwie elektrochemicznym.

1.1.2. Etanol celulozowy – uwarunkowania procesowe: założenia badawcze, kluczowe wnioski

Obróbka wstępna – promieniowanie jonizujące. Badania miały na celu wykazanie, że promieniowanie jonizujące może stanowić jedną z technik obróbki wstępnej materiałów lignocelulozowych. Zaprezentowane wyniki badań dotyczyły wpływu dawek promieniowania w zakresie od 25 do 600 kGy na szybkość mielenia, zawartość substancji ekstrahowanych, zawartość glukozy w ekstrakcie, właściwości termiczne (TG, DSC), właściwości morfologiczne (SEM, mikrotomografia komputerowa) oraz porowatość materiału lignocelulozowego (rozdział 2).

Obróbka wstępna – stopień degradacji celulozy oraz stosowanie surfaktantów. Badania miały na celu określenie wpływu roztworów soli nieorganicznych na stopień degradacji celulozy oraz zmiany w dystrybucji rozmiaru jej ziaren. Przedmiotem studiów był również efekt wspomagania procesu degradacji celulozy za pomocą surfaktantów. Aby ustalić optymalne parametry degradacji, wykonano szereg eksperymentów wykorzystujących mikrokrystaliczną celulozę oraz roztwory soli nieorganicznych o stężeniach 0,5–4% w warunkach hydrotermalnych. Zmiany rozmiarów ziaren celulozy w nierożpuszczalnej części hydrolizatów analizowano metodą dyfraktometrii laserowej. Ilość uwolnionej glukozy w supernatantach określano techniką HPLC. Zoptymalizowane dla mikrokrystalicznej celulozy warunki wstępnej hydrolizy z powodzeniem zastosowano do degradacji biomasy lignocelulozowej (rozdział 3).

Obróbka wstępna – procesy termochemiczne. Badania miały na celu obróbkę wstępную biomasy za pomocą procesów termochemicznych. W badaniach zastosowano reaktor umożliwiający szybkie grzanie (8°C/min) oraz pobieranie próbek ciekłych w trakcie prowadzenia procesu. Przeprowadzono kilkadziesiąt eksperymentów z zastosowaniem różnego rodzaju biomasy oraz zmiennych parametrów procesowych. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, iż kluczowymi parametrami, wpływającymi na ilość otrzymanego produktu są: temperatura, czas prowadzenia procesu oraz stężenie katalizatora (rozdział 4).

Obróbka wstępna – hydroliza. Badania dotyczyły enzymatycznej hydrolizy surowca lignocelulozowego w postaci zrębków *Salix viminalis* L. podanych obróbce wstępnej metodą eksplozji pary. Hydrolizę prowadzono z wykorzystaniem najnowszej generacji wysoko wydajnych przemysłowych preparatów enzymatycznych Cellic® CTec2 i Cellic® HTec2. Eksperymentalnie

dobrano stężenia użytych preparatów enzymatycznych oraz określono wpływ warunków prowadzenia hydrolizy (temperatura i pH) na jej efektywność. Na podstawie otrzymanych wyników przeprowadzono analizę statystyczną procesu z wykorzystaniem założeń planu Boxa-Behnkena i wyznaczono optymalne wartości temperatury inkubacji ($43,8^{\circ}\text{C}$) oraz odczynu pH (5,55) układu reakcyjnego, dla których po 72 h stopień hydrolizy przyjmuje największą wartość i wynosi 0,52. Do opisu matematycznego przebiegu badanej reakcji zaproponowano empiryczny model kinetyczny i określono jego parametry (rozdział 5).

Obróbka wstępna – analiza porównawcza metod. Przeprowadzono wstępную obróbkę substratów, głównie wierzby wiciowej, w postaci zmielonej lub zrębków mającej na celu poprawę dostępności polisacharydów, przede wszystkim celulozy w hydrolizie enzymatycznej. Zastosowano trzy procedury obróbki, tj. metodę biologiczną (hodowla *Pleurotus ostreatus* lub *T. versicolor* na podłożu z substratem), kwasową (z kwasem siarkowym, w wariantach z rozprężaniem i bez) oraz alkaliczną (NaOH w wariantach z rozprężaniem lub bez). Metodami fizykochemicznymi badano skuteczność degradacji substratów w zależności od temperatury (121 i 200°C) i czasu (60 i 180 min). Po ocenie efektów obróbki wstępnej, uwzględniającej straty sacharydów, stężenie uwalnianych substancji inhibitujących procesy biotechnologiczne, a przede wszystkim wydajność hydrolizy enzymatycznej udostępnionych polisacharydów najkorzystniejszą procedurą okazała się obróbka alkaliczna ($121^{\circ}\text{C}/60$ min) z pominięciem rozprężania. W procesie hydrolizy enzymatycznej dostępnych polisacharydów przetestowano różne zestawienia preparatów celulolitycznych. Za najkorzystniejszą kompozycję uznano cellulazę i hemicelulazę z *T. longibrachiatum* w połączeniu z celobiazą (Novozyme 188) (rozdział 6).

Fermentacja alkoholowa. W badaniach testowano 5 szczepów drożdży predysponowanych do fermentacji pentoz oraz 4 szczepy drożdży przemysłowych z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*. *Pachysolen tannophilus* charakteryzował się niewielkimi zdolnościami do fermentacji brzeczek zawierających mieszaninę glukozy i ksylozy w warunkach ograniczonego natleniania. Ocena drożdży gorzelniczych pod względem odporności na substancje inhibitory fermentację wykazała większą wrażliwość szczepów termofilnych. Po analizie składu cukrów w hydrolizacie wierzby przeprowadzonej metodą GC stwierdzono znaczną przewagę heksoz (proporcja C6:C5 wyniosła 4,2:1), dla tego w dalszych doświadczeniach przyjęto strategię doskonalenia warunków fermentacji z wykorzystaniem drożdży gorzelniczych. Porównanie sposobów prowadzenia fermentacji (SHF i SSF) nie wskazało przewagi żadnego z nich pod względem efektywności odfermentowania dostępnych cukrów. Nie stwierdzono wpływu rodzaju źródeł azotu i fosforu w brzeczkach na aktywność fermentacyjną drożdży. Istotną rolę odegrał natomiast dodatkowy zameg detoksykacji materiału po obróbce poprawiając sprawność fermentacji

o ponad 30%. Zatężanie hydrolizatu przed fermentacją pozwoliło na uzyskanie ok 3% etanolu w ofermentowanej brzeczce, przy zachowaniu sprawności procesu 60% (rozdział 7).

1.1.3. Autogeneracja energii w biorafinerii lignocelulozowej: założenia badawcze, kluczowe wnioski

Produkty biorafineryjne – bioenergia z etanolowego ogniska paliwowego. Zbadano kinetykę procesu elektrotrutleniania etanolu (EOR: *ethanol oxidation reaction*) w nawiązaniu do zastosowania tego alkoholu w ogniwach paliwowych typu PEMFC (Proton-Exchange Membrane Fuel Cells). Wstępnie przedstawiono wyniki badań elektrochemicznych dla poli-kryształycznej Pt oraz elektrod platynowych o orientacji geometrycznej (111) i (100), które wykazały znaczącą zależność kinetyki procesu elektrotrutleniania etanolu od geometrii monokryształów Pt, jak również środowiska oraz temperatury reakcji. Następnie celem usprawnienia kinetyki procesu utleniania etanolu przeprowadzono cykl badań przy użyciu elektrod na bazie polikryształycznej platyny modyfikowanych za pomocą Rh lub Ru. Uzyskane dane kinetyczne dla procesu EOR przedstawiono porównawczo z kinetyką odwrażalnego procesu elektrosorpcji wodoru, tzw. UPD H (*underpotentially deposited hydrogen*). Podjęto także próbę uzyskania aktywnego katalizatora reakcji utleniania etanolu w oparciu o „niekatalityczny” materiał bazowy: aktywowane włókna węglowe (CFox: carbon fibre), modyfikowane elektrochemicznie palladem (rozdział 8).

Produkty biorafineryjne – bioenergia z mikrobiologicznego ogniska elektrolitycznego. W badaniach wykorzystano jednokomorowe ognisko mikrobiologiczne wykonane z poliwęglanu. Cylindryczna komora (średnica wewnętrzna 80 mm) o objętości całkowitej 0,7 dm³ zawierała anodę w kształcie szczotki wykonanej z włókien grafitowych uplecionych na drucie tytanowym, całkowita powierzchnia grafitu wynosiła 1,1 m². Gazową katodę dyfuzyjną, stanowiącą jednocześnie szczelne dla cieczy zamknięcie cylindra, wykonano z tkaniny węglowej impregnowanej politetrafluoroetylenem i aktywowanej materiałem katalitycznym. Brak przegrody jonoselektywnej redukował opór omowy układu oraz znacząco obniżał koszt urządzenia. Elektroda gazowa nie stykała się z powietrzem, lecz zamykała jednostronnie komorę do gromadzenia wodoru. Ognisko wypełniono roztworem buforowym i podłączono do potencjostatu, który umożliwia kontrolę potencjału anody podczas wzrostu biofilmu po inokulacji. Przed pomiarami komorę ogniska wyszterylizowano 6% roztworem nadtlenku wodoru. Ognisko dwukomorowe wykonano z cylindrycznych komór (średnica wewnętrzna 100 mm) o objętości całkowitej 1,1 dm³, które zostały rozdzielone przegrodą kationoselektywną

typu Nafion 117 o powierzchni 75 cm^2 . W każdej komorze znajdowała się elektroda odniesienia Ag/AgCl do pomiaru potencjałów obu elektrod. Anoda w kształcie szczotki wykonana została z włókien grafitowych uplecionych na drucie tytanowym, całkowita powierzchnia grafitu wynosiła $1,1 \text{ m}^2$. Katodę wykonano z filcu grafitowego o powierzchni geometrycznej $0,005 \text{ m}^2$. Powierzchnię katody aktywowały platyną w stężeniu $0,5 \text{ mg Pt/cm}^2$. Obie elektrody zanurzono w odpowiednich roztworach i podłączono do potencjostatu, który umożliwia kontrolę potencjału anody podczas wzrostu biofilmu po inokulacji. Przed pomiarami elektrolizer wysterylizowano 6% roztworem nadtlenku wodoru. Uzysk i odzysk energii były względnie małe i pozostawały praktycznie niezmienne dla poszczególnych wsadów paliwa. Wytworzona w ogniwie energia wyniosła ok. $0,5 \text{ kJ/m}^2$, lub $10\text{--}11 \text{ kJ/mol}$. Oszacowany odzysk energii chemicznej zawartej w paliwie był niski i wynosił od 1% do 1,5% (rozdział 9).

Produkty biorafineryjne – bioenergia z pozostałości z procesu wytwarzania etanolu. W trakcie produkcji bioetanolu powstają odpady. Sprawdzono możliwość wytworzenia II generacji paliw stałych i gazowych z odpadów z produkcji bioetanolu w procesach pirolizy i zgazowania. Procesem termicznym poddano ligninę (LH) jako materiał referencyjny oraz odpad po procesie fermentacji (HW). Paliwa gazowe uzyskane w procesie pirolizy i zgazowania wykazały znacznie lepsze właściwości dla HW niż LH. W przypadku HW paliwo gazowe posiadało maksymalną kaloryczność na poziomie 4,9 i $8,5 \text{ MJ/m}_n^3$ w procesie zgazowania i pirolizy, odpowiednio. Paliwo gazowe z procesu zgazowania LH miało kaloryczność $4,5 \text{ MJ/m}_n^3$, a z pirolizy 7 MJ/m_n^3 . W przypadku wytworzonyego karbonizatu uzyskano również znacznie lepsze wyniki wsadu HW niż LH. Wartość opałowa HW $17,4 \text{ MJ/kg}$ była wyższa o ok. $0,5 \text{ MJ/kg}$ niż LH. Po obróbce termicznej – pirolizie – wartość opałowa karbonizatu z HW była wyższa o ok. $1,4 \text{ MJ/kg}$ i wyniosła $22,2 \text{ MJ/kg}$ (rozdział 10).

1.1.4. Furfural: założenia badawcze, kluczowe wnioski

Alternatywny produkt biorafinerii lignocelulozowej – furfural. Selektynna piroliza została zastosowana do katalitycznej konwersji zmielonej biomasy drzewnej topoli, wierzby i robinii akacjowej. Biomasa została poddana impregnacji wodnym roztworem ZnCl_2 i zbadana wstępnie z wykorzystaniem technik termograwimetrycznych TG/DTG, DSC. Chlorek cynku, znany jako kwas Lewisa, jest stosowany jako skuteczny katalizator w różnych procesach pirolizy biomasy. Selektynna piroliza różni się od konwencjonalnej, w której ilość związków chemicznych w fazie ciekłej wynosi około stu. W procesie selektynnej pirolizy uzyskano bioolej z dużą selektywnością do furfuralu

(do 80%) oraz kwas octowy i lewiglukozan. Katalityczne oddziaływanie $ZnCl_2$ polegało na obniżeniu temperatury depolimeryzacji biomasy drzewnej. Katalizator inhibitował powstawanie większości lotnych związków organicznych, ukierunkowując proces na powstawanie furfuralu będącego dominującym składnikiem produktu ciekłego. Chlorek cynku działał korzystnie na depolimeryzację i odwodnienie holocelulozy, głównie do furfuralu. Podczas pirolizy bez katalizatora kwas octowy był dominującym produktem. Furfural do dalszego przetwarzania badano w reakcji kondensacji aldolowej z acetonom w celu wytworzenia związków biochemicznych. Zaproponowano proces technologiczny do konwersji biomasy drzewnej do furfuralu i jego dalszej waloryzacji do substancji chemicznych jako potencjalnych przyszłych produktów w biorafineriach (rozdział 11).

1.1.5. Paliwo z glonów (bioolej): założenia badawcze, kluczowe wnioski

Celem badań było określenie możliwości hodowli biomasy glonów o wysokiej zawartości oleju na bazie substratów odpadowych pochodzących z zakładów mleczarskich. Stwierdzono, iż najlepszymi właściwościami charakteryzują się odcieki pochodzące z reaktora beztlenowego oczyszczającego ścieki mleczarskie. Zastosowanie tego rodzaju substratu pokarmowego pozwoliło na uzyskanie koncentracji mikroglonów w reaktorze na poziomie $3490 \text{ mg s.m./dm}^3$ przy średniej szybkości przyrostu biomasy wynoszącej $176 \text{ mg s.m./dm}^3 \text{ d.}$ Średnia zawartość oleju w biomasie glonów była bliska wartości 20%. Na podstawie eksperymentów prowadzonych w skali laboratoryjnej skonstruowano instalację pilotową, w której uzyskana koncentracja biomasy glonów oscylowała wokół wartości $3000 \text{ mg s.m./dm}^3$. Stwierdzono, iż średnia predkość przyrostu biomasy przy zastosowanych parametrach technologicznych prowadzenia procesu wynosiła $160 \text{ mg s.m./dm}^3 \text{ d.}$ Zawartość oleju w pozyskiwanej biomasie wynosiła ok. 19%. Analiza uzyskanych wyników stała się podstawą do opracowania założeń techniczno-technologicznych dla instalacji namnażania i separacji biomasy glonów na bazie ścieków odpływających z reaktora beztlenowego typu UASB (rozdział 12).

Wytwarzanie i badanie właściwości biodiesla otrzymanego z oleju glonowego. Obecnie podstawowym paliwem do silników z zapłonem samoczynnym jest olej napędowy otrzymany z ropy naftowej. Algi olejowe stanowią alternatywne źródło surowca do wytwarzania biopaliw – estrów metylewych wyższych kwasów tłuszczyowych (FAME). Jednym z istotnych problemów eksploatacyjnych pojazdów zasilanych FAME jest zapewnienie właściwego rozruchu silników poniżej temperatury 5°C . Bezpośredni wpływ na właściwości

niskotemperaturowe biopaliwa ma jakość surowca, jego skład chemiczny, zawartość poszczególnych estrów kwasów tłuszczywych itp. Przykładowo, im wyższy jest udział estrów o wyższej liczbie atomów węgla w cząsteczce, tym mniejsza jest podatność rozruchowa w niskiej temperaturze, a większy udział nienasyconych wiązań poprawia tę właściwość. Programowane badania eksperymentalne biopaliw miały na celu określenie właściwości fizyko-chemicznych estrów metylowych olejów otrzymanych z glonów i przeznaczonych do zasilania silników z zapłonem samoczynnymi (ZS) oraz ocenę stanu technicznego badanego silnika zasilanego tym biopaliwem. Podczas badań określane były parametry paliwa oraz wpływ na silnik ZS (rozdział 13).

1.2. Podsumowanie

Utylitarnym celem badań prezentowanych w niniejszej monografii było opracowanie oryginalnych technologii otrzymywania etanolu z biomasy lignocelulozowej, furfuralu z biomasy lignocelulozowej oraz biooleju z glonów olejowych. Prace badawcze realizowano wielotorowo i dotyczyły zarówno sfery surowcowej, jak i nowych procesów konwersji do produktów energetycznych – paliw II generacji (etanol) i III generacji (paliwo z glonów). Technologie wytwarzania paliw obejmowały procesy biologiczne, chemiczne i biochemiczne. Należy podkreślić, że badania procesów biorafineryjnych rozważane w niniejszej monografii dotyczyły tylko aspektu biopaliwowego i bioenergetycznego. Jednakże w miarę rozwoju procesów przetwórczych wszystkie analizowane platformy chemiczne (celuloza, hemicelulozy, lignina, olej z alg) będą służyły do wytwarzania nowych materiałów i chemikaliów stanowiących substytuty dzisiejszych niepaliwowych i nieenergetycznych produktów petrochemicznych.

Literatura

- Campbell C.J., Laherrere J.H. 1998. *The end of cheap oil*. Scientific American, 278(3): 78–83.
- FAOSTAT 2008, *The future of biofuels: A global perspective*. US Dept. of Agriculture.
- Gołaszewski J. 2009. *Renewables and environmental implications*. Environmental Biotechnology, 5(1): 11–24.
- Gołaszewski J., Szczukowski S., Stolarski M. 2014. *Plantacje drzew i krzewów szybko rosnących jako alternatywa biomasy z lasu, czyli nowe źródła energii odnawialnej – stan obecny, możliwości, bariery i perspektywa rozwoju*. W: *Materiały pierwszego panelu ekspertów w ramach prac nad Narodowym Programem Leśnym „Klimat. Lasy i drewno a zmiany klimatyczne: zagrożenia i szanse”*. Red. Rykowski K. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary: 296–313.
- Kovarik B. 1998. *Henry Ford, Charles F. Kettering and the „Fuel of the Future”*. Automotive History Review, 32:7–27.

- Sims R.E.H., Mabee W., Saddler J.N., Taylor M. 2010. *An overview of second generation biofuel technologies*. Bioresource Technology, 101: 1570–1580.
- Stolarski M., Gofaszewski J. (red.) 2015. *Założenia systemowe funkcjonowania biorafinerii lignocelulozowej*. Wyd. UWM, Olsztyn.
- Viikari L., Alapuranen M., Puranen T., Vehmaanperä J., Siikaaho M. 2007. *Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 108: 121–45.
- Zięty J.J., Krzykowski M. 2015. *Regulacje prawne dotyczące budowy i eksploatacji biorafinerii lignocelulozowej*. Wyd. UWM, Olsztyn.

CZEŚĆ I

ETANOL CELULOZOWY – UWARUNKOWANIA PROCESOWE

2. Wydajność degradacji materiałów lignocelulozowych pod wpływem promieniowania jonizującego

*Wojciech Migdał, Urszula Gryczka, Dagmara Chmielewska,
Magdalena Antoniak, Michał Dubiel*

2.1. Wprowadzenie

Materiały lignocelulozowe w procesie produkcji biopaliw poddawane są obróbce wstępnej z wykorzystaniem metod chemicznych, biologicznych i fizycznych. Głównym problemem przy produkcji bioetanolu z surowców lignocelulozowych jest rozbicie struktury lignocelulozy i uwolnienie cukrów prostych. Zastosowanie procesów wstępnej obróbki (np. mielenie, hydroliza kwasowa, napromieniowywanie) materiałów lignocelulozowych ma na celu obniżenie stopnia krystaliczności, zwiększenie reaktywności, obniżenie średniego stopnia polimeryzacji oraz poprawienie rozpuszczalności w rozpuszczalnikach organicznych i nieorganicznych (Kumar i in. 2009).

Metoda radiacyjna jest jedną z fizycznych metod obróbki wstępnej. Badania w zakresie oddziaływanego promieniowania elektronowego na materiał lignocelulozowy zapoczątkowali Saeman i Millett (1952), którzy w połowie ubiegłego wieku analizowali wpływ wiązki elektronów na rozkład celulozy w celu przygotowania surowca celulozowego do hydrolizy enzymatycznej. Od 1978 r. dzięki pracom Kumakury (Kumakura i Ketsu 1978) tematem tym zainteresowano się ponownie, a prace nad radiacyjną metodą obróbki wstępnej zostały zintensyfikowane. Rozpoczęto badania nad różnymi surowcami, stosując różne dawki promieniowania i kombinacje metod obróbki wstępnej.

Khan i in. (1986) zastosowali wysokoenergetyczne promieniowanie elektronowe do obróbki wstępnej drewna świerkowego i potwierdzili, że ponad 90% celulozy obecnej w próbkach napromieniowanych maksymalną dawką 2000 kGy zostało przekształcone w cukry przy użyciu cellulaz wyizolowanych z grzybów *Trichoderma*, zaś napromieniowanie zwiększa ilość substancji rozpuszczalnych w zimnej i gorącej wodzie, a także w NaOH. Lam i in. (2000) przeprowadzili badania dotyczące wpływu wysokich dawek promieniowania i późniejszego działania grzybów na materiał lignocelulozowy, taki jak: wyłoki trzciny cukrowej, włókna palmy olejowej, puste grona owoców, trociny bukowe. Napromieniowanie silnie wpływa na wszystkie materiały roślinne, powodując szereg zmian parametrów fizykochemicznych, zmienia rozpuszczalność, powodując jej liniowy wzrost w gorącej wodzie i etanolu dla dawek w zakresie od 500 do 1000 kGy. Wraz ze wzrostem dawki zmniejsza się także ilość składników strukturalnych włókien roślinnych. Innym materiałem lignocelulozowym poddawanym napromieniowywaniu były konopie przemysłowe, badane przez Shina (2008), przy czym rezultaty są analogiczne jak w poprzednio przytoczonych pracach. Napromieniowanie powoduje zmiany strukturalne w materiale lignocelulozowym. Objawia się to rosnącą wraz ze wzrostem dawki dostępnością materiału dla rozpuszczalników. W związku z tym zwiększa się ilość substancji rozpuszczalnych w gorącej wodzie, etanolu i zasadach. Bak i in. (2009) badali słomę ryżową, napromieniowując ją dawkami do 90 kGy. Wykazali, że w tych warunkach znacząco wzrasta zdolność do hydrolizowania słomy ryżowej przez enzymy. Dla słomy ryżowej napromieniowanej dawką 80 kGy, a następnie hydrolizowanej uzysk glukozy po 132 h hydrolizy, kształtał się na poziomie 52,1% teoretycznego maksimum i był o 22,6% większy od otrzymanego z próbek nienapromieniowanych.

Duarte i in. (2009) stosowali dawki do 200 kGy podczas napromieniowywania badanego materiału lignocelulozowego. Wykazali, że proces napromieniowywania powoduje zmiany w składzie wyłoków z trzciny cukrowej, a także rozkład celulozy i ligniny. Przeciwnie do wspomnianych w poprzednich pracach wyników, wydajność hydrolizy enzymatycznej celulozy wzrosła o 75% dla dawki 20 kGy. Przy dawkach powyżej 20 kGy wydajność z nieznanymi powodów maleje, choć nadal jest wyższa niż dla próbek nienapromieniowanych. Autorzy potwierdzili jednocześnie, że napromieniowanie zwiększa ilość substancji rozpuszczalnych w gorącej wodzie.

Prowadzone są też badania nad zastosowaniem promieniowania jonizującego w połączeniu z metodą chemiczną oraz hydrotermiczną. Duarte i in. (2012) uzyskali wzrost wydajności hydrolizy enzymatycznej trzciny cukrowej o 20%, stosując dawkę 50 kGy w połączeniu z metodą hydrotermiczną, oraz wzrost o 30% przy tej samej dawce w połączeniu z hydrolizą kwasową. Wzrost zawartości cukrów redukujących obserwowali również Chung i in.

(2012), którzy napromieniowali korę topoli dawką 1000 kGy w połączeniu z hydrolizą kwasową.

Wpływ wiązki elektronów w zakresie dawek 75–250 kGy zastosowanych do wstępnej obróbki mieszanki traw na wydajność procesu hydrolizy badali również Karthika i in. (2012). Przy napromieniowaniu surowców dawką 250 kGy uzyskano 79% wydajność uzysku cukrów redukujących w procesie hydrolizy enzymatycznej.

2.2. Materiały i metody

Doświadczenia nad wpływem promieniowania jonizującego na materiał lignocelulozowy wykonano na zrębkach wierzby. Proces napromieniowania badanych materiałów prowadzono z wykorzystaniem akceleratora ELEKTRONIKA 10-10 w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Materiał lignocelulozowy poddawano napromieniowaniu wiązką wysokoenergetycznych elektronów o energii 10 MeV, w zakresie dawek 10–600 kGy.

Pomiary rozkładu dawki głębinowej w materiale lignocelulozowym wykonano, wykorzystując następujące dozymetry: folię B3, folię PCW oraz folię CTA. Folia B3 to folia dozymetryczna radiochromowa z poliwinylobutarylu zawierająca 2% cyjanku pararozielininy, o zakresie pomiarowym 5–100 kGy, stosowana dla promieniowania fotonowego (γ) oraz wiązki elektronów o energii do 10 MeV. Przed pomiarem folię wygrzewano w temperaturze 60°C przez 5–10 min. Pomiary dawki folii B3 wykonano z wykorzystaniem systemu dozymetrycznego RISOSCAN, opracowanego w HDRL RISO.

Folia PCW to dozymetr foliowy z nieplastyfikowanego polichlorku winylu o zakresie pomiarowym 10–40 kGy, stosowany dla promieniowania fotonowego (γ , X) o energii od 0,1 do 50 MeV oraz wiązki elektronów o energii 10 MeV. Folia PCW po napromieniowaniu została umieszczona w cieplarce i wygrzewana w temperaturze 70°C przez 30 min. Po 10–30 min od wyjęcia z cieplarki wykonywano pomiar absorbancji za pomocą spektrofotometru UV-VIS przy długości fali 396 nm. Stopień zaciemnienia folii zmierzono czytnikiem dawki z automatycznym przesuwem paska.

Folia CTA to dozymetr foliowy z trójoctanu celulozy o zakresie pomiarowym 15–150 kGy. Jest stosowana dla promieniowania fotonowego (γ , X) o energii od 0,1 do 50 MeV oraz wiązki elektronów o energii od 0,2 do 50 MeV. Przed napromieniowaniem wszystkie przygotowane dozymetry z folii CTA miały zmierzona absorbancję Ao. Pomiar absorbancji A (dla $\lambda=280$ nm) wykonano po 30 min od napromieniowania. Pomiary wykonano na spektrofotometrze UV/VIS JASCO V-650.

Pomiary dozymetryczne wykonane zostały dla partii materiału lignocelulozowego (zrębki wierzbowe) o średniej gęstości 0,15 g/cm³. Wysokość

napromieniowywanej warstwy materiału wynosiła 20 cm. Dozymetry rozmieszczone co 4 cm wewnątrz kartonu zawierającego badany materiał poddawano napromieniowaniu jedno- oraz dwustronnemu dawką 25 kGy wiązką elektronów o energii 9 MeV. Rzeczywistą dawkę mierzono kalorymetrami referencyjnymi produkcji Riso.

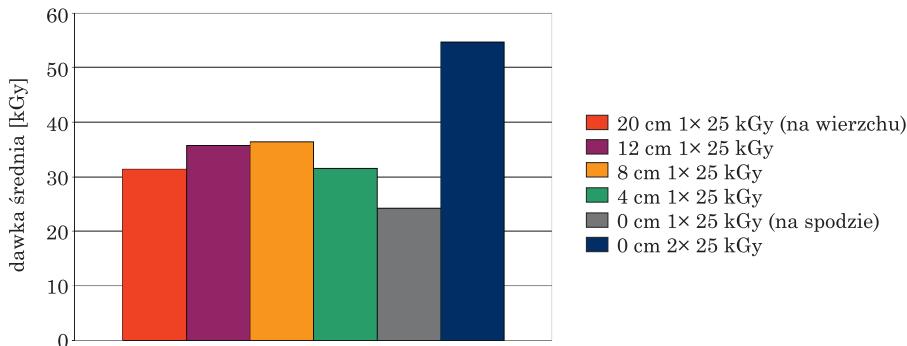
Efektywność procesu degradacji materiału lignocelulozowego pod wpływem promieniowania jonizującego określono poprzez:

- charakterystykę szybkości mielenia,
- oznaczanie substancji rozpuszczalnych w zimnej i gorącej wodzie oraz pH ekstraktu,
- oznaczanie zawartości glukozy w ekstrakcie,
- analizę właściwości termicznych (analiza DSC – TA Instruments 2920 MDSC, analiza TG – TA Instruments TGA Q500),
- zdjęcia powierzchni badanych próbek wykonane skaningowym mikroskopem elektronowym Leo 1530 Gemini,
- analizę struktury wewnętrznej za pomocą mikrotomografu komputerowego XRADIA Micro XCT-400 wykonaną na Wydziale Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej,
- charakterystykę powierzchni właściwej oraz porowatości określona metodą niskotemperaturowej sorpcji azotu za pomocą Quadrasorb-SI na Wydziale Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej.

2.3. Wyniki

2.3.1. Pomiary dozymetryczne

Elementem procesu napromieniowania jest monitorowanie dawki pochłoniętej. Zbyt mała dawka lub niejednorodny jej rozkład mogą nie gwarantować osiągnięcia zamierzonego celu technologicznego. Charakterystyczną właściwością promieniowania elektronowego jest występowanie wzrostu dawki na pewnej głębokości napromienowanego obiektu. W przypadku napromieniowania materiału wiązką elektronów obserwuje się występowanie regionu wzrostu dawki o ok. 30% w stosunku do dawki powierzchniowej. W przypadku materiału napromienowanego wiązką elektronów stosunek dawki maksymalnej do minimalnej powinien być bliski 1.3. Wyniki pomiarów wykonanych za pomocą folii dozymetrycznej PCW, określające rozkład dawki głębinowej, przedstawiono na rys. 1.

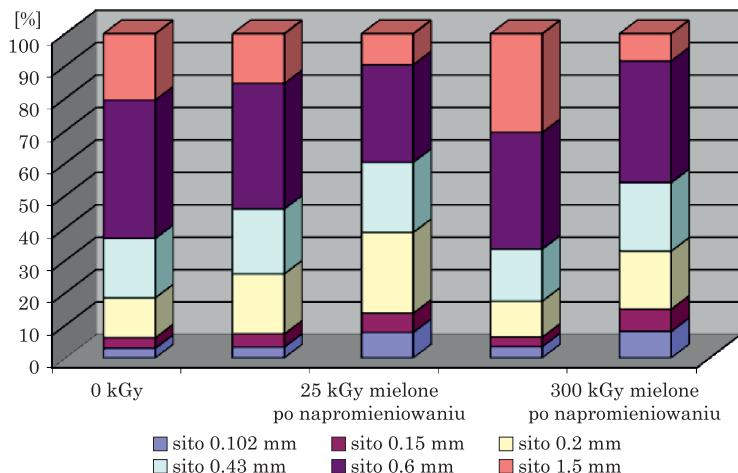


Rys. 1. Rozkład dawki głębinowej w materiale lignocelulozowym wykonany za pomocą dozymetru PCW

Przedstawione powyżej dane wskazują, że maksymalny wzrost dawki występował na głębokości ok. 8–12 cm od powierzchni. Warstwa materiału lignocelulozowego, dla której dawka głębinowa jest równa dawce powierzchniowej, wynosiła ok. 16 cm.

2.3.2. Analiza sitowa

Analizę sitową wykonano dla zrąbków wierzby energetycznej zmielonych przed oraz po napromieniowywaniu, stosując urządzenie laboratoryjne z sitami o średnicy oczek: 1,5 mm, 0,6 mm, 0,43 mm, 0,2 mm, 0,15 mm, 0,102 mm. Za pomocą analizy sitowej wyznaczono procentowy rozkład frakcji materiału w zależności od dawki promieniowania (rys. 2).

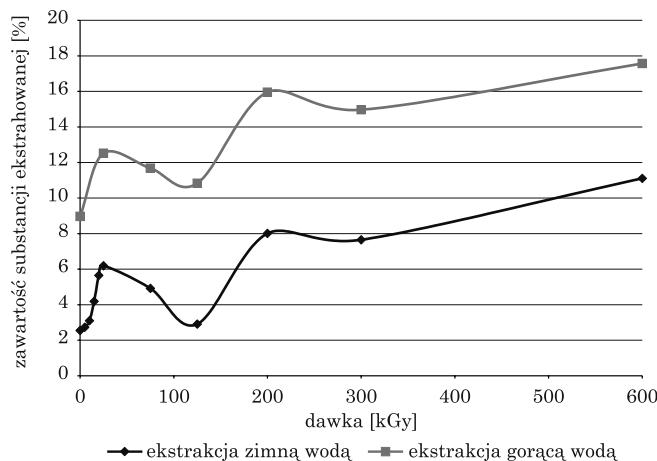


Rys. 2. Analiza rozkładu wielkości ziaren zmielonych próbek lignocelulozowych w zależności od warunków napromieniowania

Stwierdzono, że napromieniowanie materiału lignocelulozowego pozwala na uzyskanie większego stopnia rozdrobnienia przy tym samym nakładzie energii.

2.3.3. Zawartość substancji rozpuszczalnych w gorącej i zimnej wodzie

Zawartość substancji rozpuszczalnych w zimnej i gorącej wodzie określono metodą ekstrakcyjną. Substancje rozpuszczalne w wodzie to sole mineralne, barwniki, garbniki, niektóre cukry (glukoza, arabinoza, fruktoza) oraz częściowo glikozydy, pektyny i inne. Uzyskane wyniki potwierdziły, że napromieniowanie powoduje wzrost zawartości substancji rozpuszczalnych w zimnej i gorącej wodzie (rys. 3).



Rys. 3. Zależność zawartości substancji rozpuszczalnych w zimnej i gorącej wodzie w zależności od dawki promieniowania

Dla otrzymanych ekstraktów oznaczono zawartość glukozy oraz pH. Większą zawartość glukozy w ekstrakcie uzyskano dla próbek mielonych niż nieniemionych. Napromieniowanie dawką 25 kGy powodowało wzrost zawartości glukozy, następujący wraz ze wzrostem dawki do 600 kGy. Niszczenie struktury lignocelulozy wiąże się z uwalnianiem kwasu octowego, obserwowanym jako spadek wartości pH ekstraktu wodnego (Moisier i in. 2005). Obserwowany wzrost zawartości glukozy wraz ze wzrostem dawki napromieniowania wiązał się ze spadkiem pH ekstraktu. Świadczy to o niszczeniu struktury lignocelulozy i uwalnianiu zawartych w niej cukrów i kwasów.

2.3.4. Analiza termiczna

Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC) jest techniką określającą zmiany strumieni cieplnych absorbowanych przez próbki badaną i próbkę odniesienia w funkcji temperatury lub czasu. Powodem różnic tych strumieni cieplnych może być przemiana fizykochemiczna próbki lub różnica pojemności cieplnych próbek. Metoda ta pozwala określić temperatury przejścia fazowych oraz ich entalpie.

Dla wszystkich próbek zaobserwowano dwa przejścia fazowe. Pierwsze występuje w temperaturze ok. 100°C (odparowanie wody w warstwie zewnętrznej oraz wydzielenie lotnych substancji, takich jak: tlenek węgla, metan, etylen, dwutlenek węgla). Drugie występuje w temperaturze 300–400°C. W przypadku badanego materiału nie obserwuje się oddzielnego przemian fazowych dla rozkładu hemiceluloz, celulozy i ligniny. Świadczy to o złożoności budowy strukturalnej badanego materiału. Na podstawie krzywych DSC wyznaczono temperaturę T_d , będącą maksymalną temperaturą drugiego przejścia fazowego oraz entalpię H tej przemiany (tab. 1).

Zmiany właściwości termicznych materiału lignocelulozowego pod wpływem promieniowania jonizującego

Dawka (kGy)	T_d (°C)	H (J/g)	$T_{50\%}$ (°C)	$m_{50\%}$
0	373,09	99,46	354,93	30,10
25	377,42	104,0	343,18	20,63
150	370,21	69,42	341,77	25,53
300	366,75	51,48	333,83	24,56
600	365,88	58,23	321,22	22,05

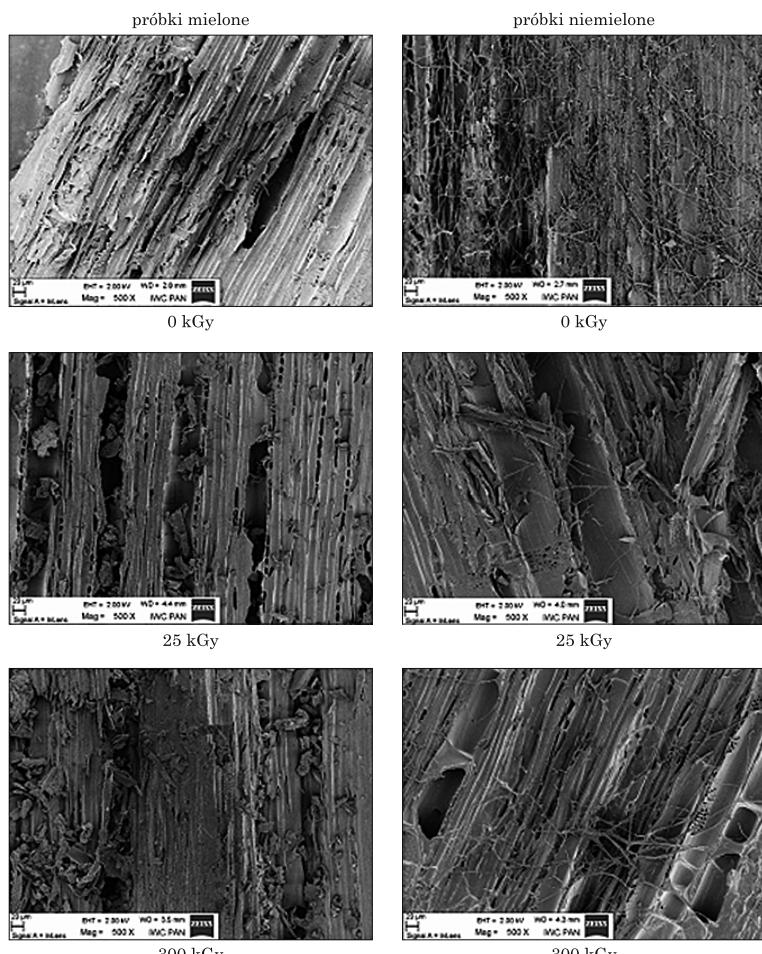
Analiza termograwimetryczna (TG) umożliwia śledzenie rozkładu związków chemicznych i mechanizmów reakcji między ciałami stałymi, zaś określenie procentowego ubytku masy w funkcji temperatury pozwala określić stabilność termiczną badanego materiału. Uzyskane wyniki wskazują, że poddanie badanego materiału działaniu promieniowania jonizującego obniża temperaturę, w jakiej zachodzi rozpad struktury lignocelulozowej w stosunku do materiału nienapromienowanego. Wraz ze wzrostem dawki promieniowania efekt ten jest bardziej widoczny. Na podstawie krzywych termograwimetrycznych wyznaczono temperaturę $T_{50\%}$, przy której zachodzi 50%

ubytek masy oraz pozostałość masy próbki $m_{50\%}$. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem dawki promieniowania materiał staje się mniej odporny na działanie temperatury (tab. 1).

2.3.5. Analiza morfologiczna

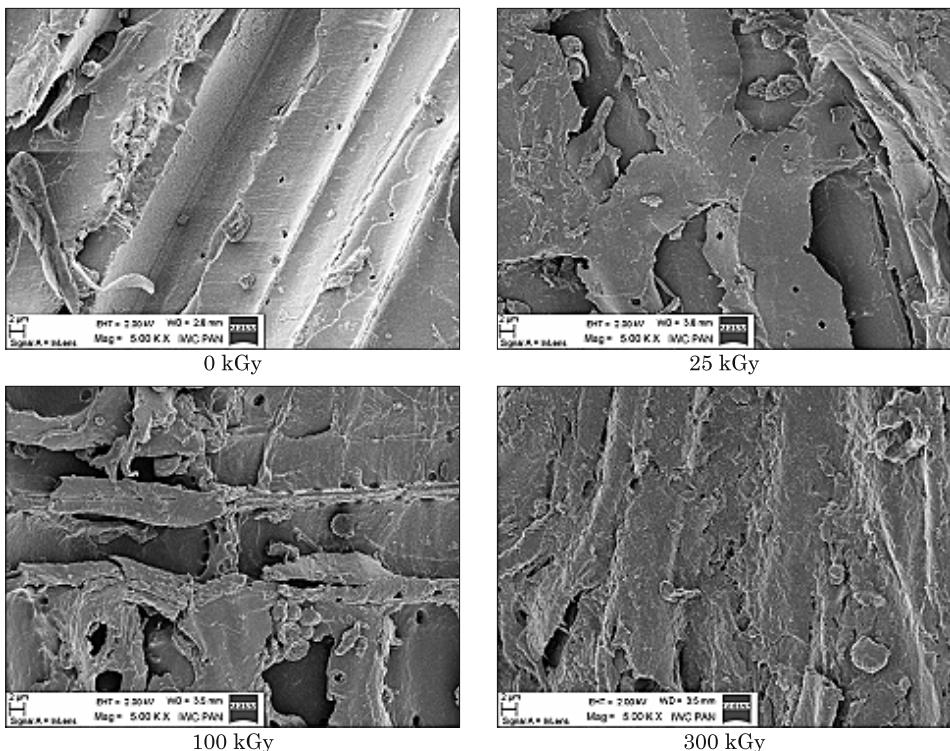
2.3.5.1. Skaningowa mikroskopia elektronowa

Za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego wykonano analizę struktury powierzchni materiałów lignocelulozowych oraz zmian zachodzących pod wpływem mielenia oraz napromieniowania. W próbkach niemielonych



Fot. 1. Powierzchnia próbek mielonych i niemielonych, napromieniowanych różnymi dawkami (powiększenie 500x)

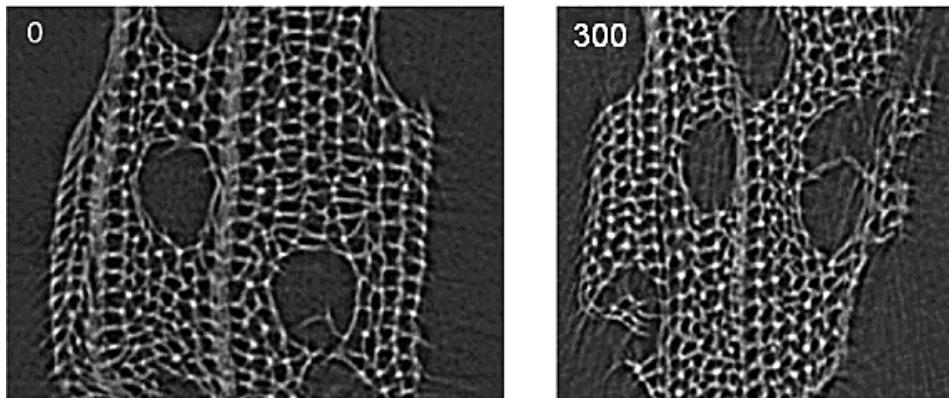
obserwuje się sieć cienkich włókien, która w procesie mielenia zostaje zniszczona (fot. 1). Napromieniowanie powoduje zmiany strukturalne powierzchni, widoczne pod mikroskopem elektronowym przy powiększeniu 5000x (fot. 2). Próbka nienapromieniowana posiada gładką, zwartą powierzchnię, napromieniowanie powoduje jej spękanie oraz wzrost porowatości.



Fot. 2. Powierzchnia próbek mielonych napromieniowanych różnymi dawkami (powiększenie 5000x)

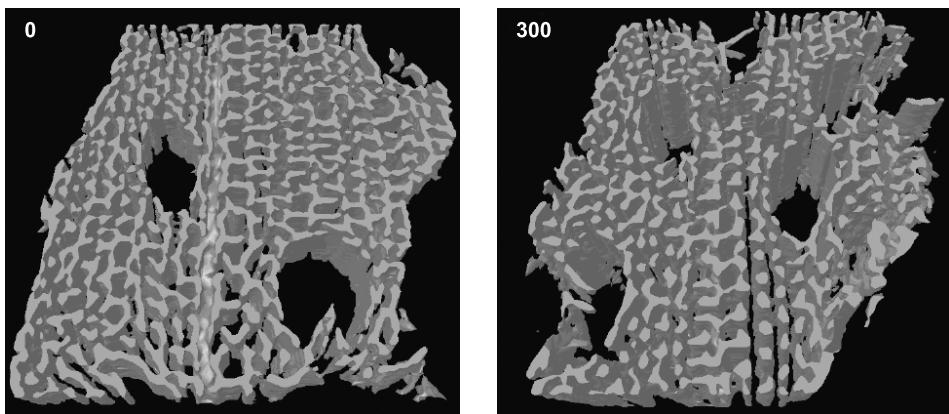
2.3.5.2. Mikrotomografia komputerowa

Rentgenowska mikrotomografia komputerowa jest nieniszcząca metodą charakteryzacji materiałów, pozwalającą na otrzymanie płaskiego lub przestrzennego obrazu badanego materiału. W odróżnieniu od klasycznej tomografii znajdującej zastosowanie w diagnostyce medycznej mikrotomografia pozwala na uzyskiwanie obrazów w bardzo wysokich rozdzielczościach, sięgających nawet 100 nm. Analizie poddano próbkę wyjściową oraz napromieniowaną dawką 300 kGy. Na otrzymanych obrazach przekrojów poprzecznych próbek (fot. 3) można zaobserwować obszary o zróżnicowanej gęstości tworzące układ włókien.



Fot. 3. Obrazy transmisyjne przekrojów poprzecznych badanych próbek

Ściany komórkowe materiałów lignocelulozowych zbudowane są z makrofibryli, te z kolei z mikrofibryli, w których skład wchodzi celuloza, hemiceluloza oraz lignina. Porównując przekroje poprzeczne próbek, można stwierdzić, że pod wpływem promieniowania następuje częściowe rozrywanie struktury włókien, niszczenie ścian komórkowych (zwłaszcza na powierzchni próbki). Na podstawie otrzymanych obrazów transmisyjnych sporządzono modele 3D struktury próbek lignocelulozy (fot. 4).



Fot. 4. Modele 3D struktury wewnętrznej materiału lignocelulozowego

Na modelach 3D można zaobserwować częściowe niszczenie struktury wewnętrznej pod wpływem promieniowania. Dla otrzymanych modeli wyznaczono porowatość, średnią średnicę porów, średnią grubość ścian oraz powierzchnię właściwą. Średnia średnica porów wynosiła $6,12 \mu\text{m}$, a średnia grubość ścian $4,27 \mu\text{m}$. Z pomiarów wykonanych na podstawie modelu struktury przestrzennej wynika, że promieniowanie jonizujące powoduje wzrost

średniej grubości ścian oraz spadek średniej średnicy porów. Wiąże się to również ze wzrostem porowatości o ok. 4,5%. Po napromieniowaniu dawką 300 kGy zwiększa się całkowita powierzchnia porów w przeliczeniu na całkowitą objętość próbki z 0,85 1/ μm na 0,95 1/ μm .

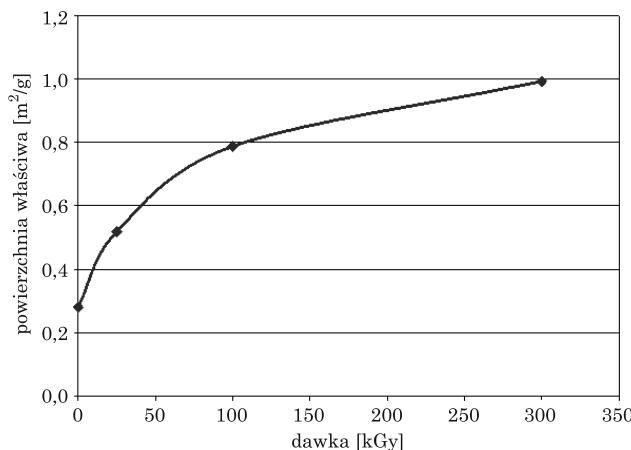
2.3.5.3. Charakterystyka powierzchni właściwej oraz porowatości

Informacje o strukturze badanego materiału lignocelulozowego można uzyskać w oparciu o następujące parametry:

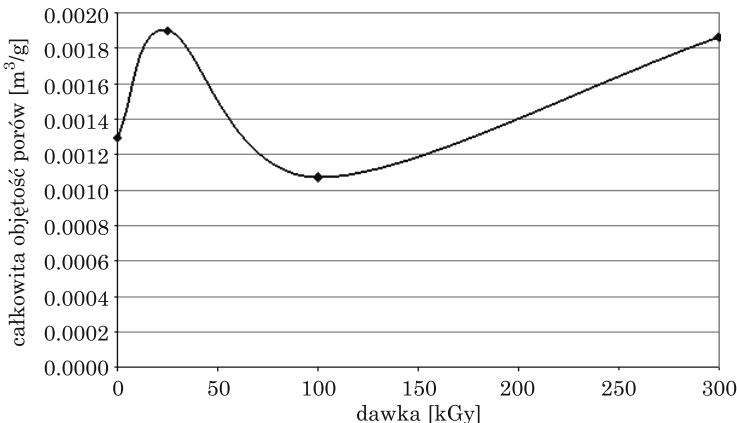
- powierzchnia właściwa (powierzchnia przypadająca na jednostkę masy adsorbentu wyrażana w m^2/g);
- kształt, objętość i dystrybucja porów (porozymetria).

Powierzchnię właściwą materiału lignocelulozowego przed i po napromieniowaniu dawkami od 25 do 300 kGy określono standardową metodą analizy izoterm adsorpcji niskotemperaturowej sorpcji azotu (77 K) w oparciu o liniową formę równania izotermy BET (metoda BET). Do wyznaczenia objętości, wielkości i rozkładu porów adsorbentu zastosowano metodę opracowaną przez Barreta, Joynera, Halendy (BJH).

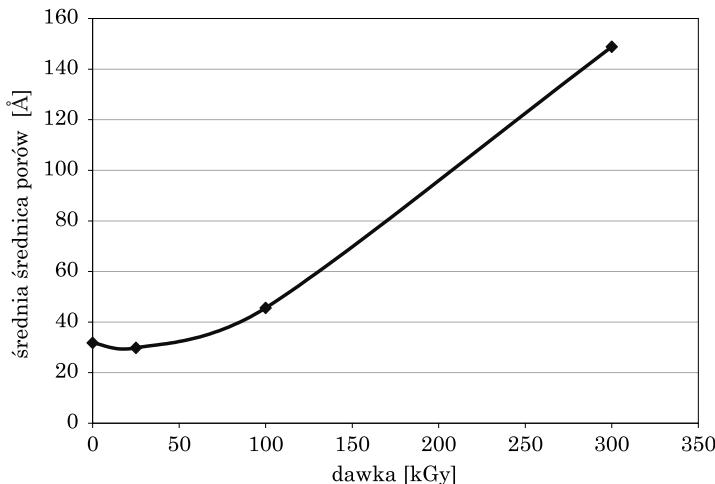
Uzyskane wyniki pomiarów powierzchni właściwej, średniej średnicy porów oraz całkowitej objętości porów przedstawiono na rysunkach 4–6. Na ich podstawie można stwierdzić, że napromieniowanie próbek dawkami od 25 do 300 kGy powodowało wzrost powierzchni właściwej powyżej 0,9 m^2/g , a także wzrost średniej średnicy porów do ponad 140 Å dla 300 kGy. Jednakże nie obserwowano znaczących zmian całkowitej porowatości próbek. Wskazuje to na niszczenie struktury lignocelulozy, prowadzące do niszczenia małych porów i powstawania większych.



Rys. 4. Zależność powierzchni właściwej materiału lignocelulozowego od dawki promieniowania



Rys. 5. Zależność całkowitej objętości porów materiału lignocelulozowego od dawki promieniowania



Rys. 6. Zależność średniej średnicy porów materiału lignocelulozowego od dawki promieniowania

2.4. Dyskusja i podsumowanie

Materiały lignocelulozowe są źródłem biomasy, która po odpowiednim przygotowaniu może stanowić surowiec do produkcji biopaliw. Zastosowanie promieniowania jonizującego w celu zwiększenia wydajności hydrolizy celulozy jest przedmiotem licznych badań. Przedstawione powyżej wyniki charakteryzuje różnorodność zmian zachodzących pod wpływem promieniowania. Wzrost ilości substancji ekstrahowanych w zimnej i gorącej wodzie, wzrost zawartości glukozy, a także spadek trwałości termicznej badanych

materiałów wraz ze wzrostem dawki promieniowania świadczą o następującej degradacji. Obserwowane zmiany w strukturze badanego materiału dotyczą zmiany powierzchni, wzrostu porowatości oraz wzrostu średnicy porów. Zmiany te powinny przyczynić się do wzrostu wydajności procesu hydrolizy enzymatycznej dzięki zwiększeniu dostępności materiału dla enzymów i ułatwieniu transportu produktów hydrolizy.

Urządzenia radiacyjne stają się coraz bardziej powszechnie. W nowoczesnych modelach istnieje możliwość doboru parametrów pracy pod kątem prowadzenia określonego procesu, co pozwala na znaczne obniżenie kosztów.

Do głównych zalet wstępnej obróbki materiałów lignocelulozowych za pomocą promieniowania jonizującego w postaci wiązki elektronów należy zaliczyć: łatwość prowadzenia procesu w skali przemysłowej oraz wysoką wydajność, możliwość prowadzenia procesu w sposób ciągły. Technologie radiacyjne pozwalają na eliminację konieczności stosowanie środków chemicznych, w efekcie wywierają znacznie mniejszy negatywny wpływ na środowiska naturalne.

Literatura

- Bak J.S., Ko J.K., Han Y.H., Lee B.Ch., Choi I.G., Kim K.H. 2009. *Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment*. *Bioresource Technol.*, 100: 1285–1290.
- Chung B.Y., Lee J.T., Bai H.-W., Kim U.-J., Bae H.-J., Gon Wi S., Cho J.-Y. 2012. *Enhanced enzymatic hydrolysis of poplar bark by combined use of gamma ray and dilute acid for bioethanol production*. *Radiat. Phys. Chem.*, 81(8): 1003–1007.
- Duarte C.L., Mori M.N., Oikawa H., Nagatomi H.R., Finguerut J., Celia M., Galvao A. 2009. *Ionizing radiation conversion of lignocellulosic biomass from sugarcane bagasse to production ethanol biofuel*. IAEA Report, Vienna.
- Duarte C.L., Ribeiro M.A., Oikawa H., Mori M.N., Napolitano C.M., Galvão C.A. 2012. *Electron beam combined with hydrothermal treatment for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse*. *Radiat. Phys. Chem.*, 81(8): 1008–1011.
- Karthika K., Arun A.B., Rekha P.D. 2012. *Enzymatic hydrolysis and characterization of lignocellulosic biomass exposed to electron beam irradiation*. *Carbohyd. Polym.*, 90 (2): 1038–1045.
- Khan A.W., Labrie J.-P., McKeown J. 1986. *Effect of electron-beam irradiation pretreatment on the enzymatic hydrolysis of softwood*. *Biotechnol. Bioeng.*, 27: 1449–1453.
- Kumakura M., Kaetsu I. 1978. *Radiation-induced decomposition and enzymatic hydrolysis of cellulose*. *Biotechnol. Bioeng.*, 20: 1309–1315.
- Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P. 2009. *Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production*. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48: 3713–3729.
- Ladisch M. 2005. *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*. *Bioresource Technol.*, 96: 673–686.
- Lam N.D., Nagasawa N., Kume T. 2000. *Effect of radiation and fungal treatment on lignocelluloses and their biological activity*. *Radiat. Phys. Chem.*, 59: 393–398.

- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M. 2005. *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*. Bioresource Techno., 96: 673–686.
- Saeman J.F., Millett M.A. 1952. *Effect of high-energy cathode rays on cellulose*. Ind. Eng. Chem., 44: 2848–2852.
- Shin S.-J., Sung Y.S. 2008. *Improving enzymatic hydrolysis of industrial hemp (*Cannabis sativa L.*) by electron beam irradiation*. Radiat. Phys. Chem., 77: 1034–1038.

3. Wpływ soli nieorganicznych i środków powierzchniowo czynnych na proces wstępnej hydrolizy celulozy i materiałów lignocelulozowych

*Maciej Góra, Zbigniew Adamczyk, Małgorzata Nattich-Rak,
Bartłomiej Kozik, Krzysztof Jamroży, Dorota Dronka-Góra*

3.1. Wprowadzenie i cel badań

Ze względu na brak informacji w literaturze dotyczących wpływu środków powierzchniowo czynnych na proces wstępnej hydrolizy mikrokryystalicznej celulozy i biomasy lignocelulozowej, przeprowadzono badania nad tymi zagadnieniami. Zakres przeprowadzonych prac był następujący:

- wyznaczenie rozkładu wielkości oraz morfologii krystalitów celulozy;
- określenie wpływu różnych soli nieorganicznych na efektywność procesu hydrolizy celulozy;
- dobór optymalnych parametrów (temperatury i składu roztworu) hydrolizy celulozy;
- wyznaczenie wpływu surfaktantów jonowych i niejonowych na stopień dyspersji krystalitów celulozy poddanej obróbce w zoptymalizowanych warunkach;
- dobór optymalnego składu surfaktantów zapewniających efektywną dyspersję celulozy;
- zastosowanie i ocena przydatności opracowanej dla celulozy procedury do wstępnej hydrolizy biomasy lignocelulozowej.

3.2. Aparatura i metodyka badań

Badania nad degradacją mikrokryystalicznej celulozy prowadzono w reaktorze ciśnieniowym (autoklawie) Roth Model II, pozwalającym na pracę pod ciśnieniem do 200 bar w temperaturze do 300°C (fot. 1). Autoklaw ten posiada zintegrowane mieszadło magnetyczne pozwalające na ograniczenie procesu sedymentacji wprowadzonych zawiesin oraz równomierną dystrybucję ciepła i stężeń reagentów wewnętrz cylindra.



Fot. 1. Autoklaw Roth Model II

Rozkłady wielkości cząstek w badanych suspencjach wyznaczano przy użyciu dyfraktometru laserowego Beckman Coulter LS 13 320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer (fot. 2). Zakres pomiarowy tego aparatu wynosi od 40 nm do 2000 μm . Zasada działania urządzenia opiera się na teorii dyfrakcji Fraunhofera i w pomiarze wielkości cząstek wykorzystuje fakt, że padający na cząstkę promień światła zostaje rozproszony, tworząc charakterystyczny, symetryczny rozkład kątowy natężenia światła rozproszonego, tzw. wzór dyfrakcyjny (LS 13 320 Particle Size Analyzer (table of contents manual), Beckman Coulter Inc.; Particle Size Analyzers by Brookhaven Instruments 2013).



Fot. 2. Aparat Beckman Coulter LS 13320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer

Analizowane próbki za każdym razem przed pomiarami poddawano homogenizacji przez wytrząsanie. Do analizy pobierano zawiesinę w ilości ok. 0,1 ml, która w komorze pomiarowej dyfraktometru laserowego była rozcieńczana w 125 ml wody destylowanej. Ocena stopnia degradacji celulozy była możliwa dzięki porównaniu rozkładów wielkości próbek modyfikowanych z próbką wzorcową – niepoddaną degradacji mikrokryystalicznej celulozą zawieszoną w odpowiednim roztworze.

W celu zobrazowania zmian powierzchni przeprowadzono badania:

- a) metodą SEM z wykorzystaniem wysokorozdzielczego elektronowego mikroskopu skaningowego Jeol JSM-7500F z przystawką EDS-INCA PentaFETx3 (fot. 3) oraz napylarką K575X Turbo Sputter Coater;
- b) metodą mikroskopii sił atomowych przy zastosowaniu aparatu NTegra firmy NT-MDT (fot. 4).



Fot. 3. Skaningowy mikroskop elektronowy Jeol JSM-7500F z przystawką EDS INCA PentaFETx3

Próbki do pomiarów SEM przygotowano przez osadzenie mikrokryystalicznej celulozy na mice i napylenie jonami chromu, a pomiary prowadzono przy napięciu przyspieszającym 15 kV.

W odróżnieniu od mikroskopii optycznej mikroskopia sił atomowych (ang. *Atomic Force Microscopy – AFM*) jest techniką umożliwiającą rejestrację trójwymiarowej struktury badanego materiału na drodze mechanicznego oddziaływania części pomiarowej aparatu z próbką (Zhang 2009; Braga i Ricci 2004).



Fot. 4. Mikroskop sił atomowych (model NTegera firmy NT-MDT)

Próbki do obrazowania AFM przygotowano przez osadzenie cząstek badanej celulozy na mice (1 µL celulozy z dodatkami został rozcieńczony wodą destylowaną w stosunku objętościowym 1:75). Tak przygotowane próbki po wysuszeniu obrazowano w trybie przerywanego kontaktu (ang. *tapping mode*).

Ponadto, ze względu na znaczący wpływ kwasowości układu na skuteczność hydrolizy materiałów lignocelulozowych (Taherzadeh i Karimi 2007), przeprowadzono badania pH na pehametrze firmy ELMETRON C 505 wyposażonym w elektrodę Ionode IJ-44C.

3.3. Materiały i odczynniki

W przeprowadzonych badaniach analizowanym układem modelowym poddawanym obróbce hydrotermalnej były próbki zawiesiny mikrokryystalicznej celulozy zawierające 10 g celulozy w 100 mL elektrolitu zawierającego następujące sole nieorganiczne: CaCl_2 , MgCl_2 , K_2SO_4 , NaH_2PO_4 lub kwas ortofosfory(V).

Stosowano również następujące surfaktanty:

a) kationowe:

– bromek heksadecyltrimetyloamoniowy (CTAB);

b) anionowe:

– dodecylosiarczan(VI) sodu (SDS);

c) niejonowe:

- glikol polietylenowy o masie cząsteczkowej 400 (PEG400),
- glikol polietylenowy o masie cząsteczkowej 4000 (PEG4000),
- Walloxen LM50, czyli poliglikoloetery alkoholi laurylomyristyloowych (WALLOXEN).

Zastosowane do analizy materiały pochodziły z firm Sigma-Aldrich oraz POCH. Do badań nad hydrolizą biomasy lignocelulozowej wykorzystano zrębki topoli i wierzby dostarczone przez Centrum Badań Energii Odnawialnej UWM w Olsztynie.

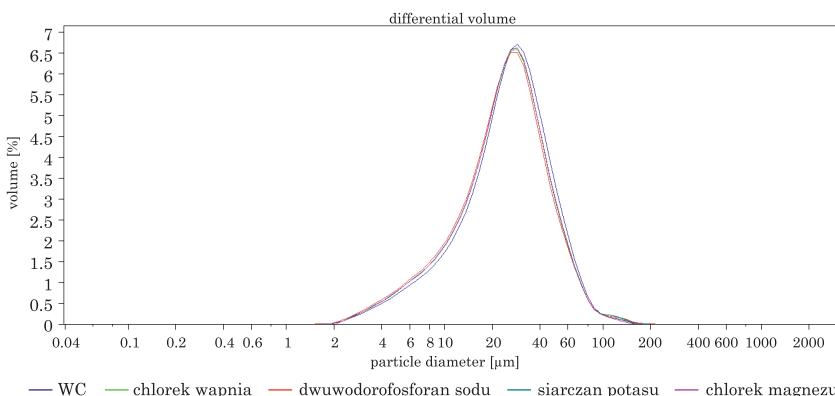
3.4. Wyniki pomiarów i dyskusja

3.4.1. Wpływ ilości dodatku soli i jej rodzaju na stopień degradacji mikrokryystalicznej celulozy

W celu dobrania odpowiednich parametrów stężenia i rodzaju soli oraz czasu prowadzenia degradacji, które powodowałyby największe zmiany w rozmiarach substancji wzorcowej, przeprowadzono wstępne badania z zawartością 0,5%, 1%, 2% i 4% dodatku w temperaturze 100°C pod ciśnieniem atmosferycznym i zmiennym czasie obróbki w granicach od 0,5 do 4 h.

Jako próbę odniesienia przyjęto zawiesinę substancji wzorcowej w wodzie destylowanej bez dodatków i niepoddaną obróbce hydrotermalnej.

Zaobserwowano, że przy tych parametrach rozkład wielkości cząstek mikrokryystalicznej celulozy w niewielkim stopniu ulega zmianie dopiero przy zastosowaniu stężeń soli w ilości równej lub wyższej od 2% wagowych. Największe zmniejszenie rozmiarów cząstek wzorca wystąpiło przy zastosowaniu dwuwodorofosforanu sodu (rys. 1.).



Rys. 1. Rozkłady wielkości cząstek dla próbek mikrokryystalicznej celulozy po obróbce przy zastosowaniu 4% CaCl_2 , NaH_2PO_4 , K_2SO_4 i MgCl_2 (100°C, 2 h)

Dla tej właśnie soli w kolejnym etapie przeprowadzono szczegółowe badania nad wpływem temperatury na proces degradacji mikrokrytalicznej celulozy. Dla porównania oceny wpływu działania soli monosodowej kwasu fosforowego(V) jako układ odniesienia zbadano również zawiesiny zawierające rozcieńczony H_3PO_4 .

W związku z powyższym stało się zasadne porównanie wpływu medium dyspersyjnego na rozkłady wielkości cząstek wzorca mikrokrytalicznej celulozy. Wykonano analizę próbek wzorca o standardowym stężeniu zawieszzonego w wodzie (WC), 2% roztworze wodnym NaH_2PO_4 (WCs) i 2% H_3PO_4 (WCa). Próbek wzorców nie poddawano obróbce hydrotermicznej.

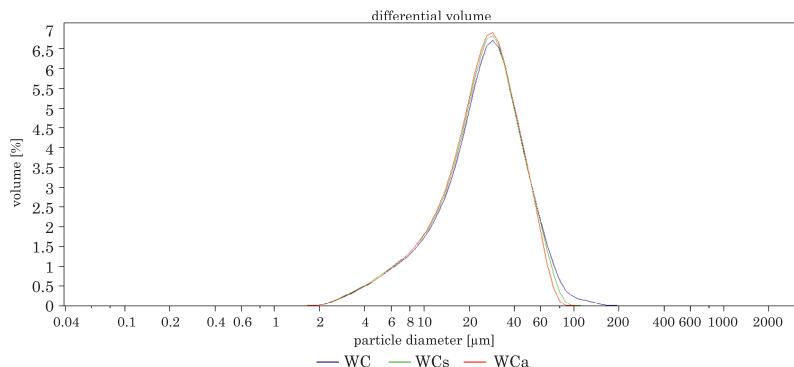
Wyniki przedstawiono w tabeli 1 i na rysunku 2. Ze względu na asymetryczny rozkład wielkości cząstek w badanych próbkach nie jest możliwe ich dobre scharakteryzowanie przez podanie jako wyniku analizy jednej wartości liczbowej. Dlatego też w tabeli 1 przedstawiono trzy parametry charakteryzujące wielkość cząstek, a mianowicie:

- 1) średnią – stanowiąca średnią arytmetyczną z wielkością cząstek;
- 2) medianę – określającą wielkość cząstki, powyżej i poniżej której znajduje się jednakowa ich liczba;
- 3) dominantę (modę) – będącą wielkością cząstki najczęściej występującej w próbce.

Z pomiarów wzorców mikrokrytalicznej celulozy wynika, że dominującą objętościowo frakcją we wszystkich próbkach (moda) są cząstki o rozmiarze 34,60 μm (tab. 1). Różnice obserwuje się jedynie dla frakcji o rozmiarach >100 μm (rys. 2), co może sugerować, że w próbce o najniższym pH asocjacja jest najmniejsza.

Tabela 1
Substancje wzorcowe

Symbol	Ośrodek dyspersyjny (bez ogrzewania)	Średnia (μm)	Medianą (μm)	Moda (μm)	pH
WC	woda	25,20	22,83	34,60	6,31
WCs	2% NaH_2PO_4	24,02	22,16	34,60	4,44
WCa	2% H_3PO_4	23,47	22,06	34,60	1,39



Rys. 2. Rozkłady wielkości cząstek dla próbek wzorcowych

Ze względu na niewielkie różnice (pod względem rozkładów wielkości cząstek) pomiędzy wzorcami jako najbardziej uniwersalną próbki odniesienia wybrano wzorzec WC, czyli próbki, gdzie medium dyspersyjnym była woda.

3.4.2. Wpływ temperatury na hydrolizę mikrokryystalicznej celulozy dla układów zawierających NaH_2PO_4 i H_3PO_4

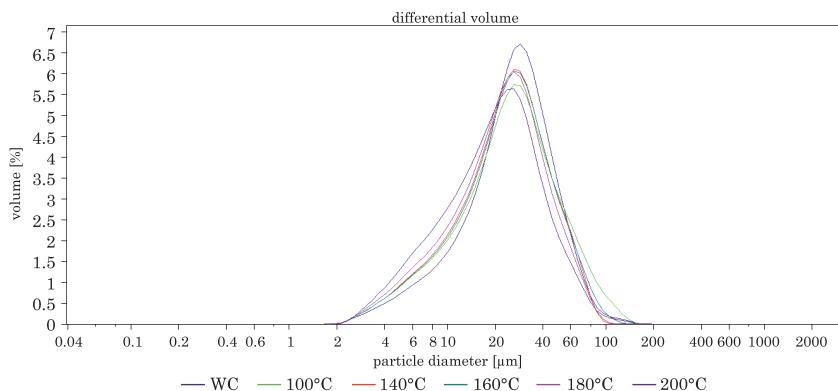
Dla wyselekcjonowanego układu dwuwodorofosforanu sodu i układu porównawczego zawierającego kwas ortofosforowy przeprowadzono analizę zmian rozkładu wielkości cząstek celulozy w funkcji temperatury. Procesy hydrolizy prowadzono w temperaturach w zakresie 120–200°C, co powodowało wzrost ciśnienia wewnętrz autoklawu w zakresie 0,5–8 bar.

W tabeli 2 zestawiono warunki prowadzonej hydrolizy oraz symbolikę oznaczania dla próbek poddanych analizie.

Tabela 2
Opis próbek

Symbol Warunki	A	B	C	D
100°C, 4 h				
120°C, 2 h				
140°C, 2 h				
160°C, 2 h	2% NaH_2PO_4	4% NaH_2PO_4	2% H_3PO_4	2% NaH_2PO_4 + 2% H_3PO_4
180°C, 2 h				
200°C, 2 h				
140°C, 4 h				

Na rysunku 3 przedstawiono przykładowy, charakterystyczny dla wszystkich pomiarów rozkład wielkości cząstek dla mikrokryystalicznej celulozy. W tym wypadku była ona modyfikowana 2% dwuwodorofosforanem sodu w różnych temperaturach. Największe zmiany w serii A względem próbki wzorcowej obserwuje się dla degradacji prowadzonej w temperaturze 180°C w czasie 2 h. Bardzo zbliżone rezultaty uzyskano dla procesu prowadzonego w temperaturze 160°C, który z punktu widzenia nakładu energii jest bardziej ekonomiczny.



Rys. 3. Rozkład wielkości cząstek próbek celulozy dla hydrolizy 2% NaH_2PO_4

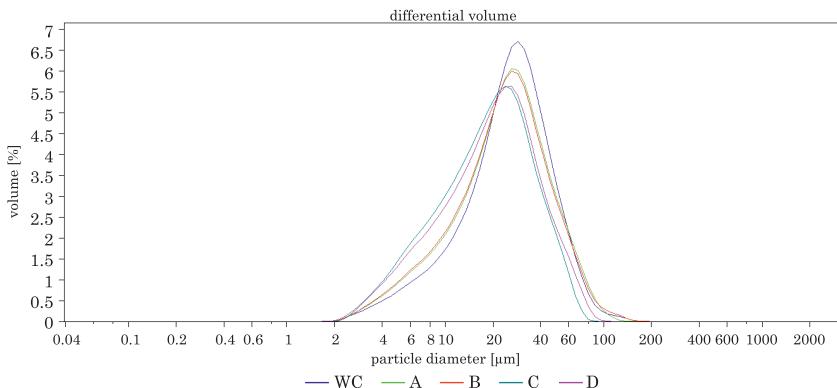
Oprócz wpływu temperatury i czasu obróbki celulozy sprawdzono również wpływ stężenia soli. Zwiększenie stężenia NaH_2PO_4 do 4% w serii B powoduje w porównaniu do serii A wzrost degradacji mikrokryystalicznej celulozy jedynie dla procesu prowadzonego w najniższej temperaturze (tj. 140°C) w czasie 2 h. Nie obserwuje się korzystnych zmian dla prób prowadzonych w wyższych temperaturach ani w wydłużonym czasie.

W kolejnym etapie przeprowadzono badania z zastosowaniem 2% H_3PO_4 jako czynnika hydrolizującego mikrokryystaliczną celulozę. Podobnie jak w przypadku próbek oznaczonych symbolem A, najlepsze rezultaty otrzymano dla procesu prowadzonego w temperaturze 160°C w standardowym czasie 2 h. Ponadto zaobserwowano, że zbyt wysoka temperatura (200°C) powoduje przypuszczalnie agregację celulozy.

Przeprowadzono również badania z zastosowaniem jednocześnie kwasu i soli jako czynnika modyfikującego, przy czym uzyskane wyniki rozkładów wielkości cząstek badanej celulozy lokują się na poziomie obserwowanym dla 2% H_3PO_4 , aczkolwiek w najwyższych temperaturach nie odnotowano agregacji jak dla zawiesiny w kwasie.

Podsumowując tę część badań, stwierdzono, że oba czynniki hydrolizujące mają pozytywny wpływ na rozkład mikrokryystalicznej celulozy, co przekłada się na większą wydajność późniejszej hydrolizy enzymatycznej (Pedersen

i Meyer 2009). Rysunek 4 przedstawia rozkład wielkości cząstek dla pomiarów serii od A do D dla temperatury 160°C, w której osiągnięto najlepsze rezultaty. Zaobserwowano, że w przypadku zastosowania kwasu lub mieszaniny kwasu i soli nastąpiło największe przesunięcie maksimum w kierunku mniejszych cząstek, czyli dodatek tych czynników spowodował większą degradację mikrokryystalicznej celulozy, a średnia wielkość cząstek spadła w tych układach o ponad 20%.



Rys. 4. Rozkład wielkości cząstek próbek celulozy dla hydrolizy NaH_2PO_4 i/lub H_3PO_4 w temperaturze 160°C

3.4.3. Wyznaczenie wpływu surfaktantów jonowych i niejonowych na stopień dyspersji krystalitów celulozy

Przeprowadzenie charakterystyki próbek zawierających nieorganiczne modyfikatory utworzyło punkt odniesienia do oceny wpływu modyfikacji mikrokryystalicznej celulozy z zastosowaniem surfaktantów.

Oczekiwany wpływem surfaktantów na przebieg procesu była zmiana właściwości powierzchni ziaren mikrokryystalicznej celulozy w sposób ułatwiający penetrację roztworu do ich wnętrza. Pozwoliło to na wyselekcjonowanie odpowiedniego środka powierzchniowo czynnego ułatwiającego dalszą hydrolizę celulozy. Zastosowane surfaktanty zostały opisane w podrozdziale 3.3. Kryterium doboru najbardziej efektywnego surfaktantu jest jego minimalne stężenie, pozwalające na poprawę efektywności procesu wstępnej hydrolizy oraz odporność na degradację w środowisku kwaśnym w podwyższonej temperaturze, czyli warunkach właściwej hydrolizy celulozy do oligosacharydów.

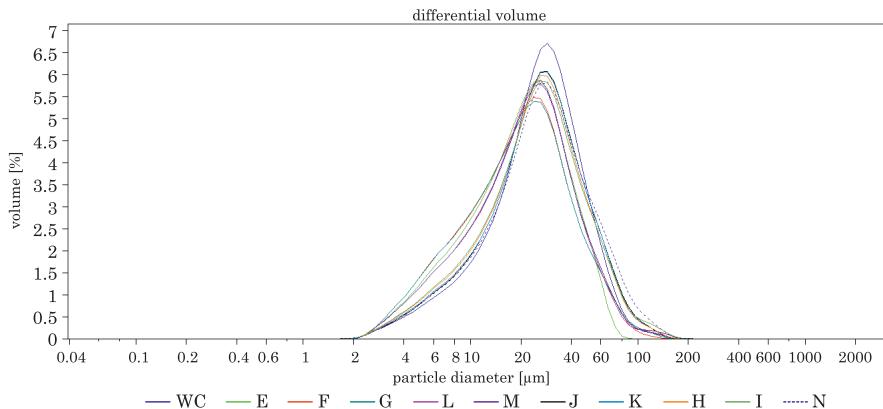
Ocena wpływu dodatku surfaktantów na proces wstępnej hydrolizy celulozy została dokonana na podstawie porównania z procesem prowadzonym bez ich dodatku. We wszystkich analizowanych przypadkach (tab. 3) stwierdzono zmniejszenie średniej wielkości ziaren modyfikowanej mikrokryystalicznej

celulozy w stosunku do próbki wyjściowej. Porównując ze sobą rozkład wielkości cząstek dla surfaktantów jonowych, kationowych i anionowych (rys. 5), obserwujemy lepsze wyniki dla surfaktantów jonowych niż niejonowych. Ponadto wprowadzenie surfaktanta niejonowego powoduje wzrost liczby cząstek w zakresie $>100 \text{ } \mu\text{m}$, a co za tym idzie wzrost średniej wielkości cząstek. Wyniki pomiarów dystrybucji rozmiarów ziaren mikrokryystalicznej celulozy degradowanej z dodatkiem niejonowych surfaktantów wskazują na małe zróżnicowanie dla różnych zastosowanych warunków hydrolizy. Silniej natomiast zaznacza się tendencja surfaktantów niejonowych do promowania agregacji w niższych temperaturach. Bez względu na warunki hydrolizy próbek z surfaktantami niejonowymi, ich stężenie i masę cząsteczkową układy te charakteryzowały się gorszymi parametrami rozdrobnienia mikrokryystalicznej celulozy niż analogi jonowe.

Tabela 3
Zestawienie próbek modyfikowanych dodatkiem surfaktanta

Substancja modyfikująca \ Warunki	CTAB 0,1%	CTAB 0,005%	SDS 0,005%	PEG400 0,01%	PEG4000 0,01%	WALLOXEN 0,1%
100°C, 4 h, 2% H ₃ PO ₄	E	F	G	–	L	M
120°C, 2 h, 2% H ₃ PO ₄						
140°C, 2 h, 2% H ₃ PO ₄						
160°C, 2 h, 2% H ₃ PO ₄						
180°C, 2 h, 2% H ₃ PO ₄						
100°C, 4 h, 2% NaH ₂ PO ₄	–	J	K	H	I	N
120°C, 2 h, 2% NaH ₂ PO ₄						
140°C, 2 h, 2% NaH ₂ PO ₄						
160°C, 2 h, 2% NaH ₂ PO ₄						

Porównanie oddziaływania różnych typów surfaktantów sugeruje, że ich wpływ ma raczej związek z ładunkiem hydrofilowego fragmentu surfaktanta i powierzchni celulozy niż z możliwością występowania katalizy micelarnej w badanych układach. Zaobserwowano również, że lepsze wyniki otrzymano przy zastosowaniu kwasu jako czynnika hydrolizującego. Najlepsze wyniki osiągnięto dla próbek F i G.



Rys. 5. Rozkład wielkości cząstek próbek celulozy dla hydrolizy w temperaturze 160°C w układach z dodatkiem surfaktantów

3.4.4. Wpływ dodatku surfaktantów na zmiany morfologii oraz właściwości fizykochemicznych celulozy

Przeprowadzone badania pH dla różnych warunków degradacji pozwoliły na poczynienie szeregu obserwacji. Dla próbek w kwasie podwyższone pH względem próbki wzorcowej (tab. 1) występuje dla próbki modyfikowanej surfaktantem kationowym. W przypadku próbek celulozy poddanych obróbce termicznej, zawierających jako czynnik hydrolizujący kwas i dodatek surfaktanta obserwuje się, że mają one systematycznie niższe pH niż próbka zawierająca wyłącznie kwas. Dla próbek z surfaktantem niejonowym pH jest najniższe w porównywanej serii próbek opartych o 2% H_3PO_4 . Ponadto nie odnotowano istotnych różnic związanych ze zmianą temperatury degradacji czy też ilości wprowadzonego dodatku.

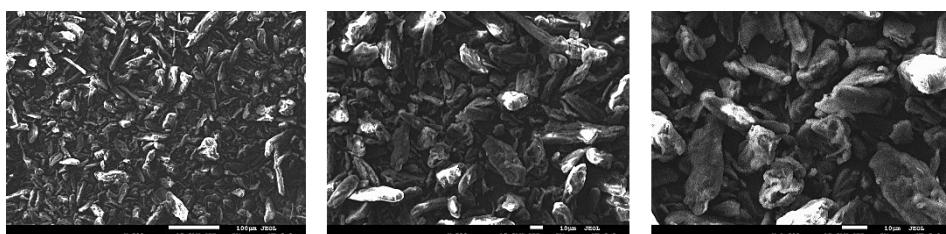
Zastosowanie mieszaniny kwasu i jego soli monosodowej pozwala buforować pH. Podobny wpływ (w sensie zwężenia zakresu pH) mają dodatki surfaktanta w roztworach NaH_2PO_4 , gdyż największe różnice w pH zaobserwowano dla próbki niezawierającej surfaktanta. Co więcej, w przypadku zastosowania soli jako czynnika hydrolizującego występuje wyraźne zjawisko systematycznego spadku pH w zależności od temperatury prowadzonego procesu.

W tabeli 4 przedstawiono zakresy pH dla poszczególnych układów.

Analizę morfologii krystalitów celulozy metodą SEM rozpoczęto od badań dla próbki wzorcowej (rys. 6). Zaobserwowało, że struktura jest mało wykrywalna, a cząstki mało rozdrobnione i o mało charakterystycznych krawędziach.

Tabela 4
Pomiary pH próbek celulozy

Symbol	Warunki	pH
A	100-200°C, 2-4 h, 2% NaH ₂ PO ₄	4,36-3,13
B	140-200°C, 2-4 h, 4% NaH ₂ PO ₄	4,20-3,26
J	100-160°C, 2-4 h, 2% NaH ₂ PO ₄ + 0,005% CTAB	4,41-4,00
K	100-160°C, 2-4 h, 2% NaH ₂ PO ₄ + 0,005% SDS	4,43-4,05
H	100-160°C, 2-4 h, 2% NaH ₂ PO ₄ + 0,01% PEG400	4,35-3,85
I	100-160°C, 2-4 h, 2% NaH ₂ PO ₄ + 0,01% PEG4000	4,31-3,88
N	100-160°C, 2 h, 2% NaH ₂ PO ₄ + 0,01% WALLOXEN	4,40-3,91
D	120-180°C, 2 h, 2% H ₃ PO ₄ + 2% NaH ₂ PO ₄	2,00-1,94
C	100-180°C, 2-4 h, 2% H ₃ PO ₄	1,60-1,53
E	120-180°C, 2 h, 2% H ₃ PO ₄ + 0,1% CTAB	1,50-1,42
F	100-180°C, 2-4 h, 2% H ₃ PO ₄ + 0,005% CTAB	1,44-1,40
G	100-180°C, 2-4 h, 2% H ₃ PO ₄ + 0,005% SDS	1,44-1,38
L	100-160°C, 2-4 h, 2% H ₃ PO ₄ + 0,01% PEG4000	1,39-1,34
M	100-160°C, 2-4 h, 2% H ₃ PO ₄ + 0,01% WALLOXEN	1,41-1,31

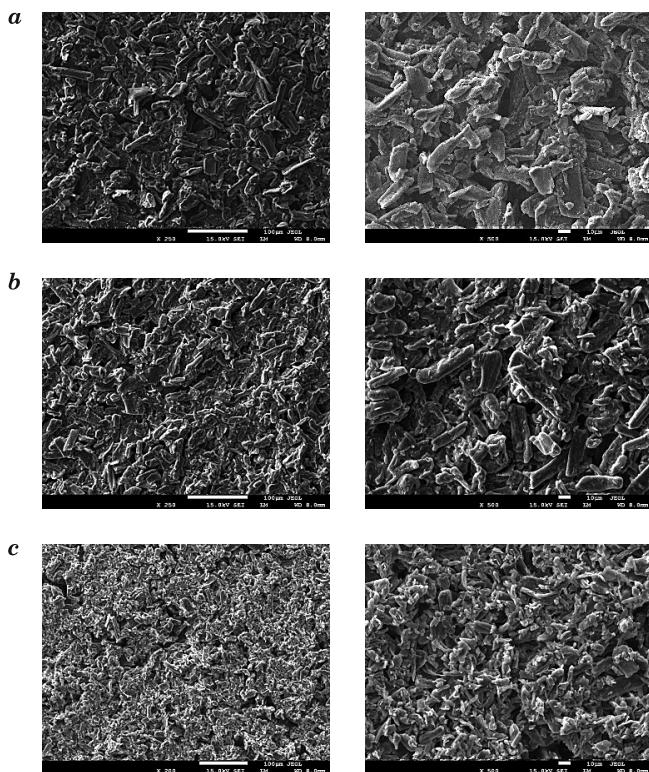


Rys. 6. Topologia warstw cząstek celulozy wzorcowej dla różnych powiększeń

Wprowadzenie kwasu lub jego soli oraz wzrost temperatury obróbki powoduje wzrost krystaliczności układu, cząstki nadal są mało rozdrobnione, jednakże ich krawędzie stały się wyraźne. Obserwacja ta jest zgodna z wcześniejszymi doniesieniami (Tang i in. 2011).

Analogiczne analizy przeprowadzono dla układów zawierających dodatek surfaktanta. Wyniki badań przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego dla wszystkich układów zawierających surfaktant kationowy CTAB

przedstawiono na rysunku 7. Są to zdjęcia próbki modyfikowanej surfaktantem kationowym CTAB dla najlepszej wytypowanej z badań wielkości cząstek po hydrolizie w temperaturze wynoszącej 160°C. Zaobserwowało, że wprowadzenie czynnika modyfikującego, jakim jest surfaktant, spowodowało zmniejszenie wielkości cząstek i zmiany kształtu. Cząstki stają się regularne, z wyraźnie zaznaczonymi krawędziami. Jednakże rodzaj czynnika hydrolizującego czy ilość surfaktanta nie wpływa znacząco na różnice pomiędzy próbками.

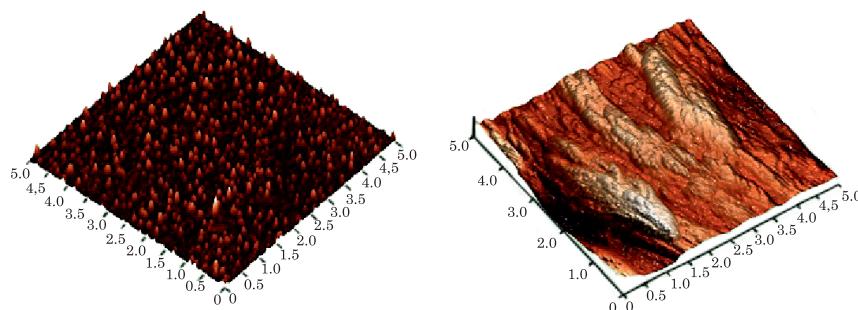


Rys. 7. Topologia monowarstw cząstek celulozy modyfikowanej a) 2% H_3PO_4 +0,1% CTAB, b) 2% H_3PO_4 +0,005% CTAB, c) 2% NaH_2PO_4 +0,005% CTAB. Warunki hydrolizy: temperatura 160°C w czasie 2 h

Zarówno dla surfaktantów anionowych, jak i niejonowych odnotowano wyłącznie niewielkie różnice pomiędzy poszczególnymi skanami. Z tego też względu wykonano badania związane ze zmianami powierzchni przy zastosowaniu mikroskopii sił atomowych (AFM).

Badania z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych pozwoliły również na zaobserwowanie interesującego zjawiska. W przypadku próbek modyfikowanych tylko kwasem fosforowym lub jego solą sodową powierzchnie ziaren

mikrokrystalicznej celulozy są bardzo równomiernie pokryte częstekami koloidalnymi lub monokryształami (rys. 8). W próbkach z dodatkiem surfaktanta częstki te są nieobecne, co świadczyłoby o zdyspergowaniu ich przez zastosowany środek powierzchniowo czynny. Prawdopodobnym wyjaśnieniem powstawania częstek koloidalnych jest możliwość występowania reakcji ubocznych z udziałem glukozy. Dodatek surfaktanta wpływa zatem korzystnie na jakość powierzchni mikrokrystalicznej celulozy, co ułatwić może interakcje z częstekami enzymów w kolejnych etapach procesu jej degradacji.



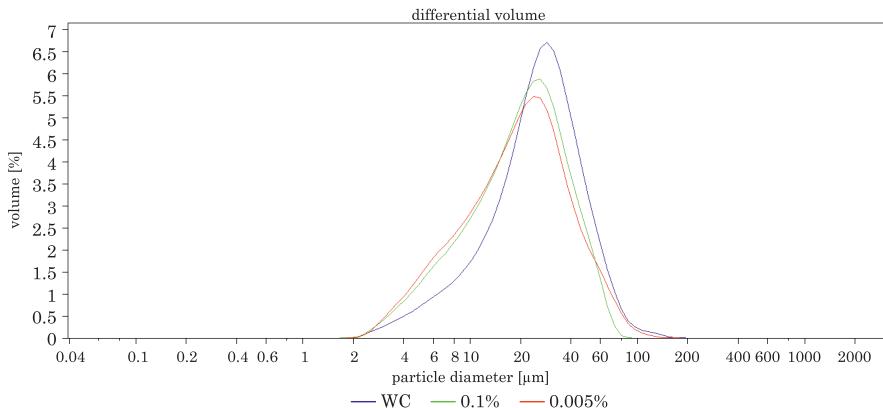
Rys. 8. Topologia monowarstw częstek celulozy modyfikowanej a) 2% H_3PO_4 , b) 2% $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{CTAB}$. Warunki syntezy: temperatura 160°C w czasie 2 h

Oczekiwany wpływem surfaktantów na przebieg procesu była zmiana właściwości powierzchni ziaren celulozy w sposób ułatwiający penetrację roztworu do ich wnętrza. Otrzymane rezultaty wskazują na osiągnięcie zakładanego efektu.

3.5. Rezultaty optymalizacji metody i warunków degradacji

Badania przeprowadzone dla surfaktantu CTAB wykazały, że występuje pewien zauważalny spadek wielkości częstek modyfikowanej celulozy w porównaniu z celulozą modyfikowaną roztworem kwasu. Na podstawie tych pomiarów (rys. 9) można stwierdzić, że wprowadzenie nawet niewielkiej ilości kationowego surfaktantu wpływa korzystnie na zmniejszenie częstek mikrokrystalicznej celulozy, a najlepsze wyniki uzyskuje się dla próbek modyfikowanych mieszaniną kwasu i 0,005% CTAB.

Pomiar rozkładu wielkości częstek w próbkach mikrokrystalicznej celulozy dla serii F wskazuje, że zastosowane warunki hydrolizy powodują wyraźne zmniejszenie wielkości ziarna. Zbliżony rezultat, choć nieco słabszy, otrzymano w przypadku zastosowania surfaktanta anionowego (seria G z dodatkiem SDS). Wyniki tych badań pozwalają na stwierdzenie, że poza



Rys. 9. Rozkład wielkości cząstek próbek celulozy dla hydrolizy w temperaturze 160°C przy zastosowaniu 2% H_3PO_4 z dodatkiem CTAB

przedziałem 140–160°C ziarna celulozy poddawane degradacji wykazują wyraźną skłonność do agregacji. Prawdopodobnym wyjaśnieniem tego faktu jest możliwość występowania reakcji ubocznych z udziałem produktów degradacji powstającej glukozy. W miarę wzrostu ich stężenia produkty te mogą mieć rosnący wpływ na powierzchnię ziaren mikrokryształycznej celulozy, np. w wyniku osadzania.

3.6. Wstępna hydroliza biomasy lignocelulozowej

3.6.1. Warunki prowadzenia eksperymentów

Eksperymenty przeprowadzono, opierając się na wynikach badań przesiewowych dla mikrokryształycznej celulozy. Jako optymalne warunki przyjęto temperaturę hydrolizy w zakresie 140–160°C oraz 2% roztwór kwasu fosforowego (V) lub dwuzasadowego fosforanu (V) sodu zawierający 0,005% surfaktanta wspomagającego (CTAB lub SDS). Celem uzyskania materiału porównawczego kilka reakcji hydrolizy przeprowadzono w temperaturach 100°C i 120°C.

Ponieważ właściwości reologiczne otrzymanych zawiesin wykluczały możliwość oceny rezultatów degradacji zrębów drewna metodami stosowanymi w badaniach przesiewowych, efekty hydrolizy zostały oszacowane na podstawie pomiarów stężenia glukozy metodą HPLC oraz wydajności późniejszej hydrolizy enzymatycznej otrzymanych próbek.

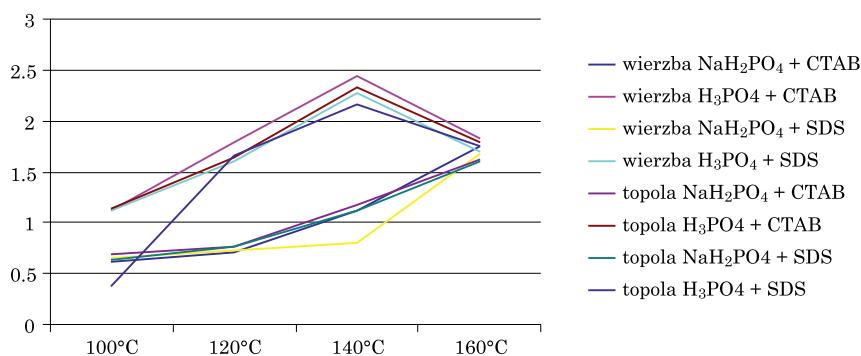
3.6.2. Wyniki pomiarów i dyskusja

Do 100 cm^3 2% roztworu kwasu fosforowego(V) lub dwuzasadowego fosforanu(V) sodu zawierającego dodatek surfaktanta wprowadzano 10 g zrębków. Zawiesinę ogrzewano w reaktorze ciśnieniowym do zadanej temperatury, obserwując wzrost ciśnienia analogiczny jak w przypadku degradacji celulozy.

Hydrotermalna degradacja zrębków drewna prowadziła do otrzymywania zawiesin o charakterystyce zależnej od zastosowanej temperatury. W tych przypadkach powstawały zawesiny o charakterystyce zbliżonej do zawiesin wyjściowych, a istotną różnicą było zwiększenie gęstości zrębków, co przejawiało się skłonnością do ich sedymentacji. Obserwacje mikroskopowe wskazały również na znaczny udział niezdegradowanych włókien drewna.

Zawesiny otrzymane w temperaturach 140°C i 160°C miały znacznie zwiększoną lepkość, najprawdopodobniej spowodowaną występowaniem związków o charakterze polifenoli powstających w rezultacie równolegle przebiegającej degradacji lignin. W obrazie mikroskopowym zawesiny otrzymane w tych temperaturach nie zawierały pozostałości włókien drewna. Znacznie ciemniejsza barwa ziaren zawesin otrzymywanych w tych warunkach wskazuje na częściową termiczną degradację biomasy. Również charakterystyczna woń furfuralu stwierdzona w przypadku zawesin obrabianych w temperaturze 160°C sugeruje, że w tych warunkach rozpoczyna się już proces termicznego rozkładu celulozy i glukozy.

Spostrzeżenia te dobrze korelują z wynikami pomiarów stężenia glukozy metodą HPLC (rys. 10).



Rys. 10. Stężenie glukozy w supernatantach w funkcji temperatury zastosowanej podczas degradacji zrębów drewna wierzby i topoli

Zastosowanie roztworu dwuzasadowego fosforanu sodu prowadzi do otrzymania supernatantów o niższej niż w przypadku kwasu fosforowego zawartości glukozy, jednak zwiększenie temperatury procesu nie powoduje obniżenia stężenia tego cukru. Rezultat ten wskazuje na możliwość zwiększenia

temperatury, w jakiej prowadzona jest degradacja biomasy (a co za tym idzie przyspieszenia procesu), bez ryzyka utraty wydzielanej glukozy w procesach ubocznych.

Podniesienie temperatury powyżej 140°C podczas degradacji z zastosowaniem kwasu fosforowego(V) powoduje obniżenie wydajności uwalnianej glukozy. Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska wydaje się być przebiegająca równocześnie reakcja przekształcania się glukozy w furfural. Procesowi temu sprzyjają zarówno wysokie temperatury, jak i niskie pH środowiska reakcji.

Hydrolizaty zostały następnie poddane działaniu mieszaniny enzymów degradujących celulozę do glukozy. Rezultaty pomiarów stężenia wydzielonej w ten sposób glukozy pozostawały w ścisłej korelacji z wynikami uzyskanymi dla supernatantów: najwyższe stężenia otrzymano dla zrębów traktowanych 2% roztworem H₃PO₄ zawierającym 0,005% jonowego surfaktanta. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że dobór i optymalizacja parametrów wstępnej hydrolizy zostały przeprowadzone prawidłowo. Opracowany proces wstępnej obróbki biomasy lignocelulozowej modyfikuje ziarna celulozy w tym materiale w stopniu pozwalającym na efektywne prowadzenie dalszej hydrolizy enzymatycznej.

3.7. Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania pozwalają na sformułowanie kilku najistotniejszych wniosków:

1. Rozcieńczone roztwory kwasu fosforowego(V) lub jego soli sodowej w warunkach hydrotermalnych skutecznie modyfikują powierzchnię ziarna celulozy.
2. Dodatek surfaktanta kationowego (CTAB) w zauważalny sposób poprawia efektywność procesu degradacji hydrotermalnej.
3. Zastosowanie roztworu dwuzasadowego fosforanu sodu prowadzi do otrzymania supernatantów o niższej niż w przypadku kwasu fosforowego zawartości glukozy, jednak zwiększenie temperatury procesu nie powoduje obniżenia stężenia tego cukru.
4. Podniesienie powyżej 140°C temperatury degradacji z zastosowaniem kwasu fosforowego(V) powoduje obniżenie wydajności uwalnianej glukozy.

Konwersja celulozy oraz masy lignocelulozowej do glukozy możliwa jest do zrealizowania za pomocą szeregu różnych czynników chemicznych, fizycznych i biologicznych lub ich kombinacji. Do najpopularniejszych metod chemicznych należy działanie rozcieńczonymi kwasami mineralnymi w podwyższonych temperaturach. Z uwagi na ekonomię procesu najczęściej stosowany jest kwas siarkowy(VI) o stężeniach 0,5–4,0% w temperaturach 140–210°C. Osiągana w tych warunkach konwersja celulozy do glukozy po obróbce enzy-

matycznej wynosi 25–80% w zależności od rodzaju biomasy (Taherzadeh i Karimi 2007). Wstępna hydroliza biomasy lignocelulozowej za pomocą nie-organicznych soli bywa stosowana jedynie w wariancie z zastosowaniem ich wysokich stężeń rzędu 1 mL nasyconego roztworu CaCl_2 na 5 mg celulozy (Tokuyasu i in. 2008). Badania nad scukrzaniem celulozy za pomocą kwasu fosforowego(V) o stężeniu 77–83% wykazały doskonałą skuteczność przejawiającą się ilościową konwersją celulozy, jednak proces ten nie ma przełożenia na skalę przemysłową z uwagi na wysokie zużycie trudnego w regeneracji kwasu (Zhang i in. 2006). Możliwe do zastosowania na dużą skalę procesy typu „organosolv” wskazują na konwersję celulozy do glukozy na poziomie 70% (Sannigrahi 2012).

Porównując przytoczone doniesienia z wynikami uzyskanymi w trakcie badań, można stwierdzić, że skuteczność zaproponowanego rozwiązania jest zbliżona do rezultatów uzyskiwanych innymi metodami. Przyjmując górną – 50% granicę zawartości celulozy w obrabianej biomasie jako punkt odniesienia, można oszacować, że biomasa wstępnie potraktowana roztworem dwuzasadowego fosforanu sodu oraz CTAB ulegała dalszej enzymatycznej konwersji z wydajnościami rzędu 65–75%, co wskazuje na możliwość zastosowania opracowanej procedury i warunków w skali przemysłowej.

Literatura

- Braga P.C., Ricci D. (red.). 2004. *Atomic force microscopy: Biomedical methods and applications*. Methods in Molecular Biology 242. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey [online] <<http://link.springer.com/book/10.1007/978-1-61779-105-5/page/1>>.
- LS 13 320 Particle Size Analyzer (table of contents manual), Beckman Coulter Inc.
- Particle Size Analyzers by Brookhaven Instruments. 2013. Accessed May 6. [online] <www.brookhaveninstruments.com/products/particle_sizing/p_PS_overview.html>.
- Pedersen M., Meyer A.S. 2009. *Influence of substrate particle size and wet oxidation on physical surface structures and enzymatic hydrolysis of wheat straw*. Biotechnology Progress 25 (2) (April): 399–408 [doi:10.1002/btpr.141].
- Sannigrahi P., Miller S.J., Ragauskas A.J. 2012. *Effects of organosolv pre-treatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine*. Carbohydrate Research, 345: 965–970.
- Taherzadeh M.J., Karimi K. 2007. *Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review*. BioResources, 2 (3) (August 25): 472–499.
- Tang J., Chen K., Xu J., Li J., Zhao C. 2011. *Effects of dilute acid hydrolysis on composition and structure of cellulose in eulaliopsis binata*. BioResources, 6 (2) (May): 1069–1078.
- Tokuyasu K., Tabuse M., Miyamoto M., Matsuki J., Yoza K. 2008. *Pretreatment of microcrystalline cellulose flakes with CaCl_2 increases the surface area, and thus improves enzymatic saccharification*. Carbohydrate Research, 343: 1232–1236.
- Zhang Y.H., Cui J., Lynd L.R., Kuang L.R. 2006. *A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure*. Biomacromolecules, 7: 644–648.
- Zhang J.Z. 2009. *Optical properties and spectroscopy of nano-materials*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. [online] <www.worldscientific.com/worldscibooks/10.1142/7093>.

4. Obróbka wstępna w procesie hydrolizy biomasy lignocelulozowej

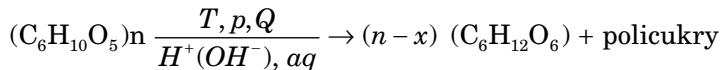
***Marek Klein, Łukasz Heda, Paweł Kazimierski, Marek Rzadkiewicz,
Dariusz Kardaś***

4.1. Wprowadzenie – hydroliza biomasy

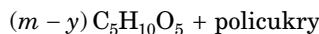
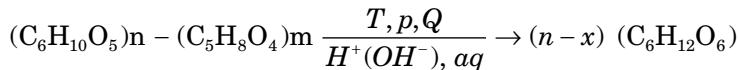
Proces hydrolizy biomasy polega w głównej mierze na rozpadzie wiązania β-1,4-glikozydowego znajdującego się w cząsteczkach celulozy. Podczas reakcji dochodzi do utworzenia nowych związków chemicznych, m.in. mono- i polisacharydów. Aby proces hydrolizy mógł zajść, niezbędne są właściwe warunki, takie jak: odpowiednia temperatura, ciśnienie, obecność katalizatora oraz czas prowadzenia procesu.

Przebieg procesu hydrolizy dla trzech podstawowych składników biomasy: celulozy, hemicelulozy i ligniny z uwzględnieniem składu chemicznego (Limeyem i Ricke 2012) przedstawiono poniżej:

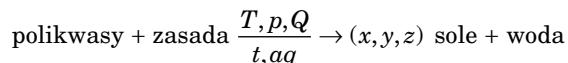
a) dla celulozy:



b) dla hemicelulozy:



c) dla ligniny:



gdzie:

T – temperatura,

p – ciśnienie,

Q – ciepło,

t – czas,

aq – środowisko wodne.

4.2. Wprowadzenie – metody hydrolizy biomasy

Biomasa lignocelulozowa jest praktycznie nierozerpuszczalna w wodzie, a wiązania w niej występujące trudno ulegają hydrolizie. Do wstępniego rozdrabniania biomasy, które jest etapem wstępny w procesie hydrolizy, wykorzystuje się głównie metody mechaniczne. Metody chemiczne bądź biologiczne umożliwiają zaś otrzymywanie monomerów z występujących w biomasie biopolimerów. Hydroliza biomasy lignocelulozowej może zachodzić podczas kilku procesów (Quintero-Ramirez 2010), m.in.:

- obróbki w środowisku wodnym w podwyższonej temperaturze i ciśnieniu,
- obróbki kwasami,
- obróbki zasadami.

Możliwe są inne metody hydrolizy, które uwzględniają takie procesy, jak:

- reakcja z cieczami jonowymi, które dla biomasy lignocelulozowej są doskonalaymi rozpuszczalnikami (Binder i Raines 2009);
- enzymatyczna hydroliza celulozy przy użyciu cellulaz (Ingram i in. 1998);
- hydroliza w środowisku alkoholu (Wang i in. 2012).

4.2.1. Obróbka fizyczna

Przed każdą z metod hydrolizy chemicznej zazwyczaj stosuje się obróbkę fizyczną biomasy w celu jej rozdrobnienia, aby dostęp hydrolizujących związków chemicznych był łatwiejszy. Zmniejszenie rozmiarów cząstek powoduje skrócenie procesów transportu masy w ich wnętrzu, co znacząco skracając proces rozkładu biomasy.

4.2.2. Hydroliza kwasowa

Miazek i in. (2009) badali efekt wstępnej hydrolizy materiału roślinnego z gatunku *Miscanthus* z zastosowaniem roztworu kwasu siarkowego. Celem ich pracy była wstępna ocena wpływu stężenia dodawanego kwasu siarkowego oraz czasu ogrzewania na uwalnianie cukrów redukujących z hydrolizy roślin.

Badania obejmowały hydrolizę 10% roztworu biomasy przy dodatku 0%, 0,5%, 1%, 2% lub 3% kwasu siarkowego, który następnie ogrzewano w temperaturze 120°C przez 60 min. Po tym czasie metodą Millera oznaczano zawartość cukrów w roztworze. Wyniki badań wyraźnie wskazują, że zastosowanie większej ilości kwasu sprzyja produkcji cukrów redukujących. Drugi etap badań obejmował ogrzewanie roztworu wsadowego z 3% zawartością kwasu siarkowego w temperaturze 120°C przez 15, 30, 45 lub 60 min. Autorzy wskazują, że im dłuższy jest czas prowadzenia procesu, tym wyższe jest stężenie pożądanego produktu reakcji.

Michalska i in. (2012) przeprowadzili badania nad rozkładem struktur lignocelulozowych w procesie hydrolizy kwasowej. Hydrolizę prowadzono przy użyciu 3% (v/v) roztworu kwasu siarkowego(VI). Badaną próbkę o 5% stężeniu biomasy (v/v) umieszczało w autoklawie i poddano obróbce termicznej w temperaturze 121°C przez 30 min. W wyniku procesu konwersji uległo 11% celulozy, jednak w produktach nie wykryto glukozy. Oznaczenia cukrów wykonywano z wykorzystaniem techniki HPLC.

4.2.3. Hydroliza z wodorosiarczanem wapnia

Gao i in. (2013) przeprowadzili obróbkę wstępna próbki biomasy z zastosowaniem kwaśnego wodorosiarczanu wapniowego $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$. Próbki składały się z wiórów niekorowanego drewna iglastego z gatunku *Pinus taeda*, z wiórów korowanego klonowego drewna liściastego oraz z proso różgowe gatunku *Panicum virgatum*. Użyto wsadu o masie 2,2–3 kg, składającego się z wysuszzonego materiału biomasy drzewnej.

Pierwszy etap polegał na przedmuchiwaniu biomasy parą wodną w celu usunięcia powietrza. Następnie poddano ją działaniu zimnego roztworu wodorosiarczanu wapnia w ilości 12,5% w stosunku do masy użytego drewna. Stężenie biomasy wynosiło ok. 30% w każdym z doświadczeń. Wióry drewna iglastego ogrzewano do temperatury 165°C przez okres 15 min i przetrzymywano w tej temperaturze przez kolejne 75 min. Wióry drzewa liściastego podgrzewano do temperatury 155°C przez 15 min i przetrzymywano w tej temperaturze przez okres od 75 do 120 min. W podobny sposób ogrzewano proso różgowe do 155°C przez 15 min i utrzymywano w tej temperaturze przez 75 min. Po eksperymencie pobrano próbki hydrolizatu i mokrej biomasy do badań. Określono m.in. zawartość cukrów w hydrolizacie dla przedstawionych tu trzech rodzajów biomasy (tab. 1).

Tabela 1
Zawartość cukrów w hydrolizacie (%)

Typ biomasy	Drewno iglaste	Wióry odkorowanego drewna liściastego z klonu	Proso różgowe
Zawartość cukrów w hydrolizacie	2,62	3,69	2,30

W tabeli 2 przedstawiono zawartość procentową cukrów w próbках stałych poszczególnych rodzajów biomasy po obróbce wstępnej. Próbki zawierały niewielkie ilości glukozy.

Tabela 2
Zawartość cukrów w stałym produkcie (%)

Typ biomasy	Drewno iglaste	Wióry odkorowanego drewna liściastego z klonu	Proso rózgowe
Arabinian	0,35	0,16	0,79
Galaktan	0,78	0,22	0,52
Glukan	40,60	54,90	39,90
Ksylian	1,68	7,06	9,78
Mannan	2,84	1,12	0,31
Całkowita zawartość	46,3	59,45	51,30

4.2.4. Hydroliza zasadowa

Michalska i Ledakowicz (2012) prowadzili badania nad hydrolizą zasadową biomasy przy użyciu 5% (m/v) roztworu wodorotlenku sodu (NaOH). Badaną próbkę biomasy o stężeniu 5% (m/v) umieszczało w autoklawie w temperaturze 121°C na okres 30 min. W wyniku procesu konwersji uległo 44% celulozy, jednak w produktach – podobnie jak w przypadku hydrolizy kwasowej – nie wykryto glukozy. Hydroliza zasadowa często opisywana jest jako obróbka wstępna przed hydrolizą właściwą. Użycie wodorotlenku (najczęściej sodu, potasu lub wapnia) ma za zadanie usunięcie ligniny, podczas gdy celuloza i hemiceluloza nie są usuwane z biomasy. Usunięciu ligniny towarzyszy zwiększenie podatności na hydrolizę. Podczas obróbki zasadowej reakcji ulegają niektóre grupy funkcyjne zawarte w hemicelulozie, będące inhibitorami fermentacji (Perego i Bianchi 2010). Także Iyer i in. (1996) opisują hydrolizę zasadową jako wstępny etap, mający na celu usunięcie ligniny. Autorzy ci jako katalizator zastosowali roztwór wody amoniakalnej o stężeniu 2,5–20%. Reakcja była prowadzona w temperaturze 170°C przez godzinę. W eksperymentach z kolbami kukurydzymi usunięte zostało 60–80% ligniny, w eksperymentach z prosem 65–85% ligniny.

4.2.5. Hydroliza z wykorzystaniem nadtlenku wodoru

Aline da Costa Correia i in. (2013) podają przykład innej hydrolizy chemicznej. Zmielone wyłoczyny jabłka nerkowca zostały poddane obróbce wstępnej alkalicznym nadtlenkiem wodoru. Zastosowano przy tym następujące

parametry: stężenie nadtlenku wodoru wynosiło od 0 do 4,3% v/v, ilość biomasy stanowiła 2,5 do 10% w/v, zaś czas prowadzenia procesu od 30 min do 24 h. Roztwór H₂O₂ doprowadzono do odczynu pH=11,5 przy użyciu 6M NaOH. Doświadczenie przeprowadzono w łagodnych warunkach, tj. w temperaturze 35°C, mieszając wsad. Następnie roztwór i części stałe rozdzielono poprzez filtrację. W wyniku badań ustalono, że spośród głównych składników drewna jedynie lignina zostaje częściowo usunięta w podanych warunkach – zawartość ligniny zmniejszyła się z 35,26 do 19,83% (tab. 3).

Tabela 3
Skład chemiczny surowca i produktu z procesu hydrolizy. H₂O₂ (0-4,3% v/v w pH=11,5), 35°C przez 24 h przy użyciu 10% w/v wsadu biomasy

Składniki	Przed obróbką	0,0% H ₂ O ₂ (v/v)	0,645% H ₂ O ₂ (v/v)	2,15% H ₂ O ₂ (v/v)	4,3% H ₂ O ₂ (v/v)
Celuloza	20,56	20,55	26,81	28,99	32,94
Hemiceluloza	10,17	9,29	15,78	15,49	11,22
Lignina	35,26	42,07	35,72	37,41	19,83
Substancje rozpuszczalne	7,79	8,34	4,43	6,37	8,73
Popiół	1,62	7,71	2,23	3,94	4,96
Łącznie	75,4	87,96	84,97	92,11	77,68

4.2.6. Hydroliza enzymatyczna

Ivetić i in. (2012) przeprowadzili proces hydrolizy enzymatycznej z zastosowaniem buraka cukrowego. W celu usunięcia substancji pektynowych z biomasy przeprowadzono obróbkę wstępную w roztworze HCl o pH=1,5 przez 4 h w temperaturze 85°C. (Sun i Hughes 1998). Przemytą biomassę, po kwasowej ekstrakcji pektyny, hydrolizowano enzymatycznie przy użyciu komercyjnej celulazy (Celluclast 1,5 L, Novozyme). Wszystkie reakcje enzymatyczne były prowadzone w 50 mM buforze acetonowym w pH=4,8. Mieszaninę reakcyjną mieszano w wytrząsarce połączonej z łaźnią wodną. Przeprowadzono również badania nad wpływem obróbki wstępnej na hydrolizę enzymatyczną w zależności od długości prowadzenia procesu hydrolizy, przy jednoczesnym pozostawieniu takich samych pozostałych warunków reakcji, tj. temperatury 40°C; 2,5% zawartości biomasy oraz stężenia enzymu wynoszącego 10 FPU/g substratu. Wyniki przedstawiono w tabeli 4 (Ivetić i in. 2012) wskazując na wyższą efektywność procesu po zastosowaniu obróbki wstępnej.

Tabela 4
Porównanie hydrolizy enzymatycznej z obróbką wstępna wsadu i bez obróbki

Czas hydrolizy (h)		24	48	72
Stężenie cukrów redukujących (mg/l)	bez obróbki wstępnej	550	550	150
	z obróbką wstępna	1400	1600	1700

Autorzy sprawdzili również wpływ stężenia enzymu (5–30 FPU) na wydajność reakcji hydrolizy (ilość biomasy 2,5%, temperatura 40°C). Wyniki badań zamieszczono w tabeli 5. Na ich podstawie zaobserwować można wyraźną zależność wzrostu stężenia cukrów redukujących od stężenia użytego enzymu i czasu prowadzenia procesu.

Tabela 5
Przebieg reakcji hydrolizy celulozy w czasie dla ścinków buraków cukrowych, poddanych uprzednio obróbce wstępnej z zastosowaniem różnych stężeń enzymu

	Czas hydrolizy (h)	Stężenie enzymu (FPU/g)				
		5	10	15	20	30
Ilość cukrów redukujących (mg/l)	12	1100	1300	1400	1500	1600
	24	1150	1350	1425	1550	1650
	36	1200	1400	1550	1675	1700
	48	1225	1550	1600	1700	1800
	60	1300	1625	1800	1825	1900
	72	1350	1700	1850	1850	1950

4.2.7. Hydroliza fizykochemiczna – eksplozja pary

Hydroliza przy wykorzystaniu eksplozji pary wodnej jest metodą fizykochemiczną, której efekty chemiczne są uzupełniane i wzmacniane zjawiskami fizycznymi. Proces eksplozji pary zachodzi w środowisku wodnym, w warunkach podwyższonej temperatury i ciśnienia, kiedy to woda gwałtownie przechodzi ze stanu ciekłego w gazowy. Zawarta w biomasie odparowująca woda niszczy jej strukturę, ułatwiając tym samym przebieg hydrolizy.

Szewczyk i in. (2012) badali wpływ obróbki wstępnej na zrębki wierzb energetycznej *Salix viminalis*. Jedną z zastosowanych przez nich metod była eksplozja pary. W swej publikacji wykazali, iż jest to najbardziej efektywny sposób przygotowania biomasy do hydrolizy enzymatycznej.

Krátýk i Jirout (2012) badali wpływ obróbki wstępnej termiczno-ekspansywnej hydrolizy na strukturę słomy pszennej. Aparatura laboratoryjna składała się z trzech części: hydrolizera, naczynia zbiorczego (służącego do zatrzymywania rozprężanej substancji) i zaworu kulowego wyposażonego w silownik pneumatyczny. Reaktor o całkowitej pojemności 8 litrów pracował przy maksymalnej temperaturze roboczej 200°C i ciśnieniu 1,6 MPa. Początkowo słomę wprowadzono do reaktora zwilżającego, w którym moczono ją w podwyższonej temperaturze 60°C przez 60 min. Eksperymenty przeprowadzono przy 5% wsadzie biomasy oraz objętości wody wynoszącej 8 litrów. Najkorzystniejsze warunki prowadzenia procesu zaobserwowano dla temperatury równej 200°C i czasu przebywania substratów w reaktorze powyżej 40 min.

W tabeli 6 przedstawiono wyniki prowadzenia reakcji hydrolizy w różnych temperaturach. Zaobserwowano, iż im wyższa temperatura prowadzenia procesu oraz dłuższy czas reakcji, tym wyższe jest stężenie glukozy.

Tabela 6
Zależność końcowego stężenia glukozy w odniesieniu do czasu w różnych temperaturach

	Czas reakcji (min)	Temperatura (°C)		
		170	185	200
Stężenie glukozy (g/l)	20	0,75	1,25	2,65
	40	0,80	1,65	3,05
	60	0,90	2,00	3,10

4.3. Cel i zakres badań

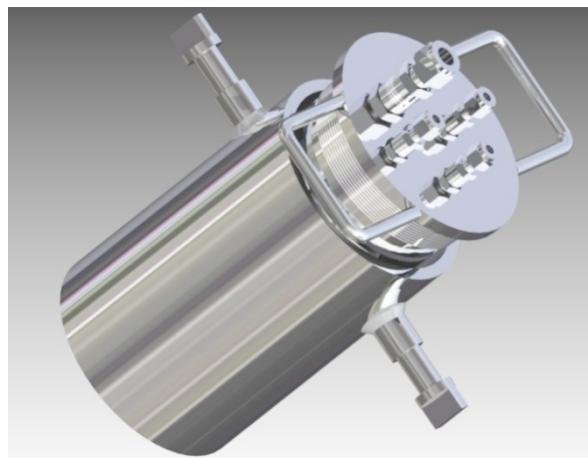
Celem prezentowanych badań własnych było opracowanie metody wstępniego przetwarzania biomasy drzewnej jako etapu przygotowującego materiał do produkcji bioetanolu i wyznaczenie optymalnych parametrów prowadzenia tego procesu. Przeprowadzono szereg prac eksperymentalnych, połączonych z analizami chromatograficznymi hydrolizatu.

4.4. Metodyka badawcza

4.4.1. Układ badawczy

W badaniach zastosowano reaktor z układem szybkiego grzania indukcyjnego (rys. 1). Jego pokrywa wyposażona jest w cztery króćce umożliwiające modyfikację połączeń z układem kontrolno-pomiarowym oraz układem odbioru próbek. Króciec odbioru próbek umożliwiał pobór ciekłej próbki z dna

reaktora. Rozwiążanie to umożliwiało przeprowadzanie analiz hydrolizatu podczas różnych etapów prowadzenia eksperymentu oraz badanie kinetyki powstawania i rozkładu glukozy. Podczas nagrzewania wsadu ciśnienie w reaktorze znacznie wzrastało. Dzięki temu w momencie otwarcia zaworu iglicowego para nad roztworem wypierała próbkę cieczy, która następnie poddawana była analizie chromatograficznej.



Rys. 1. Laboratoryjny reaktor do hydrolizy

4.4.2. Analiza zawartości cukrów

Próbki hydrolizatu analizowano pod kątem zawartości cukrów prostych (głównie glukozy) z wykorzystaniem chromatografu cieczowego firmy Shimadzu model Nexera. Parametry pracy urządzenia były następujące:

- przepływ: 1 ml/min,
- faza ruchoma: woda 25%, acetonitryl 75%, izokratyczna,
- kolumna: SUPELCOSIL™ LC-NH₂ HPLC, 5 µm wielkość ziaren, długość × średnica wewnętrzna 25 cm × 4,6 mm,
- detektor: reflaktometryczny (RID).

Czas retencji dla glukozy wynosił ok. 9 min, zaś dla sacharozy 12,5 min. W trakcie analizy otrzymano prawidłowe dobrze rozdzielone gaussowskie piki.

4.5. Część eksperimentalna

Podczas badań analizowano wpływ parametrów prowadzenia procesu na uzyskane stężenie glukozy w hydrolizacie. Eksperymenty różniły się ilością dodanego kwasu siarkowego(VI) (96%, POCH), temperaturą prowadzenia

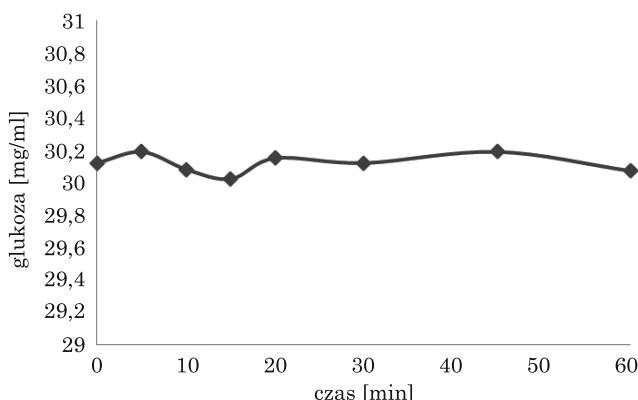
procesu, a także rodzajem substratu poddawanego hydrolizie. Do eksperymentów użyto czystej celulozy, zrąbek robinii akacjowej, a także rozdrobnionych łodyg ślazowca. Do wyznaczenia kinetyki termicznego oraz kwasowego rozkładu glukozy użyto glukozy oraz sacharozy. Korzystając z wcześniejszych przeprowadzonych prób hydrolizy w różnych temperaturach, wytypowano optymalny zakres temperatur procesu – od 160°C do 170°C.

4.6. Wyniki

4.6.1. Stabilność glukozy

Na zawartość glukozy w hydrolizacie wpływa szybkość jej powstawania w procesie hydrolizy celulozy, jak również szybkość jej rozpadu pod wpływem wysokiej temperatury i działania kwasu siarkowego(VI).

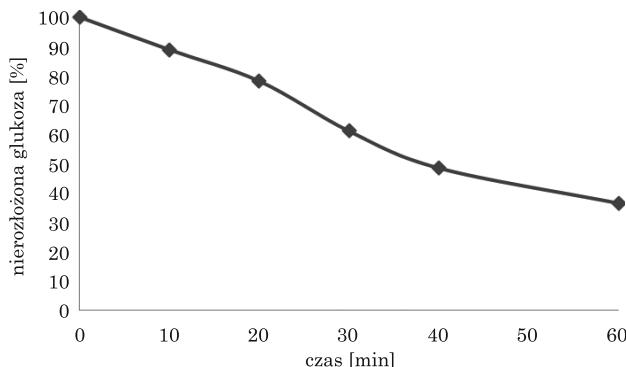
Pierwszy etap badań obejmował przeprowadzenie eksperymentu stabilności termicznej glukozy w warunkach podwyższonej temperatury (160°C) bez dodatku kwasu. W tym celu sporządzono wodny roztwór glukozy o stężeniu 30 mg/ml i utrzymywano stałą temperaturę w reaktorze przez 60 min. W trakcie eksperymentu oznaczono stężenie glukozy, a próbki pobierano co 10 min. Analizy HPLC wykazały brak rozkładu glukozy w roztworze wodnym pod wpływem temperatury (rys. 2).



Rys. 2. Kinetyka rozpadu glukozy pod wpływem temperatury (160°C)

W celu sprawdzenia stabilności glukozy w środowisku kwaśnym przeprowadzono eksperyment polegający na hydrolizie czystej glukozy w stałej temperaturze 160°C oraz w obecności 2% kwasu siarkowego(VI). Stężenie powstającej glukozy badano, pobierając ciekłe próbki co 5 min. Wyznaczono w ten sposób kinetykę reakcji rozkładu glukozy (rys. 3). Na podstawie analizy

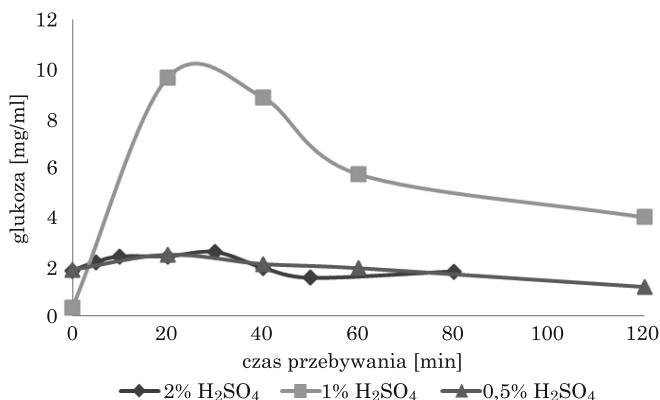
wykresu można stwierdzić, że zbyt długi czas prowadzenia procesu wpływa negatywnie na wydajność powstawania cukrów – już po 40 min 50% glukozy uległo rozkładowi. Po ochłodzeniu reaktora dalej utrzymywało się w nim ciśnienie. Na podstawie analizy chromatograficznej ustalono, że głównym składnikiem powstały gazów, oprócz powietrza, jest ditlenek węgla. Świadczy to o częściowym rozkładzie glukozy do CO_2 .



Rys. 3. Kinetyka rozpadu glukozy pod wpływem 2% H_2SO_4 w temperaturze 160°C

4.6.2. Hydroliza celulozy

Jako modelowe doświadczenie hydrolizy biomasy przeprowadzono hydrolizę celulozy. W eksperymencie jako substrat zastosowano watę bawełnianą, charakteryzującą się rozwiniętą powierzchnią. Podobnie jak w innych eksperymentach stężenie użytej biomasy stanowiło 2% (w/w).

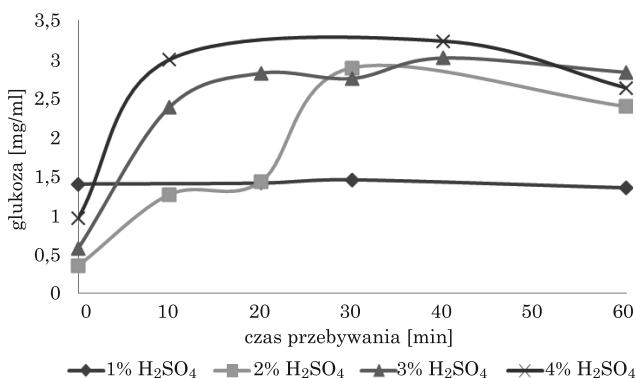


Rys. 4. Zależność stężenia glukozy od czasu prowadzenia procesu hydrolizy celulozy (0,5%, 1%, 2% H_2SO_4 w temperaturze 160°C)

Badania przeprowadzano z zastosowaniem kwasu siarkowego o stężeniach 0,5%, 1% i 2%. Najkorzystniejsze okazało się użycie 1% roztworu kwasu. Uzyskano w ten sposób stężenia glukozy przekraczające 10 mg/ml. Zmiany stężenia glukozy dla eksperymentów różniących się stężeniem kwasu przedstawiono na rysunku 4. Najwyższe stężenia glukozy otrzymano między 20 a 30 min prowadzenia procesu niezależnie od ilości użytego kwasu.

4.6.3. Hydroliza robinii

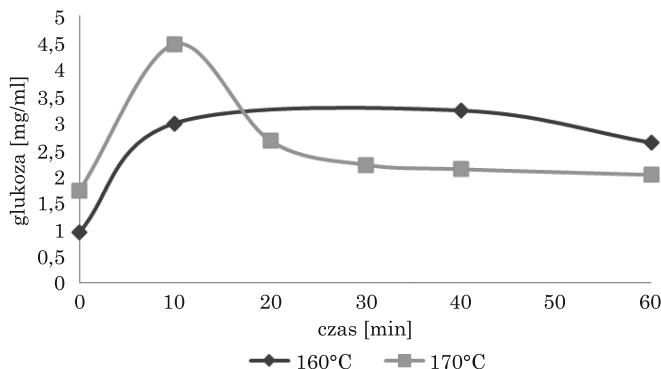
Przeprowadzono pięć doświadczeń z zastosowaniem robinii akacjowej jako substratu. Wykonane eksperymenty miały wskazać optymalne stężenie kwasu i optymalną temperaturę, dla których uzysk glukozy jest największy. W celu wyznaczenia optymalnego stężenia kwasu przeprowadzono eksperymenty z dodatkiem 1%, 2%, 3% oraz 4% kwasu siarkowego(VI). Najwyższe stężenie glukozy otrzymano z zastosowaniem 4% kwasu (rys. 5). Niekolejnie od zastosowanego stężenia kwasu najwyższe stężenie glukozy zaobserwowa- no po 30 min prowadzenia procesu. Stężenie glukozy dla roztworu 1% okaza- ło się około dwukrotnie niższe niż przy użyciu pozostałych, bardziej stężo- nych roztworów.



Rys. 5. Zależność stężenia glukozy od czasu hydrolizy dla eksperymentów z robinią różniących się dodatkiem kwasu (temperatura 160°C)

Przeprowadzone wcześniej badania w szerokim zakresie temperatur wykazały, że ma ona istotny wpływ na efektywność powstawania glukozy w procesie chemicznej hydrolizy biomasy. W celu wyznaczenia tej zależności przeprowadzono eksperymenty hydrolizy robinii z zastosowaniem 2% kwasu dla dwóch temperatur: 160 oraz 170°C. Przy wyższej temperaturze prowadzenia procesu w pierwszym etapie hydrolizy otrzymano większe stężenie glukozy. Jednakże rozkład glukozy w wyższej temperaturze zachodził szybciej i wypadkowo eksperymenty prowadzone w temperaturze 160°C okazały się

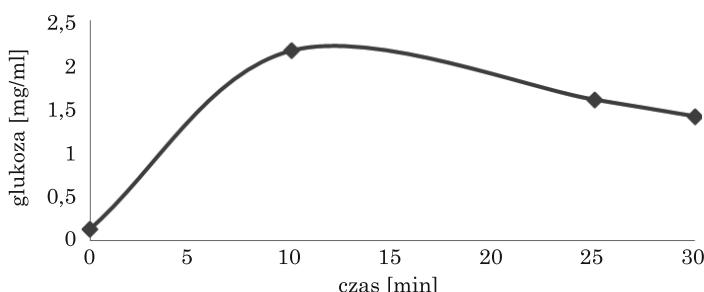
bardziej korzystne pod kątem produkcji glukozy. Zmiany stężenia glukozy w eksperymentach prowadzonych w różnych temperaturach przedstawia rysunek 6.



Rys. 6. Zależność stężenia glukozy od czasu hydrolizy z 2% dodatkiem H_2SO_4 dla eksperymentów z robinią różniących się temperaturą prowadzenia procesu

4.6.4. Hydroliza wierzby

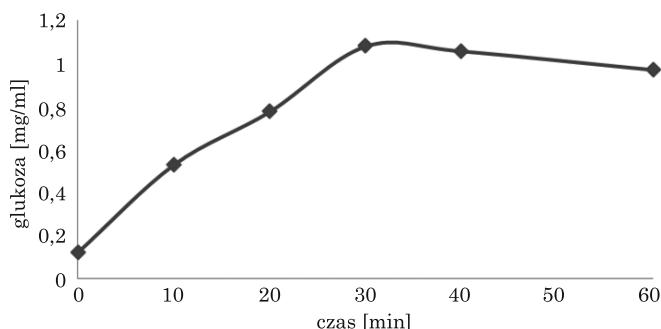
Hydrolizę wierzby przeprowadzono z zastosowaniem 1% kwasu siarkowego(VI) jako czynnika hydrolizującego. Do eksperymentu użyto zawiesinę zawierającą 2% biomasy. Największe stężenie glukozy oznaczono w próbce pobranej po 10 min. Stężenie to przekraczało 2 mg/ml i było wyższe od maksymalnego stężenia glukozy otrzymanego podczas hydrolizy robinii (1,46 mg/ml) przy zastosowaniu takiego samego stężenia kwasu. Zmiany stężenia glukozy w czasie przedstawiono na rysunku 7.



Rys. 7. Zależność stężenia glukozy od czasu dla hydrolizy wierzby z dodatkiem 1% H_2SO_4

4.6.5. Hydroliza ślazowca

Eksperyment prowadzono z zastosowaniem 2% roztworu kwasu siarkowego(VI) oraz w temperaturze 160°C. W doświadczeniach wykorzystano ślazowiec rozdrobniony do częstek o rozmiarze poniżej 3 mm. W toku badań zaobserwowano, iż hydroliza ślazowca prowadzi do powstania mniejszej ilości glukozy. Maksymalne stężenie glukozy otrzymane podczas hydrolizy ślazowca wynosiło 1 mg/ml, zaś w przypadku hydrolizy robinii (w tych samych warunkach prowadzenia procesu) maksymalne stężenie glukozy to 2,88 mg/ml. Zależność stężenia glukozy w hydrolizacie od czasu trwania procesu zaprezentowano na rysunku 8.



Rys. 8. Zależność stężenia glukozy od czasu dla hydrolizy ślazowca w temperaturze 160°C z 2% dodatkiem H_2SO_4

4.7. Podsumowanie i wnioski

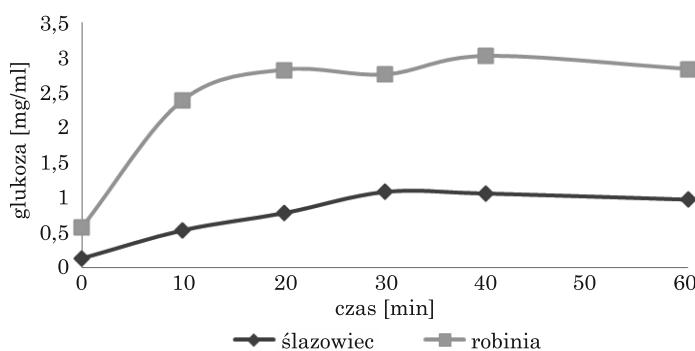
W wyniku badań opracowano metodę przygotowania biomasy do dalszej obróbki w celu produkcji bioetanolu lub biogazu za pomocą procesów termochemicznych. W badaniach zastosowano reaktor umożliwiający szybkie grzanie (8°C/min) oraz pobieranie próbek ciekłych w trakcie procesu. Przeprowadzono kilkadziesiąt eksperymentów z zastosowaniem różnego rodzaju biomasy oraz zmiennych parametrów procesowych. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, iż kluczowymi parametrami wpływającymi na ilość otrzymanego produktu są: maksymalna temperatura, czas prowadzenia procesu oraz stężenie katalizatora.

Efektywność procesu, mierzona stopniem konwersji biomasy w hydrolizat, jako najlepszy sposób obróbki termochemicznej wskazuje hydrolizę (2% biomasy) w 160°C przy użyciu 2% kwasu siarkowego.

Zauważono, że hydrolitycznemu rozkładowi biomasy towarzyszy nie tylko rozpad polimerów organicznych na monomery cukrów, ale również mineralizacja do ditlenku węgla. Otrzymane wyniki wydają się być sprzeczne z tymi,

które przedstawili Krátký i Jirout (2012). Autorzy ci wskazują, że im wyższa temperatura i czas prowadzenia procesu (200°C i 40 min), tym wyższe jest stężenie otrzymanej glukozy, jednak nie używali oni kwasu jako katalizatora. Zastosowanie katalizatora, jak wiadomo, przyspiesza zarówno proces hydrolizy biomasy, jak i degradację glukozy. Przeprowadzone doświadczenia w środowisku wodnym (bez użycia katalizatora) wskazały na brak rozkładu glukozy pod wpływem temperatury (160°C).

Porównanie surowców poddawanych hydrolizie pod kątem otrzymywania glukozy wykazało, iż robinia akacjowa jest lepszym surowcem niż ślazowiec. Powstanie glukozy w funkcji czasu podczas hydrolizy w 2% roztworze kwasu dla obu surowców przedstawiono na rysunku 9.



Rys. 9. Porównanie stężeń glukozy otrzymywanych w eksperymentach z robinią oraz ślazowcem prowadzonych w 160°C z 2% dodatkiem H_2SO_4

Literatura

- Binder J.B., Raines R. T. 2009. *Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass*. Departments of Chemistry and Biochemistry, University of Wisconsin, Madison, WI 53706 ed. Somerville C. R., University of California, Berkeley, CA.
- Costa Correia da J.A., Marques Júnior J.E., Gonçalves L.R.B., Ponte Rocha M.V. 2013. *Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters*, Bioresour. Technol., 139: 249–256.
- Dąbkowska K., Chmielewska I., Pilarek M., Szewczyk K. W. 2012. *Wpływ metody wstępnej obróbki surowca lignocelulozowego na efektywność hydrolizy enzymatycznej*. Inż. Ap. Chem., 51(4): 112–114.
- Gao J., Anderson D., Levie B. 2013. *Saccharification of recalcitrant biomass and integration options for lignocellulosic sugars from Catchlight Energy's sugar process(CLE Sugar)*. Biotechnology for Biofuels, 6 (1): 10.
- Ingram L.O., Gomez P.F., Lai X., Moniruzzaman M., Wood B.E., Yomano L.P., York S.W. 1998. *Metabolic engineering of bacteria for ethanol production*. Biotechnol. Bioeng., 58: 204–214.
- Ivetić D.Z., Šćiban M.B., Antov M.G. 2012. *Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar beet shreds: Statistical modeling of the experimental results*. Biomass Bioenergy, 47: 387–394.
- Iyer P.V., Wu Z.W., Kim S.B., Lee Y.Y. 1996. *Ammonia recycled percolation process for pretreatment of herbaceous biomass*. Appl. Biochem. Biotechnol., 57/58: 121–132.

- Krátiký L., Jirout T. 2012. *The effect of thermal-expansionary hydrolysis on wheat straw treatment*. Inż. Ap. Chem., 51(4): 143–144.
- Limayem A., Ricke S.C. 2012. *Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects*. Prog. Energy Combust. Sci., 38: 449–467.
- Miazek K., Michalska K., Krzystek L., Ledakowicz S. 2009. *Badanie wpływu termochemicznej obróbki wstępnej na stężenie uwolnionych cukrów redukujących z roślin rodzaju Miscanthus*. Inż. Ap. Chem., 48 (3): 67–68.
- Michalska K., Ledakowicz S. 2012. *Degradacja struktur lignocelulozowych oraz produktów ich hydrolizy*, Inż. App. Chem., 51 (4): 157–159.
- Perego C., Bianchi D. 2010. *Biomass upgrading through acid-base catalysis*, Chemical Engineering Journal, 161 (3): 314–322.
- Quintero-Ramirez R. 2014. *Hydrolysis of lignocellulosic biomass*. W: Barbosa Cortez A. (coord.). *Sugarcane bioethanol – R&D for productivity and sustainability*. São Paulo: 717–732.
- Sun R., Hughes S. 1998. *Extraction and physico-chemical characterization of pectins from sugar beet pulp*. Polym. J., 30 (8): 671–677.
- Wang W.G., Yu F.Q., Wu Y.X., Chi R. 2012. *Hydrolysis of cellulose into reducing sugar via hot-compressed ethanol/water mixture*. Biomass Bioenergy, 42: 143–150.

5. Hydroliza enzymatyczna surowca lignocelulozowego z wierzby energetycznej (*Salix viminalis* L.) poddanego obróbce wstępnej metodą eksplozji pary

Katarzyna Dąbkowska, Maciej Pilarek, Krzysztof W. Szewczyk

5.1. Wprowadzenie

Hydroliza surowców lignocelulozowych, do których zalicza się odpady rolnicze i leśne oraz biomasy stanowiącej produkt upraw celowych, jest jednym z zasadniczych etapów wytwarzania biopalów II generacji (Cheng i Timilsina 2011). W wyniku hydrolizy z zawartych w surowcu dugołańcuchowych polimerów celulozy i hemiceluloz otrzymuje się cukry proste (głównie glukozę i ksylozę), które na drodze fermentacji mogą zostać przekształcone do bioetanolu, biogazu lub wodoru (Szewczyk 2010). Proces hydrolizy biomasy lignocelulozowej może być prowadzony z użyciem stężonych kwasów bądź metodą enzymatyczną przebiegającą w zdecydowanie łagodniejszych warunkach (Sun i Cheng 2002; Dąbkowska i in. 2012). Przewaga hydrolizy enzymatycznej nad innymi metodami wynika ze zmniejszonego zużycia mediów (wody, energii), niższych kosztów zagospodarowania odpadów oraz braku zagrożenia intensyfikacji korozji stosowanej armatury i aparatury (Sun i Cheng 2002). Poza tym w wyniku hydrolizy kwaśnej mogą powstawać duże ilości toksycznych produktów ubocznych, które negatywnie wpływają na wykorzystywane drobnoustroje, hamując ich wzrost i intensywność procesów fermentacyjnych.

Enzymatyczny rozkład celulozy do monocukrów wymaga synergicznego działania trzech rodzajów celulaz (Rabinovich i in. 2002):

- endoglukonaz (EC 3.2.1.4), które atakują wiązania β -1,4-glikozydowe w przypadkowym miejscu łańcucha celulozowego;
- celobiohydrolaz (EC 3.2.1.91), które atakują co drugie wiązanie β -1,4-glikozydowe, poczynając od redukującego końca łańcucha i tym samym uwalniają cząsteczki celobiozy;
- β -glukozydazy (EC 3.2.1.21), które hydrolizują celobiozę do glukozy.

Najczęściej wykorzystuje się preparaty zawierające kompleksy enzymów celulolitycznych i hemicelulolitycznych wydzielanych przez grzyby mikroskopowe *Trichoderma reesei*.

Dane literaturowe wskazują na istnienie wielu czynników limitujących szybkość enzymatycznej hydrolizy odpadów lignocelulozowych (Bansal i in. 2009; Zhang i in. 2010). Zwiększenie efektywności ekonomicznej enzymatycznej hydrolizy biomasy roślinnej jest możliwe dzięki zwiększeniu aktywności stosowanych preparatów enzymatycznych oraz dostępności substratu dla cząsteczek enzymów. Istotną rolę odgrywa tu rodzaj stosowanego surowca lignocelulozowego oraz jego obróbka wstępna.

Wstępne przygotowanie biomasy lignocelulozowej ma na celu uszkodzenie zwartej struktury lignocelulozy w celu ułatwienia przebiegu hydrolizy polysacharydów. Na etapie obróbki wstępnej dąży się do rozbicia kompleksu lignocelulozowego, zmniejszenia stopnia krystaliczności i polimeryzacji, zwiększenia powierzchni kontaktu surowca z enzymami oraz usunięcia lignin. Wybór metody oraz efektywność obróbki wstępnej zależy od rodzaju surowca poddawanego procesowi (Taherzadeh i Karimi 2008). Z uwagi na wysoką efektywność do obróbki wstępnej surowców lignocelulozowych często stosuje się metodę eksplozji pary (Horn i in. 2011; Ramos 2003; Wyman i in. 2005).

Opracowanie jednorodnego sposobu przetwarzania biomasy lignocelulozowej nie jest łatwe, bowiem szeroka gama surowców możliwych do zagospodarowania w tym kierunku determinuje różne sposoby postępowania na każdym etapie technologii, tzn. obróbki wstępnej i hydrolizy substratów, sposobu prowadzenia fermentacji czy operacji pośrednich. Warto dodać, że w literaturze dostępne są nieliczne informacje dotyczące hydrolizy surowca lignocelulozowego z wierzby energetycznej.

Przedmiotem badań prowadzonych w Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Bioprocesowej Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej była enzymatyczna hydroliza surowca lignocelulozowego z wierzby energetycznej *Salix viminalis* L. Hydrolizie poddawano zrębki wierzby po uprzedniej obróbce wstępnej. Stosowano różne metody obróbki wstępnej (fizyczne i chemiczne) i spośród nich wybrano metodę eksplozji pary – jako technikę zwiększającą podatność surowca na hydrolizę enzymatyczną w największym stopniu. Hydrolizę prowadzono z użyciem najnowszej generacji wysoko wydajnych preparatów enzymatycznych z grupy Cellic®. Celem przeprowadzonych badań był dobór wartości stężeń wybranych preparatów enzymatycznych w mieszaninie reakcyjnej, wyznaczenie optymalnych warunków enzymatycznej hydrolizy oraz opracowanie modelu matematycznego opisującego przebieg reakcji, który jest niezbędny do racjonalnego zaprojektowania procesu w skali przemysłowej.

5.2. Materiały

5.2.1. Surowiec lignocelulozowy

Wykorzystywanym w badaniach surowcem lignocelulozowym były zrębki wierzby energetycznej *Salix viminalis* L. Stosowano rozdrobnioną biomasę poddaną obróbce wstępnej metodą eksplozji pary, przeprowadzonej w Zakładzie Energii Odnawialnych Instytutu Maszyn Przepływowych Polskiej Akademii Nauk w Gdańsku. Procentowa zawartość celulozy, hemiceluloz oraz ligniny w surowcu poddanym obróbce wstępnej wynosiła odpowiednio: 39,03%, 0,73% oraz 45,83%. Oznaczenia składu surowca zostały wykonane w Katedrze Biotechnologii Żywności Wydziału Nauk o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

5.2.2. Preparaty enzymatyczne

W badaniach stosowano dwa preparaty enzymatyczne firmy Novozymes (Dania): Cellic® CTec2 i Cellic® HTec2. Są to wysoko wydajne preparaty stosowane przemysłowo do hydrolizy surowców lignocelulozowych. Cellic® CTec2 jest kompleksowym preparatem wykazującym wysoką aktywność celulolityczną oraz hemicelulolityczną, natomiast preparat Cellic® HTec2 zawiera dodatkową porcję hemicelulaz. Zgodnie z informacjami producenta, zależnie od rodzaju użytego surowca, metody obróbki wstępnej oraz warunków prowadzenia hydrolizy dodatek nawet niewielkiej ilości Cellic® HTec2 może wydatnie zwiększyć wydajność hydrolizy surowców lignocelulozowych. Z uwagi na brak danych dotyczących aktywności użytych preparatów enzymatycznych, w ramach pracy dla preparatu Cellic® CTec2 została ona wyznaczona doświadczalnie z użyciem czystej celulozy jako substratu w temperaturze 45°C i dla odczynu pH mieszaniny reakcyjnej wynoszącego 5,5. Aktywność wyrażona w jednostkach FPU (ang. *filter paper unit*), powszechnie stosowanych do określania aktywności enzymów celulolitycznych, wyniosła $0,45 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{glukozy}} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{enzymu}}^{-1}$.

5.3. Metodyka badań

5.3.1. Hydroliza enzymatyczna surowca lignocelulozowego

Do kolb Erlenmayera o pojemności 0,3 dm³ dodawano po 5 g suchej masy surowca lignocelulozowego, 0,1 dm³ buforu cytrynianowego o stężeniu 0,05 mol·dm⁻³ oraz odpowiednie naważki preparatów enzymatycznych o mase odniesionej do użytej suchej masy surowca. Dodatkowo, w celu uniknięcia

niepożądanego rozwoju mikroorganizmów w mieszaninach reakcyjnych, do kolb dodawano 0,02 g azydku sodu. Kolby reakcyjne inkubowano w termo-statowanej wstrząsarce ($150 \text{ obr} \cdot \text{min}^{-1}$) w założonej temperaturze. W różnych odstępach czasu pobierano próbki mieszanin reakcyjnych i natychmiast schładzano je w wodzie z lodem. Schłodzone próbki następnie wirowano ($4500 \times g$, 5 min), po czym uzyskany supernatant przesączano przez filtr o średnicy porów $0,2 \cdot 10^{-6} \text{ m}$. Tak przygotowane próbki rozcieńczano 11-krotnie wodą i poddawano analizie z wykorzystaniem techniki HPLC.

5.3.2. Plan eksperymentów

Eksperymenty obejmowały trzy etapy:

- 1) sprawdzenie czy zależność szybkości hydrolizy od dawki preparatu Cellic® CTec2 jest liniowa;
- 2) określenie optymalnych warunków hydrolizy uwzględniających trzy czynniki: udział preparatu Cellic®HTec2 w mieszaninie reakcyjnej, temperaturę inkubacji oraz odczyn pH mieszaniny reakcyjnej;
- 3) wyznaczenie parametrów modelu kinetycznego hydrolizy.

Dla pierwszego etapu badań zastosowano następujące warunki prowadzenia procesu:

- preparat enzymatyczny Cellic® CTec2 w dawkach: 1%, 1,5%, 3% lub 6%,
- temperatura inkubacji: 45°C ,
- odczyn pH mieszaniny reakcyjnej: 5,5,
- czas hydrolizy: 72 h.

W drugim etapie badań doświadczenia przeprowadzono zgodnie z planem Boxa-Behnkena. W stosunku do centralnego planu kompozycyjnego wykorzystanie planu Boxa-Behnkena umożliwia ograniczenie liczby przeprowadzonych doświadczeń. W przypadku trzech parametrów liczba doświadczeń planu Boxa-Behnkena wynosi 15, natomiast centralny plan kompozycyjny wymaga przeprowadzenia 20 doświadczeń. Celem drugiego etapu badań było wyznaczenie dziesięciu współczynników równania kwadratowego służącego do estymacji powierzchni odpowiedzi:

$$y = b_o + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (5.1)$$

gdzie:

- y – zmienna zależna (stopień hydrolizy po 72 h reakcji),
 $b_o - b_{33}$ – współczynniki,
 $x_1 - x_3$ – zmienne niezależne (temperatura, pH, procentowy udział preparatu Cellic® HTec2).

Tabela 1 prezentuje wartości parametrów procesu hydrolizy zastosowane podczas doświadczeń optymalizacyjnych. W tabeli 2 przedstawiono zrealizowany w pracy plan eksperymentów oraz dodatkowo umieszczone w niej dane dotyczące ilości preparatów enzymatycznych, którymi suplementowano skład mieszanin reakcyjnych w poszczególnych doświadczeniach. Do opracowania wyników doświadczeń, tzn. wyznaczenia wartości współczynników i oceny ich istotności, wykorzystano pakiet statystyczny STATISTICA (StatSoft, Polska).

Tabela 1
Wartości parametrów użytych podczas optymalizacji hydrolizy

Zmienna	Wartość		
	dolina	średnia	górna
x_1 – temperatura	40	45	50
x_2 – pH	5,0	5,5	6,0
x_3 – udział Cellic® HTec2	0%	5%	10%
wartość znormalizowana	-1	0	+1

Tabela 2
Zrealizowany plan eksperymentów wg Boxa-Behnkena

Plan Boxa-Behnkena				Cellic® HTec2 ^b (%) w/w	Cellic® CTec2 ^b (%) w/w	Σ enz. ^b (%) w/w
nr ekspe- rymentu	T (°C)	pH	udział ^a Cellic® HTec2 (%)			
1	2	3	4	5	6	7
1	40	5,0	5,0	0,3	5,7	6,0
2	50	5,0	5,0	0,3	5,7	6,0
3	40	6,0	5,0	0,3	5,7	6,0
4	50	6,0	5,0	0,3	5,7	6,0
5	40	5,5	0,0	0,0	6,0	6,0
6	50	5,5	0,0	0,0	6,0	6,0
7	40	5,5	10	0,6	5,4	6,0
8	50	5,5	10	0,6	5,4	6,0
9	45	5,0	0,0	0,0	6,0	6,0
10	45	6,0	0,0	0,0	6,0	6,0

cd. tabeli 2

1	2	3	4	5	6	7
11	45	5,0	10	0,6	5,4	6,0
12	45	6,0	10	0,6	5,4	6,0
13	45	5,5	5,0	0,3	5,7	6,0
14	45	5,5	5,0	0,3	5,7	6,0
15	45	5,5	5,0	0,3	5,7	6,0

^a procentowa zawartość preparatu Cellic® HTec2 w całkowitej ilości zastosowanych preparatów
^b ilość preparatu/preparatów w stosunku do suchej masy surowca

W celu opracowania modelu kinetycznego badanej reakcji hydrolizy surowca lignocelulozowego prowadzono doświadczenia zgodnie z opisaną powyżej metodą z tym, że do badań stosowano trzy różne początkowe ilości (3 g, 4 g oraz 5 g) suchej masy surowca. Katalizatorem reakcji w tych doświadczeniach był wyłącznie preparat Cellic® CTec2 użyty we wszystkich badanych reakcjach w ilości 0,3 g na 0,1 dm³ mieszaniny reakcyjnej. Doświadczenia prowadzono w warunkach optymalnych.

5.3.3. Metody analityczne

Przebieg reakcji monitorowano na podstawie oznaczeń stężenia uwolnionych cukrów (glukozy, celobiozy, ksylozy) w próbach mieszanin reakcyjnych, rozcieńczonych 11-krotnie wodą. Oznaczenia przeprowadzono, wykorzystując technikę HPLC, przy użyciu chromatografu Varian 625 CL System (USA) wyposażonego w kolumnę ANIMEX HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) w następujących warunkach rozdziału:

- eluent: 0,04 M H₂SO₄, przepływ 0,4 cm³·min⁻¹;
- detektor refraktometryczny T_{wew} = 45°C.

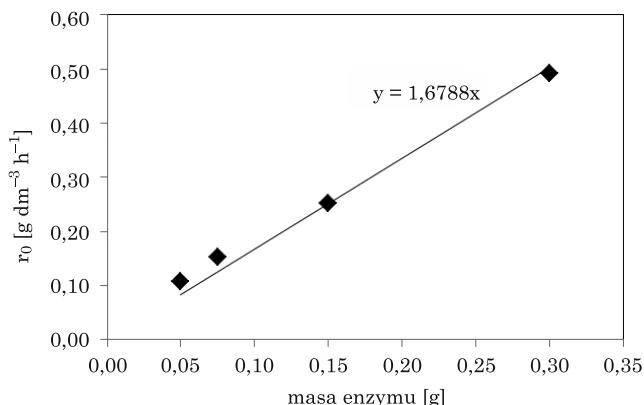
5.4. Wyniki i dyskusja

Przeprowadzona analiza ilościowa prób mieszanin reakcyjnych jednoznacznie wskazuje, że produktami badanej reakcji hydrolizy surowca lignocelulozowego są glukoza i ksyloza. Okazało się, że stężenie celobiozy w mieszaninach reakcyjnych jest bliskie zeru (0,01–0,02 g·dm⁻³ przy progu oznaczalności zastosowanej metody wynoszącym 0,005 g·dm⁻³) i nie zmienia się w czasie prowadzenia eksperymentów. Jest to korzystne z uwagi na fakt, że celobioza to inhibitor kompetencyjny enzymów celulolitycznych. Po 72 h hydrolizy w mieszaninach reakcyjnych stężenie glukozy wynosiło od 6,24

do $9,95 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w zależności od wariantu warunków prowadzenia reakcji. Z uwagi na niewielką zawartość hemiceluloz w surowcu, stężenie ksylozy było znacznie niższe i nie przekraczało $0,30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Z tego względu w opisie wyników przeprowadzonych badań uwzględniono wyłącznie zmiany stężenia glukozy (głównego produktu hydrolizy) w czasie trwania reakcji.

5.4.1. Wpływ dawki preparatu Cellic® CTec2 na szybkość reakcji

Na rysunku 1 przedstawiono zależność początkowej szybkości reakcji (początkowej szybkości uwalniania glukozy) od masy preparatu enzymatycznego użytego w reakcji.



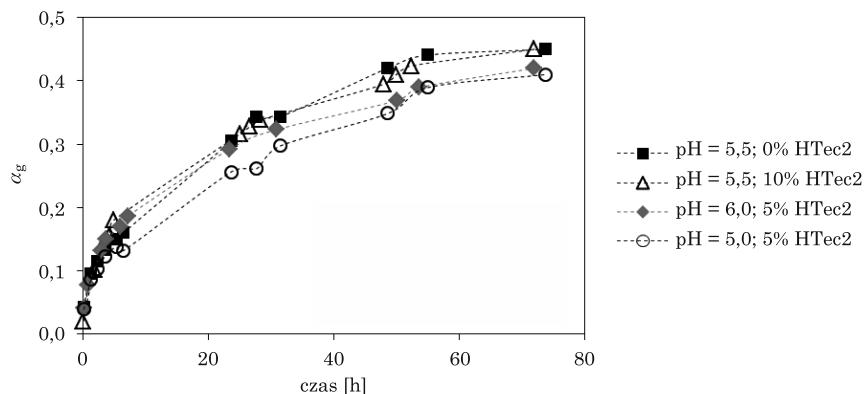
Rys. 1. Zależność początkowej szybkości reakcji od ilości użytego preparatu Cellic® CTec2

Wykazano, że zależność początkowej szybkości tworzenia glukozy od dawki preparatu Cellic® CTec2 ma charakter liniowy. W badanym zakresie zwiększenie ilości preparatu powodowało przyspieszenie reakcji. Współczynnik kierunkowy uzyskanej prostej odpowiada aktywności preparatu enzymatycznego wyrażonej jako stężenie uwolnionej glukozy w ciągu 1 h w obecności 1 g preparatu. Wyniósł on $1,68 \text{ g}_{\text{glukozy}} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{enzymu}}^{-1}$, co odpowiada $0,16 \mu\text{mol}_{\text{glukozy}} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{enzymu}}^{-1}$.

5.4.2. Wpływ warunków prowadzenia hydrolizy na jej efektywność

Na rysunku 2 przedstawiono zależność stopnia hydrolizy od czasu procesu dla reakcji prowadzonych w temperaturze 40°C z użyciem różnych wartości odczynu pH mieszanin reakcyjnych oraz różnych procentowych udziałów preparatu enzymatycznego Cellic® HTec2. Zgodnie z tabelą 2 są to doświadczenia

oznaczone numerami 1, 3, 5 oraz 7. Stopień hydrolizy α_g zdefiniowano jako stosunek $C_g / C_{C,0}$, gdzie C_g oznacza stężenie glukozy uwalnionej w wyniku hydrolizy ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$), zaś $C_{C,0}$ to początkowe stężenie celulozy w surowcu ligno-celulozowym ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$).

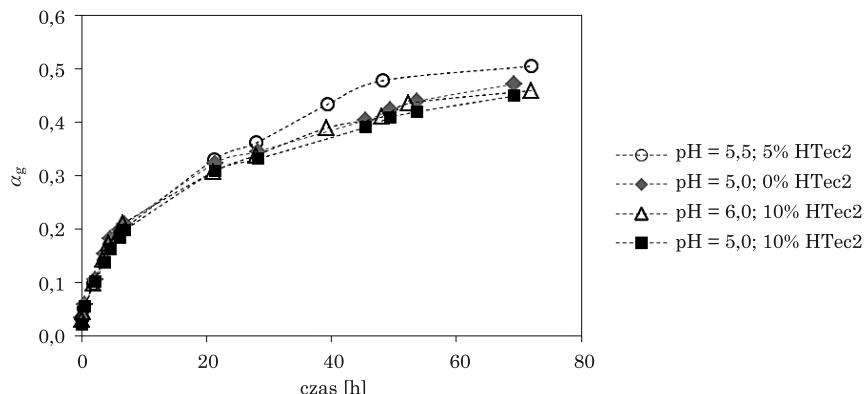


Rys. 2. Wpływ odczynu pH oraz udziału Cellic® HTec2 w całkowitej ilości preparatów enzymatycznych na stopień hydrolizy w 40°C

Wykazano, że wraz z przebiegiem reakcji wzrasta wartość stopnia hydrolizy. Po 72 h prowadzenia procesu parametr ten przyjmuje wartości od 0,41 do 0,45, w zależności od badanych warunków prowadzenia reakcji.

Analizując zależności przedstawione na rysunku 2, można zauważyć różnice w szybkościach reakcji w zależności od zastosowanego odczynu pH. Reakcja biegła najszybciej w przypadku pH = 5,5. Przebiegi reakcji prowadzonych w pH = 5,0 oraz 6,0 były do siebie zbliżone. Otrzymane dane doświadczalne wskazują na niewielki wpływ ilości użytego preparatu Cellic® HTec2 na szybkość reakcji – dla wartości pH = 5,5 zależność stopnia hydrolizy od czasu dla reakcji z użyciem 0% i 10% udziału wspomnianego preparatu jest praktycznie taka sama.

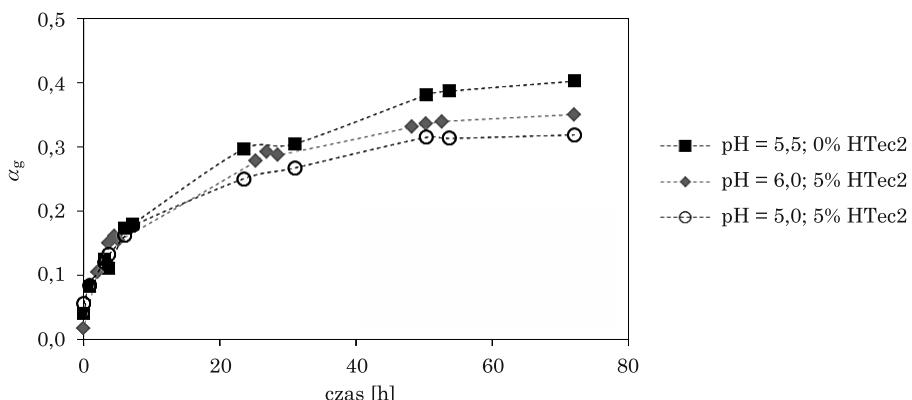
Na rysunku 3 przedstawiono zmianę stopnia hydrolizy w funkcji czasu dla reakcji prowadzonych w temperaturze 45°C. Zgodnie z przyjętym planem doświadczeń (tab. 2) wykres dotyczy eksperymentów oznaczonych numerami 9, 11, 12 oraz 13. Stwierdzono, że odczyn pH buforu stanowiącego środowisko reakcji oraz stężenie preparatu Cellic® HTec2 mają wpływ na szybkość uwalniania glukozy. Dla początkowego etapu reakcji (tzn. w ciągu pierwszych ok. 10 h) szybkość procesu we wszystkich przypadkach przyjmuje bardzo zbliżone wartości. Różnice można zaobserwować dopiero po ok. 20 h procesu – reakcja biegnie najszybciej przy pH = 5,5. Z kolei przy ustalonej wartości odczynu pH reakcje, w których użyto preparat Cellic® HTec2 oraz te, w których nie zastosowano preparatu o zwiększonej zawartości hemicelulaz, biegną z porównywalną szybkością.



Rys. 3. Wpływ pH oraz udziału Cellic® HTec2 w całkowitej ilości preparatów enzymatycznych na stopień hydrolizy w 45°C

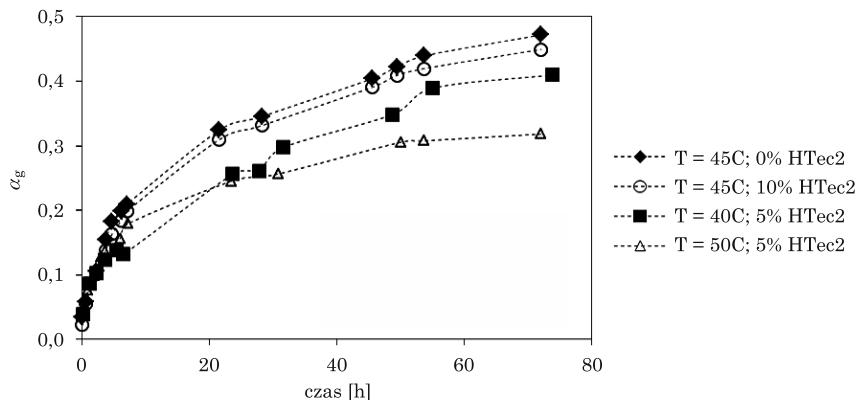
Po 72 h prowadzenia reakcji wartość stopnia hydrolizy wyniosła od 0,45 do 0,51 w zależności od zastosowanych warunków prowadzenia reakcji.

Na rysunku 4 przedstawiono wyniki reakcji otrzymane dla kolejnej badanej temperatury, wynoszącej w tym przypadku 50°C (doswiadczenia nr 2, 4, 6 – zgodnie z tab. 2). W tym przypadku szybkość uwalniania glukozy w wyniku reakcji enzymatycznej prowadzonej w temperaturze 50°C silnie zależy zarówno od odczynu pH roztworu, jak i od udziału preparatu Cellic® HTec2, niż miało to miejsce w przypadku hydrolizy prowadzonej w niższych temperaturach (rys. 2 i 3). Reakcja biegnie najszybciej w buforze o odczynie pH = 5,5, zaś najwolniej dla pH = 5,0.



Rys. 4. Wpływ pH oraz udziału Cellic® HTec2 w całkowitej ilości preparatów enzymatycznych na stopień hydrolizy w 50°C

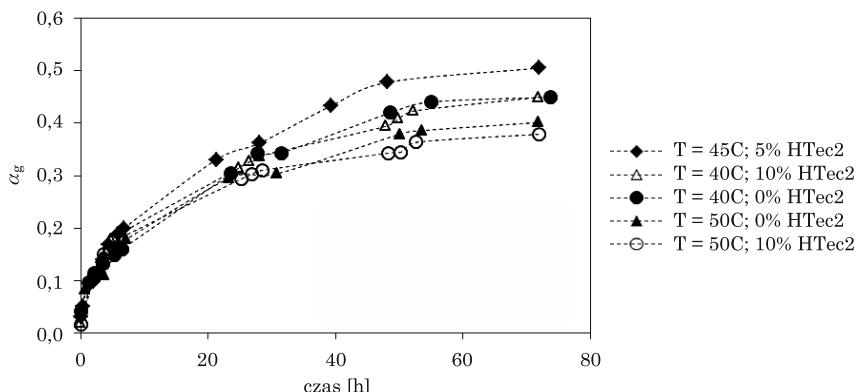
Na rysunku 5 przedstawiono zależność stopnia hydrolizy od czasu trwania reakcji przy ustalonej wartości pH = 5,0 dla trzech różnych temperatur inkubacji oraz z użyciem różnej ilości preparatu Cellic® HTec2. Zgodnie z tabelą 2 rysunek ten prezentuje wyniki doświadczeń nr 1, 2, 9 oraz 11.



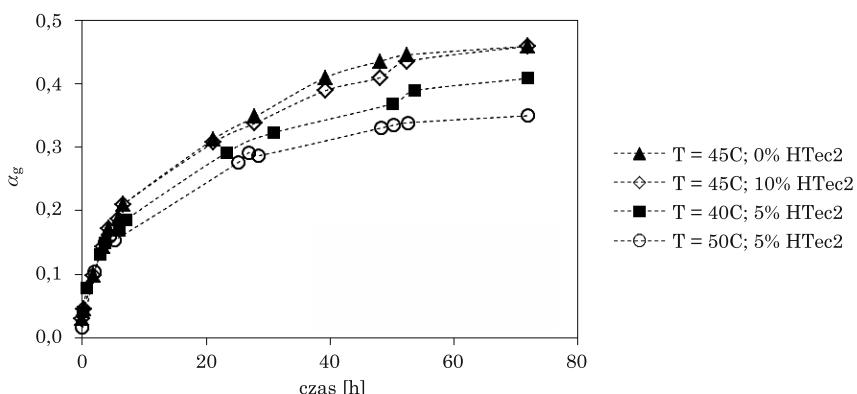
Rys. 5. Wpływ temperatury oraz udziału Cellic® HTec2 w całkowitej ilości preparatów enzymatycznych na stopień hydrolizy w pH = 5,0

Zaobserwowano, że szybkość reakcji wyraźnie zależała od temperatury prowadzenia procesu, przy czym reakcja biegła najszybciej w 45°C, zaś najwolniej w 50°C. Dla przykładu, podczas procesu prowadzonego w temperaturze 50°C wartość stopnia hydrolizy wzrastała w czasie przez pierwsze ok. 40 h, zaś po tym czasie wartość α_g praktycznie nie ulegała zmianie. Otrzymane wyniki mogą wskazywać na fakt termicznej dezaktywacji preparatu enzymatycznego. W temperaturze 45°C, niezależnie od ilości użytego preparatu HTec2, reakcja biegła praktycznie z taką samą szybkością, co można zinterpretować jako niezauważalny wpływ udziału procentowego preparatu HTec2 na szybkość hydrolizy.

Na rysunku 6 przedstawione zostały dane doświadczalne otrzymane dla procesu przeprowadzonego w pH = 5,5 (doświadczenie nr 5, 6, 7, 8 i 13 – zgodnie z tab. 2), natomiast na rysunku 7 dane dla reakcji przeprowadzonych w pH = 6,0 (doświadczenie nr 3, 4, 10, 12 – zgodnie z tab. 2). Dla obu badanych wartości pH mieszaniny reakcyjnej najwyższą wartość szybkości hydrolizy odnotowano podczas procesu prowadzonego w temperaturze wynoszącej 45°C. Jest to zgodne z wcześniejszymi zależnościami uzyskanymi dla przemian prowadzonych w buforze o odczynie pH = 5,0. Jednocześnie wpływ ilości użytego preparatu Cellic® HTec2 na szybkość uwalniania glukozy okazał się niewielki.



Rys. 6. Wpływ temperatury oraz udziału Cellic® HTec2 w całkowitej ilości preparatów enzymatycznych na stopień hydrolizy w pH = 5,5



Rys. 7. Wpływ temperatury oraz udziału Cellic® HTec2 w całkowitej ilości preparatów enzymatycznych na stopień hydrolizy w pH = 6,0

Dla wszystkich badanych reakcji po ok. 50 h odnotowano wyraźne spowolnienie reakcji. W celu stwierdzenia, czy jest ono wynikiem dezaktywacji preparatu enzymatycznego, czy też adsorpcji enzymów na ligninie obecnej w surowcu, po 72 h prowadzenia reakcji do mieszaniny reakcyjnej dodano kolejną porcję preparatu Cellic® CTec2, a po kolejnych 10 h procesu pobrano próbę mieszaniny reakcyjnej w celu ilościowego oznaczenia jej składu. Okazało się, że dodatek porcji świeżego enzymu nie skutkował wzrostem stężenia glukozy rozpuszczonej w badanej mieszaninie reakcyjnej. Można zatem stwierdzić, że obserwowane zatrzymanie reakcji związane jest z brakiem w surowcu wiązań hydrolizowanych przez enzym.

5.4.3. Statystyczna obróbka danych doświadczalnych

W tabeli 3 plan Boxa-Behnkena uzupełniono o zmienne zależne. Jako wartości zmiennych zależnych przyjęto stopnie hydrolizy wyznaczone po 72 h prowadzenia hydrolizy.

Stopnie przemiany po 72 h uzyskane dla poszczególnych eksperymentów prowadzonych zgodnie z planem Boxa-Behnkena

Tabela 3

Plan Boxa-Behnkena				α_g
nr ekspe-rymentu	T (°C)	pH	udział Cellic® HTec2 (%)	
1	40	5,0	5,0	0,41
2	50	5,0	5,0	0,32
3	40	6,0	5,0	0,42
4	50	6,0	5,0	0,35
5	40	5,5	0,0	0,45
6	50	5,5	0,0	0,40
7	40	5,5	10	0,45
8	50	5,5	10	0,38
9	45	5,0	0,0	0,47
10	45	6,0	0,0	0,47
11	45	5,0	10	0,45
12	45	6,0	10	0,46
13	45	5,5	5,0	0,51
14	45	5,5	5,0	0,50
15	45	5,5	5,0	0,51

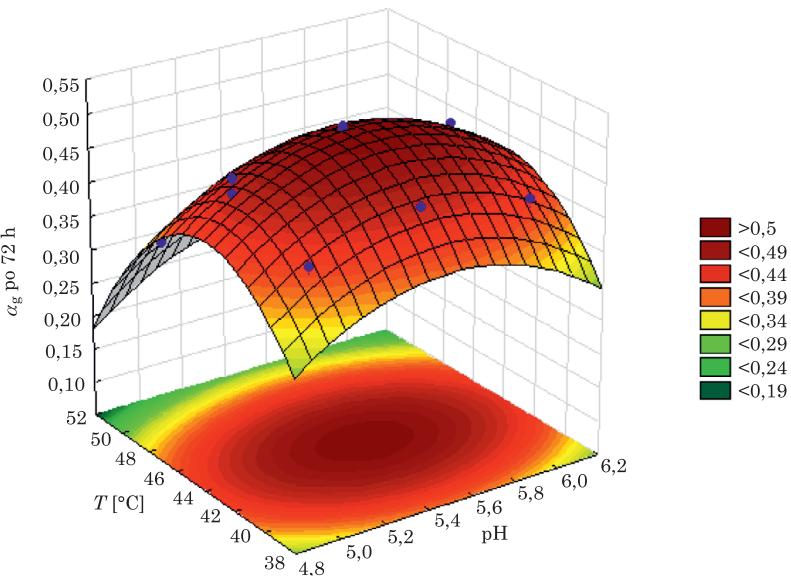
Na podstawie uzyskanych wartości stopnia hydrolizy przy użyciu pakietu STATISTICA wyznaczono współczynniki regresji równania kwadratowego (5.1). Po uwzględnieniu wyznaczonych współczynników oraz wyeliminowaniu czynników, dla których współczynniki regresji przyjmują wartości bliskie zeru, równanie (5.1) przyjęło postać:

$$y = -11 + 0,29x_1 - 0,035x_1^2 + 1,83x_2 - 0,17x_2^2 \quad (5.2)$$

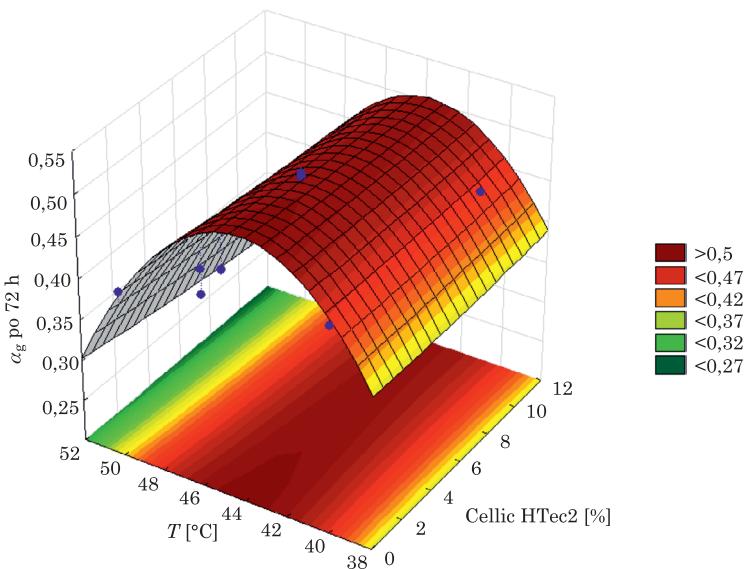
Współczynnik dopasowania (R^2) modelu do danych doświadczalnych był wysoki i wynosił 0,991.

Z równania (5.2) wynika, że temperatura oraz odczyn pH środowiska reakcji mają największy wpływ na stopień hydrolizy wyznaczony po 72 h reakcji. Odpowiednie dla tych parametrów fizycznych liniowe współczynniki regresji są największe, przy czym wzrost zarówno temperatury inkubacji, jak i odczynu pH w zbadanym zakresie dodatnio wpływał na stężenie glukozy w mieszaninie reakcyjnej. Niskie wartości pozostałych współczynników wskazują, że efekty wywoływane przez odpowiadające im zmienne niezależne, jak też ich wzajemne korelacje są niewielkie. Ponadto wartości wyznaczonych współczynników regresji są istotne statystycznie – parametr p przyjmuje wartości mniejsze od założonej wartości 0,02.

Na rysunkach 8 i 9 przedstawione zostały powierzchnie odpowiedzi dla badanych zmiennych niezależnych wyznaczone na podstawie równania regresji (1.2). Prezentują one wartości stopnia hydrolizy w funkcji dwóch parametrów: temperatury inkubacji i odczynu pH mieszaniny reakcyjnej (rys. 8) oraz temperatury inkubacji i udziału preparatu Cellic® HTec2 (rys. 9). Przebiegi zależności przedstawionych na powyższych wykresach potwierdzają wyraźny wpływ temperatury i odczynu pH oraz brak istotnego wpływu ilości preparatu Cellic® HTec2 dodanego do mieszaniny reakcyjnej na szybkość hydrolizy badanego surowca lignocelulozowego poddanego obróbce wstępnej metodą eksplozji pary.

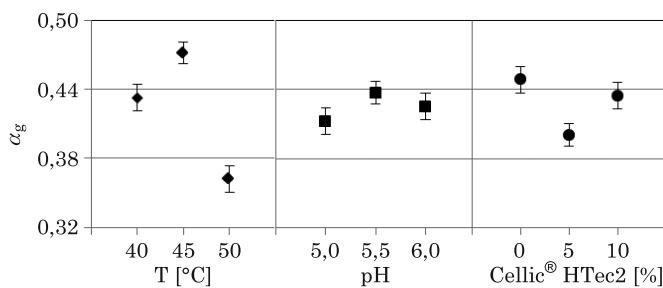


Rys. 8. Powierzchnia odpowiedzi w funkcji odczynu pH i temperatury dla 5% w/w udziału preparatu Cellic® HTec2 w całkowitej ilości preparatów enzymatycznych



Rys. 9. Powierzchnia odpowiedzi w funkcji udziału preparatu Cellic® HTec2 i temperatury przy odczynie pH = 5,5

Na rysunku 10 przedstawiono zależności stopnia hydrolizy od temperatury, odczynu pH i preparatu Cellic® HTec2, wyznaczone po 72 h reakcji na podstawie równania regresji (5.2) wraz 95% przedziałami ufności.



Rys. 10. Zależność stopnia hydrolizy od temperatury, pH i udziału stężenia preparatu Cellic® HTec2 po 72 h prowadzenia reakcji

Oszacowane 95% przedziały ufności we wszystkich przedstawionych przypadkach przyjmują niewielkie wartości.

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonej statystycznej analizy danych doświadczalnych wyznaczone zostały optymalne wartości temperatury oraz odczynu pH, dla których wartość średniej zależnej jest największa: T = 43,8°C, pH = 5,55. Zgodnie z opracowanym równaniem regresji stopień hydrolizy po 72 h w tych warunkach wynosi 0,52.

5.4.4. Model kinetyczny badanej reakcji hydrolizy

W celu opracowania modelu kinetycznego badanej reakcji hydrolizy pod uwagę wzięto kilka empirycznych modeli matematycznych dostępnych w pracach przeglądowych (Bansal i in. 2009; Peri i in. 2007). Zdecydowanie najlepsze wyniki otrzymano dla modelu empirycznego opracowanego przez Ohmine i in. (1983), który podaje następującą zależność stężenia produktu hydrolizy od czasu prowadzenia reakcji i początkowego stężenia substratu:

$$C_p = \frac{C_{S,0}}{k} \ln \left(1 + \frac{r_0 k t}{C_{S,0}} \right) \quad (5.3)$$

gdzie:

C_p – stężenie produktu,

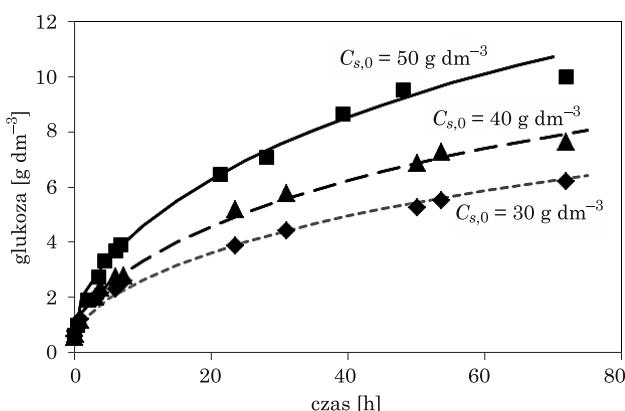
$C_{S,0}$ – początkowe stężenie substratu (surowca lignocelulozowego),

r_0 – początkowa szybkość reakcji,

k – stała kinetyczna opisująca opóźnienie reakcji,

t – czas.

Na rysunku 11 przedstawiono porównanie danych doświadczalnych i obliczeń modelowych dla trzech badanych początkowych stężeń surowca lignocelulozowego ($C_{S,0}$). Punkty na wykresie odpowiadają danym doświadczalnym, zaś linie są krzywymi wyznaczonymi na podstawie korelacji modelowej (5.3). Jak widać, we wszystkich przypadkach krzywe modelowe dobrze opisują przebieg reakcji.



Rys. 11. Porównanie danych doświadczalnych i krzywych modelowych dla trzech różnych początkowych stężeń surowca lignocelulozowego

W tabeli 4 zestawiono wyniki estymacji parametrów kinetycznych modelu (5.3) wraz z wartościami błędów bezwzględnych dopasowania danych doświadczalnych do obliczeń modelowych. Jak można zauważyć, parametr k

przyjmowały bardzo zbliżone wartości dla wszystkich badanych stężeń surowca lignocelulozowego, natomiast wartość początkowej szybkości reakcji (r_0) wzrastała wraz ze zwiększeniem się stężenia surowca w mieszaninie reakcyjnej.

Tabela 4
Wyniki estymacji parametrów modelu kinetycznego (cc,0 – początkowe stężenie celulozy)

$C_{S,0}$ (g·dm ⁻³)	$C^{C,0}$ (g·dm ⁻³)	r_0 (g·dm ⁻³ ·h ⁻¹)	k	$\Sigma(\text{mod}_i\text{-dos}_i)^2$
50	19,52	0,50	3,88	10,51
40	15,61	0,36	4,20	7,10
30	11,71	0,28	3,92	7,23

Z uwagi na heterogeniczny charakter hydrolizy surowców lignocelulozowych oraz na fakt, że zastosowany do opisu przebiegu reakcji model nie wyjaśnia mechanizmów przemian, wydaje się, że nie powinien on być zastosowany do uogólniania wyników doświadczeń. W celu opracowania modelu kinetycznego wyjaśniającego wszystkie mechanizmy i aspekty enzymatycznej hydrolizy surowców lignocelulozowych potrzebne jest wykonanie szeregu dodatkowych badań w różnych warunkach oraz z użyciem surowców różnego pochodzenia.

Zakres stosowalności zaproponowanego w pracy modelu kinetycznego (5.3) dotyczy wyłącznie warunków, w których prowadzono niniejsze badania, tzn. rodzaju enzymu, rodzaju substratu, warunków środowiska. Niemniej jednak dobrze opisuje on przebieg reakcji hydrolizy użytego w badaniach surowca i może być z powodzeniem wykorzystany do opracowania projektu procesowego instalacji pilotowej do enzymatycznej hydrolizy surowca z wierzyby energetycznej poddanego wstępnej obróbce metodą eksplozji pary.

5.4.5. Wpływ dawki preparatu Cellic® CTec2 na stopień przemiany

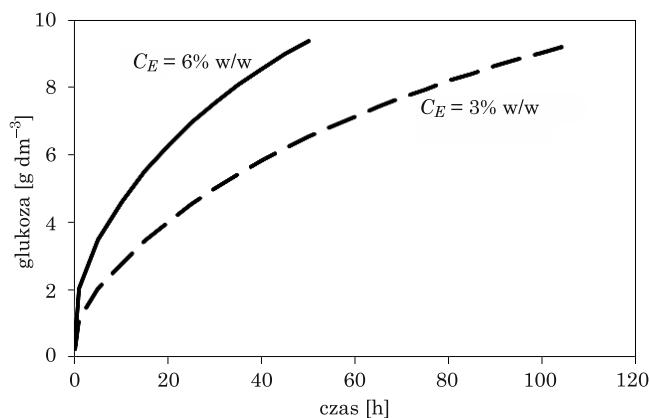
Jak powszechnie wiadomo, w pewnym zakresie początkowa szybkość reakcji jest liniowo zależna od stężenia enzymu użytego w danej reakcji enzymatycznej. Jak pokazano na rysunku 1, szybkość badanej reakcji w jej początkowym etapie rośnie liniowo wraz ze wzrostem stężenia preparatu w zakresie od 1% do 6% w/w. Zatem im większe jest stężenie enzymu użytego w reakcji, tym krótszy jest czas potrzebny do osiągnięcia danego stopnia przereagowania substratu. W tabeli 5 przedstawiono wartości stopnia przemiany surowca lignocelulozowego w badanych reakcjach uzyskane po 72 h prowadzenia hydrolizy z użyciem 6% i 3% w/w stężenia preparatu Cellic®

CTec2 odniesionego do suchej masy surowca. Okazało się, że w przypadku reakcji prowadzonej z użyciem 6% w/w preparatu enzymatycznego stopeń przemiany jest ok. 30% większy niż dla reakcji z użyciem 3% w/w preparatu.

Tabela 5
Stopnie przemiany badanego surowca uzyskane po 72 h prowadzenia hydrolizy dla dwóch różnych stężeń preparatu Cellic® CTec2

Stężenie preparatu Cellic® CTec2	α_g po 72 h
6% w/w	0,51
3% w/w	0,40

Na rysunku 12 przedstawiono zależności stężenia glukozy od czasu trwania hydrolizy, wyznaczone na podstawie opracowanego w ramach pracy modelu kinetycznego dla reakcji prowadzonych z użyciem 3% i 6 % w/w preparatu enzymatycznego Cellic® CTec2. Jak widać, zastosowany model kinetyczny procesu hydrolizy przewiduje, że aby osiągnąć takie samo stężenie produktu, w przypadku użycia 2 razy niższego stężenia enzymu, należy prowadzić hydrolizę ok. 2 razy dłużej.



Rys. 12. Zależność stężenia glukozy uwolnionej z substratu lignocelulozowego od czasu dla reakcji prowadzonej z wykorzystaniem preparatu Cellic® CTec2 w stężeniu 3% i 6% w/w

5.5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań enzymatycznej hydrolizy surowca lignocelulozowego w postaci zrębów wierzby energetycznej poddanych uprzednio obróbce wstępnej metodą eksplozji pary można sformułować następujące wnioski:

- badany surowiec lignocelulozowy ulegał enzymatycznej hydrolizie prowadzonej z użyciem preparatu enzymatycznego Cellic® CTec2;
- głównym produktem hydrolizy w badanych warunkach jest glukoza;
- w trakcie badanego procesu z surowca lignocelulozowego nie była uwalniana celobioza będąca inhibitorem kompetencyjnym enzymów celulolitycznych;
- dodatek do mieszaniny reakcyjnej preparatu Cellic® HTec2, który zgodnie z zaleceniami producenta zwiększa efektywność hydrolizy surowca lignocelulozowego, nie wpływał w znaczący sposób na przebieg badanej reakcji;
- wykazano zależność szybkości reakcji hydrolizy od temperatury inkubacji i odczynu pH mieszaniny reakcyjnej: w badanym zakresie tych parametrów stopień hydrolizy po 72 h trwania procesu wyniósł od 0,31 do 0,51;
- we wszystkich badanych układach reakcyjnych po ok. 50 h zaobserwowano wyraźne zahamowanie procesu hydrolizy – okazało się, że zjawisko to wynikało z wyczerpywania się w surowcuwiązań dostępnych dla stosowanych katalizatorów, a nie z dezaktywacji enzymów bądź ich adsorpcji na liginie;
- na podstawie statystycznej obróbki danych doświadczalnych wyznaczono optymalną wartość temperatury ($T = 43,8^{\circ}\text{C}$) i odczynu pH (5,55), dla których stopień hydrolizy przyjmował największe wartości: przyjęty model regresji przewiduje, że w optymalnych warunkach procesowych stopień hydrolizy badanego surowca po 72 h jest równy 0,52;
- przebieg reakcji enzymatycznej hydrolizy surowca lignocelulozowego z wierzby energetycznej po obróbce wstępnej metodą eksplozji pary można opisać modelem empirycznym opracowanym przez Ohmine i in. (1983): wykazano, że wyznaczona stała k w tym modelu nie zależy od początkowego stężenia substratu, a krzywe modelowe są zgodne z danymi doświadczalnymi;
- początkowa szybkość badanej reakcji hydrolizy jest liniowo zależna od stężenia preparatu Cellic® CTec2 w zakresie od 1 do 6 % w/w;
- opracowany model kinetyczny badanego procesu przewiduje, że dwukrotne zwiększenie stężenia preparatu Cellic® CTec2 w mieszaninie reakcyjnej pozwala na około dwukrotnie skrócenie czasu prowadzenia procesu.

Literatura

- Bansal P., Hall M., Realff M.J., Lee J.H., Bommarius A.S. 2009. *Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates*, Biotechnol. Adv., 27: 833–848.
- Cheng J.J., Timilsina G.R. 2011. *Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review*. Renew Energ, 36: 3541–3549.
- Dąbkowska K., Chmielewska I., Pilarek M., Szewczyk K.W. 2012. *Wpływ metody wstępnej obróbki surowca lignocelulozowego na efektywność hydrolizy enzymatycznej*. Inż. Ap. Chem., 51: 112–114.

- Horn S.J., Esteves M.M., Nielsen H.K., Linjordet R., EijsinkV.G. 2011. *Biogas production and saccharification of Salix pretreated at different steam explosion conditions*. Bioresour. Technol., 102: 7932–7936.
- Ohmine K., Ooshima H., Harano Y. 1983. *Kinetic study on enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase from Trichoderma viride*. Biotechnol. Bioeng., 25: 2041-2053.
- Peri S., Karra S., Lee Y.Y., Karim M.N. 2007. *Modeling intrinsic kinetics of enzymatic cellulose hydrolysis*. Biotechnol. Prog., 23: 626–637.
- Rabinovich M.L., Melnick M.S., Bolobova A.V. 2002. *The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes*. Biochem. (Moscow), 67: 850–871.
- Ramos L.P. 2003. *The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials*. Química Nova, 26: 863–871.
- Sun Y., Cheng J. 2002. *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Bioresource Technol., 83: 1–11.
- Szewczyk K.W. 2010. *Perspektywy rozwoju biotechnologii przemysłowej w Unii Europejskiej*. Wiad. Chem., 64: 45–59.
- Taherzadeh M.J., Karimi K. 2008. *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review*. Int. J. Mol. Sci., 9: 1621–1651.
- Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y. 2005. *Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover*. Bioresour. Technol., 96: 2026–2032.
- Zhang Y., Xu J.-L., Xu H.-J., Yuan Z.-H., Guo Y. 2010. *Cellulase deactivation based kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw*. Bioresour. Technol., 101: 8261–8266.

6. Optymalizacja warunków hydrolizy enzymatycznej substratów lignocelulozowych

***Małgorzata Lewandowska, Włodzimierz Bednarski,
Magdalena Świątek***

6.1. Wprowadzenie

Hydroliza enzymatyczna to istotny etap w technologii pozyskiwania alkoholu etylowego. Polega na degradacji polisacharydów zawartych w surowcu do cukrów prostych – w kolejnym etapie fermentowanych przez drożdże. Katalizatorami reakcji zachodzących w warunkach przetwarzania materiału lignocelulozowego są enzymy z grupy cellulaz: endocelulazy (EC 3.2.1.4) powodujące rozpad wewnętrznych wiązań glikozydowych celulozy oraz egzoceululazy (EC 3.2.1.91) odpowiedzialne za uwalnianie dwucukru celobiozy od redukującego bądź nie końca łańcucha wymienionego polimeru. Istotną rolę w procesie hydrolizy celulozy pełni również β -glukozydaza (EC 3.2.1.21) odpowiadająca za rozkład celobiozy do dwóch cząsteczek glukozy. Ta reakcja sprzyja ograniczeniu zjawiska hamowania hydrolizy półproduktem reakcji. Większość cellulaz charakteryzuje się zdolnościami do prowadzenia katalizy, gdy zachowana jest temperatura ok. 50°C i kwasowość środowiska pH 4-5 (Hahn-Hägerdaal i in. 2006). Cały proces zachodzi w trzech kolejnych etapach: adsorpcja cellulaz na powierzchni celulozy, hydroliza celulozy do glukozy oraz desorpcja cellulaz z powierzchni materiału (Han i Chen 2010; El-Zawawy 2011). Konwersja heteropolimeru hemicelulozy do cukrów prostych wymaga synergistycznego działania enzymów z grup ksylanaz, mannanaz wspomaganych β -glukuronidazą, α -arabinofuranozydazą i esterazą acetylksylanu odpowiedzialnych z odszczepianie bocznych grup i degradację heteroksydanu (Kumar i in. 2009).

Główym źródłem otrzymywanych przemysłowo enzymów degradujących polisacharydy lignocelulozy są grzyby strzępkowe, zaś do najbardziej produktywnych i wydajnych zalicza się rodzaj *Trichoderma*. Wysoce reprezentatywnymi przedstawicielami tej grupy są *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei*. Handlowe preparaty cellulaz produkowane są komercyjnie z genetycznie modyfikowanych mutantów *Trichoderma* przez wiele światowych

firm. (Singhania i in. 2010). Grzyby z rodzaju *Aspergillus* są z kolei bogatym źródłem do pozyskiwania α -glukozydazy, ksylanaz i ksyloglukanaz. Rodzaj *Penicillium* uznawany jest za alternatywnego producenta celulaz charakteryzujących się mniejszą podatnością na hamujący wpływ inhibitorów oraz słabszym powinowactwem do ligniny (Gusakov 2011). Preparaty enzymatyczne oferowane przez komercyjnych producentów charakteryzują się różnym udziałem pojedynczych celulaz, czasem są też dostępne w kompozycjach z ksylanazami (Cellic® HTec2 firmy Novozymes, Accelerase®TRIO™ firmy Genencor). Mimo to dobór optymalnego "koktajlu" enzymatycznego stanowi nadal przedmiot badań, a liczne doniesienia literaturowe wskazują na kluczową rolę synergistycznego działania dobieranych komponentów (Qing, Wyman 2011; Billard i in. 2012).

Efektywność hydrolizy enzymatycznej surowców lignocelulozowych uzałączniona jest od ich rodzaju, stopnia dojrzałości i wynikającego z tego składu chemicznego oraz sposobu zastosowanej obróbki wstępnej. Odgrywa ona kluczową rolę w procesie hydrolizy pochodnych lignocelulozy. Specyficzna budowa kompleksu lignocelulozowego determinuje wysoką odporność zawartych w nim polisacharydów na biologiczne transformacje. Bezpośrednia hydroliza natywnego substratu lignocelulozowego nie pozwala na uzyskanie wyższego niż 20% poziomu wydajności procesu. Celem zapewnienia korzystniejszych rezultatów niezbędne jest zastosowanie wstępnego traktowania materiału metodami fizycznymi, fizykochemicznymi, chemicznymi, biologicznymi bądź ich kombinacją. Do metod fizycznych zalicza się obróbkę mechaniczną i rozkład termiczny. Obróbka fizykochemiczna obejmuje traktowanie substratów amoniakiem, stosowanie eksplozji pary lub działanie dwutlenkiem węgla. Metody chemiczne polegają na zastosowaniu kwasów, zasad lub rozpuszczalników organicznych – w grupie tej mieści się również ozonoliza i oksydacyjna delignifikacja. Biologiczna metoda wstępnego traktowania polega na zastosowaniu odpowiednich mikroorganizmów, zdolnych do rozkładu kompleksu lignocelulozowego. Najbardziej obiecującymi wydają się być grzyby z klasy Basidiomycetes: *Pycnoporus cinnabarinus*, *Phanerochaete chrysopurum*, *Trametes* sp. i *Crinipellis* sp. które charakteryzują się zdolnościami do biosyntezы enzymów lignolitycznych, tj. lakkazy oraz peroksydaz: ligninowej (LiP) i Mn-zależnej (MnP). (Gupta i in. 2011; Saritha i in. 2012). Szeroko prowadzone badania sugerują, iż nie można wskazać jednej niezawodnej procedury obróbki wstępnej dla wszystkich surowców lignocelulozowych. Wysoka temperatura i kwasy zostały jako pierwsze zastosowane do chemicznej degradacji celulozy, inne – np. działanie czynnikami hydrotermicznymi lub alkalicznymi – nadal są testowane i dopracowywane. Wymienione metody charakteryzują się wysoką energochlonnością i tendencją do wytwarzania uciążliwych produktów ubocznych, wynikającą z neutralizacji. Po zastosowaniu niektórych z nich całkowita wydajność procesu przetwarzania biomasy może

być dodatkowo obniżana przez tworzące się przy okazji inhibitory, takie jak słabe kwasy, furany i związki fenolowe. Do zalet biologicznej obróbki wstępnej wykorzystującej mikroorganizmy i ich enzymy należy zaliczyć: niskie zapotrzebowanie na energię, minimalne wytwarzanie odpadów i brak negatywnego wpływu na środowisko. Jednakże jest to mało skuteczne i długotrwałe (Shi i in. 2008; Singh i in. 2011).

Doskonalenie procesu enzymatycznej hydrolizy pochodnych lignocelulozy może odbywać się na wielu płaszczyznach. Na uwagę zasługuje również powiązanie hydrolizy z następującym po niej procesem fermentacji. Wielu badaczy optuje za prowadzeniem obu reakcji metodą simultaniczną w jednym bioreaktorze, co sprzyja oszczędnościom sprzętowym oraz poprawia efektywność hydrolizy dzięki zniesieniu zjawiska hamowania produktem. Metoda ta ma jednak swoje ograniczenia wynikające z braku wspólnych warunków inżynierii środowiska dla optymalnego działania enzymów i mikroorganizmów prowadzących fermentację, a to zmusza do wyboru kompromisowych parametrów obu reakcji.

6.2. Metody

6.2.1. Surowce badawcze

Głównym surowcem wykorzystywanym w badaniach była wierzba wiciowa (*Salix viminalis*) pochodząca z upraw doświadczalnych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Porównawczo przeprowadzono również doświadczenia z udziałem robinii akacjowej (*Robinia pseudoacacia L.*) oraz topoli (*Populus L.*). Substraty w postaci wysuszonej wykorzystywano w formie zrębków lub poddawano mieleniu w urządzeniu Retch SM 100 do poziomu rozdrobnienia 1–2 mm. Określono udział poszczególnych frakcji włókna w surowcach, stosując urządzenie FibertecTM 1020 (FOSS): oznaczenie zawartości włókna neutralno-detergentowego (NDF) wg Van Soesta (Van Soest i in. 1991), oznaczenie zawartości włókna kwaśno-detergentowego (ADF) oraz ligniny kwaśno-detergentowej (ADL) (PN-EN ISO 13906 2009). Zawartość celulozy wyznaczono z różnicy pomiędzy udziałem frakcji ADF i ADL, natomiast zawartość hemicelulozy z różnicy pomiędzy udziałem frakcji NDF i ADF.

6.2.2. Preparaty enzymatyczne

W doświadczeniach wykorzystano następujące preparaty enzymatyczne w dawkach (jednostkach odpowiedniej aktywności) / g s.s. substratu:

- cellulaza (Celluclast, Novozymes) – 15 FPU¹
- cellulaza (z *T. longibrachiatum*, Sigma) – 15 FPU¹

¹ 1 FPU – ilość enzymu uwalniająca 1 µmol glukozy z bibuły Whatman no. 1 w czasie 1 min.

- celobiaza (Novozyme 188, Novozymes) – 30 CBU²
- ksylanaza (Pentopan, Novozymes) – 15 FXU³
- ksylanaza (z *T. longibrachiatum*, Sigma) – 15 FXU³

6.2.3. Obróbka wstępna

6.2.3.1. Metoda biologiczna

20 g s.s. wierzby wiciowej w postaci zmielonej umieszczano w butlach typu Roux i dodawano płynnego podłoża wg Kirka (1986) oraz buforu ftalanowego (kwaśny ftalan potasowy – wodorotlenek sodu w stężeniu 0,1 M o kwasowości pH 5,0), ustalając stężenie zawiesiny na poziomie 20%. Tak przygotowany materiał zaszczepiano inoculum grzybów *Trametes versicolor* 7 lub *Pleurotus ostreatus* 13 w postaci zmywu ze skosu o pow. 5 cm². Hodowle grzybów (obróbkę biologiczną) prowadzono przez 60 dni w temperaturze 25°C (*P. ostreatus*) lub 30°C (*T. versicolor*). W celu określenia wpływu namażania badanych grzybów na skład materiału lignocelulozowego w odstępach 15-dniowych charakteryzowano wstępnie przetworzony substrat poprzez analizę jego frakcji (celulozy, hemiceluloz i ligniny), określenie strat masy oraz poprzez wykorzystanie go do hydrolizy enzymatycznej z udziałem celulolitycznych preparatów handlowych.

6.2.3.2. Metoda fizykochemiczna

Wierzbę wiciową poddano wstępнемu traktowaniu, stosując następujące związki chemiczne i parametry działania:

- H₂SO₄ w stężeniach 0,01–0,05 g/g s.s. materiału w warunkach ciśnieniowych (18–26 bar) z rozprężaniem lub bez, z wykorzystaniem wierzby w formie zrębków;
- NaOH w stężeniach 0,1–0,2 g/g s.s. materiału w zakresie temperatur (120–200°C) i czasu 0,5–3 h, przy czym traktowanie w warunkach ciśnieniowych (200°C 18 bar) przeprowadzono w wariantach z rozprężaniem materiału i bez, wykorzystując zarówno wierzdę w postaci zrębków, jak i mieloną.

Substrat po wstępnej obróbce w postaci zrębków był suszony w warunkach 60°C/48 h i mielony do poziomu rozdrobnienia 1–2 mm. W postaci zmielonej był kierowany do procesu hydrolizy lub poddawany detoksykacji. Operację detoksykacji przeprowadzono poprzez oddzielenie frakcji płynnej

² 1 CBU – ilość enzymu przekształcająca 1 µmol celulozy do 2 µmoli glukozy w czasie 1 min w 50°C i pH 4,8.

³ 1 FXU – ilość enzymu uwalniająca 1 µmol ksylozy w czasie 1 min.

po obróbce wstępnej metodą wirowania w warunkach: RCF 4240·g, temperatura 5°C, czas 10 min. Następnie do frakcji stałej dodano wody destylowanej do wyjściowej masy próby i ponownie odwirowano przy zachowaniu wymienionych parametrów. W substracie poddanym obróbce i przepłukiwaniu przed hydrolizą sprawdzono skład podstawowych frakcji lignocelulozy celem określenia strat wynikających z tego zabiegu. Frakcja stała po uzupełnieniu wodą do wyjściowej masy próby przed obróbką i korekcie kwasowości stanowiła substrat do hydrolizy enzymatycznej.

6.2.3.3. Hydroliza enzymatyczna

Hydroliza enzymatyczna materiału natywnego oraz po obróbce wstępnej była prowadzona w zawiesinie o stężeniu 10% m/v w warunkach: temperatura 40–50°C, kwasowość środowiska pH 4,0–5,0, czas 72 h w inkubatorze Innova 40, New Brunswick Scientific z zastosowaniem wytrząsania (250 obr·min⁻¹). Hydrolizę prowadzono, wykorzystując wcześniej wymienione preparaty enzymatyczne w różnych kompozycjach. Efekty hydrolizy mierzono stężeniem cukrów redukujących oznaczanych metodą kolometryczną z odczynnikiem DNS (Miller 1959). Na podstawie ilości wydzielonych cukrów wyznaczano wydajność procesu hydrolizy, obliczając ją z następującego wzoru:

$$\text{Wydajność} = \frac{c \times 0,9}{p} \times 100 [\%] \quad (6.1)$$

gdzie:

c – stężenie cukrów redukujących w hydrolizacie (g/dm³),

p – zawartość polisacharydów (celulozy i hemiceluloz) w materiale natywnym (g/dm³),

0,9 – współczynnik przeliczeniowy cukrów prostych względem polisacharydów.

Wybrane hydrolizaty przeznaczono do analizy chromatograficznej HPLC celem identyfikacji i określenia ilościowego ewentualnie obecnych związków inhibitujących fermentację. Zastosowano następujące wzorce oznaczeń: kwas mrówkowy, kwas lewulinowy, furfural, 5-hydroksymetylofurfural, 4-hydroksybenz-aldehyd, wanilina. Stężenie oznaczanych inhibitorów w hydrolizatach wyznaczano z krzywych wzorcowych i wyrażano w mg/cm³.

6.3. Wyniki i dyskusja

Udział podstawowych frakcji (celulozy, hemicelulozy i ligniny) substratów do hydrolizy enzymatycznej zestawiono w tabeli 1.

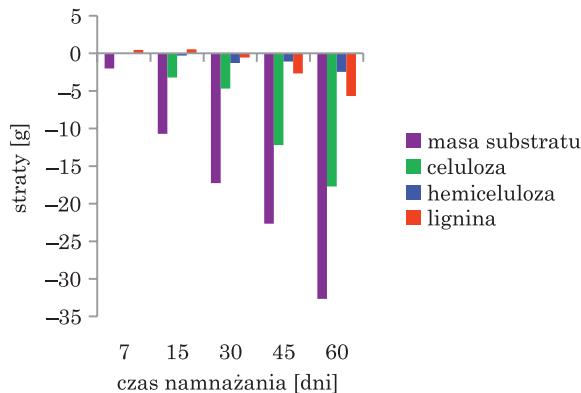
Tabela 1

Skład podstawowych frakcji lignocelulozy w substratach do hydrolizy enzymatycznej (% s.s.)

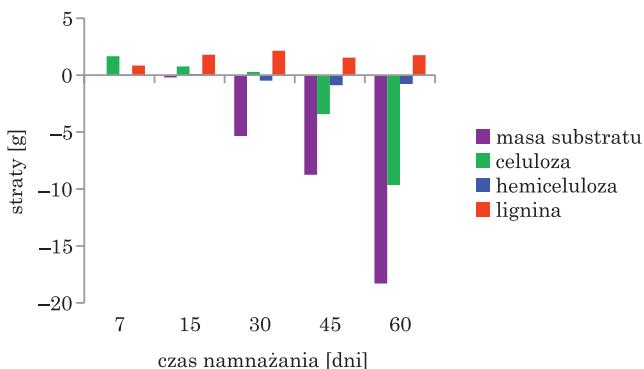
Substrat \ Frakcja	Celuloza	Hemiceluloza	Lignina	Suma polisacharydów (celulozy + hemicelulozy)
Topola	45,20	13,96	17,19	59,16
Wierzba	50,72	12,47	15,92	63,19
Robinia	40,69	20,24	13,86	60,93

Wierzba wiciowa charakteryzowała się najwyższą zawartością celulozy (50,7%) i najniższym udziałem hemiceluloz (12,5%). W składzie pozostałych substratów celuloza również stanowiła frakcję dominującą, jednak robinia charakteryzowała się wyższym udziałem hemiceluloz (20,2%), natomiast topola zawierała najwięcej ligniny (17,2%). W pierwszym etapie doświadczeń wybrany substrat – wierzbową wiciową wykorzystano jako główny składnik podłoża do namnażania grzybów z rodzaju *T. versicolor* oraz *P. ostreatus* 13 o potencjalnych zdolnościach do degradacji kompleksu lignocelulozowego wynikających ze zdolności do sekrecji peroksydazy ligninowej (LiP) i manganozależnej (MnP) oraz lakkazy. W trakcie 60-dniowej hodowli grzybów kontrolowano zmiany w składzie podstawowych frakcji wierzby oraz oceniano podatność na hydrolizę enzymatyczną. Działanie grzybów białej zgnilizny polega na degradacji związków drewna w metabolizmie pierwotnym, począwszy od hydrolizy hemicelulozy i celulozy. Wydzielone cukry proste są niezbędne do rozpoczęcia procesu delignifikacji. Po wyczerpaniu podstawowych pierwiastków biogennych, takich jak azot, siarka, fosfor, potas, oraz źródeł węgla i energii indukowany jest metabolizm wtórny, podczas którego następuje rozkład ligniny (Górská i in. 2006). Analiza składu wierzby wiciowej po hodowli *T. versicolor* wykazała zmiany w proporcjach udziału elementów lignocelulozy – strata celulozy wyrażona w stosunku do próby „0” wyniosła 37%, hemiceluloz 34,68%, natomiast ubytek ligniny 26,34%. W trakcie namnażania grzyba *P. ostreatus* 13 ogólne straty masy substratu były dwukrotnie mniejsze niż odnotowane w hodowlach *T. versicolor*, w tym ubytek celulozy wyniósł 19%, a hemiceluloz 12,59% (rys. 1).

Podobne tendencje zaobserwowali w swoich badaniach Tanigushi i in. (2005), którzy wykorzystali grzyby białej zgnilizny do biologicznej obróbki słomy ryżowej, oceniając ilościowe i strukturalne zmiany w jej składzie. Namnażanie *T. versicolor* przyczyniło się do 30% ubytku masy substratu, natomiast namnażanie *P. ostreatus* spowodowało nieco mniejszą stratę – ok. 25% (rys. 2).



Rys. 1. Straty masy składników lignocelulozy w wierzbie wiciowej w trakcie 60 dni hodowli grzyba *T. versicolor* 7 wyrażone w g/100 g wyjściowej masy substratu

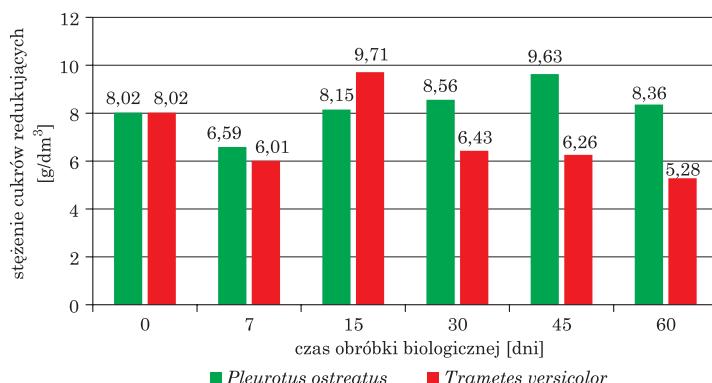


Rys. 2. Straty masy składników lignocelulozy w wierzbie wiciowej w trakcie 60 dni hodowli grzyba *P. ostreatus* 13 wyrażone w g/100 g wyjściowej masy substratu

Wierzbę wiciową przed i po obróbce biologicznej z wykorzystaniem grzybów *T. versicolor* 7 i *P. ostreatus* 13 poddano 72-godzinnej hydrolizie enzymatycznej z udziałem preparatów firmy Novozymes (Celuclast+Pentopan+Novozyme 188), a jej efektywność oceniono na podstawie ilości wydzielanych cukrów redukujących (rys. 3).

Stwierdzono, że skuteczność takiego sposobu wstępnego traktowania substratu była niezadowalająca – uzyskano zaledwie kilkuprocentową poprawę wydajności hydrolizy w porównaniu do doświadczenia z udziałem materiału natynowego, co w powiązaniu z odnotowanymi stratami celulozy wskazuje na brak przydatności jej stosowania w procesie biokonwersji do etanolu. W doświadczeniach przeprowadzonych przez Hattaka i in. (cyt. za Talebnia i in. 2010) wykazano, że hydroliza słomy pszenicznej poddanej uprzednio 5-tygodniowej biologicznej obróbce wstępnej z udziałem grzyba *P. ostreatus*

spowodowała przekształcenie ok. 35% substratu do cukrów redukujących, podczas gdy efektywność hydrolizy słomy natywnej była około trzykrotnie mniejsza. Również Taniguchi i in. (2005) wykazali, że obróbka słomy ryżowej z wykorzystaniem tego samego grzyba przyczyniła się do wzrostu podatności wymienionego substratu na hydrolizę enzymatyczną.

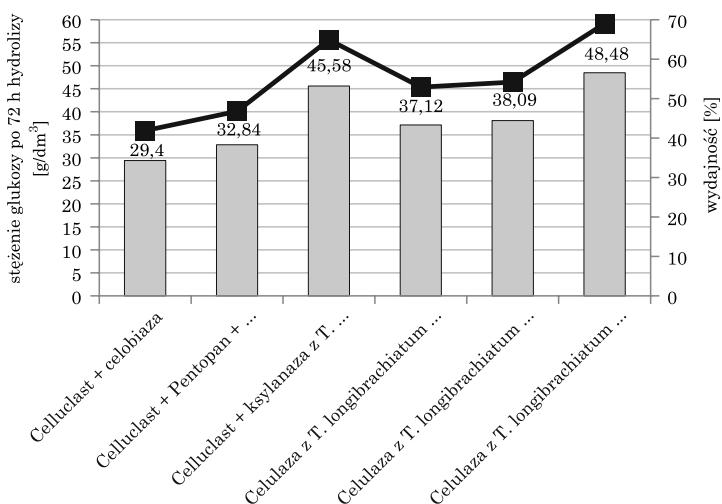


Rys. 3. Efektywność 72-godzinnej hydrolizy wierzby wiciowej wstępnie wykorzystanej do namnażania grzyba *P. ostreatus* 13 lub *T. versicolor* w ciągu 60 dni obróbki

Z kolei Hwang i in. (2008) zastosowali *T. versicolor* do obróbki biologicznej rzębków sosny (*Pinus strobus L.*), uzyskując w wyniku sekwencyjnie przeprowadzonej hydrolizy ok. 45% wydajności (mierzonej ilością wydzielonych cukrów). Doświadczenia własne przeprowadzone na materiale drzewnym nie potwierdziły tej tendencji.

Dalsze badania poświęcono opracowaniu metod skutecznej obróbki fizyko-chemicznej. Wśród sposobów obróbki biomasy lignocelulozowej szeroko opisywanych w literaturze i uznawanych za skuteczne sporo uwagi poświęca się wykorzystaniu środowiska kwaśnego w połączeniu z eksplozją parową (Chen i in. 2011; Jung i in. 2013). W badaniach własnych traktowanie wierzby roztworem kwasu siarkowego w stężeniach 0,01–0,05 g/g substratu w połączeniu z ciśnieniem rzędu 18–26 bar, generującym temperatury powyżej 220°C, spowodowało dość istotne zmiany w strukturze drewna, co skutkowało poprawą dostępności polisacharydów do hydrolizy enzymatycznej. Stężenie cukrów prostych uwolnionych w trakcie procesu wynosiło 15–21 g/dm³ medium poreakcyjnego, w zależności od wariantu obróbki (rys. 3) osiągając wydajność 32,2% w doświadczeniu o najbardziej rygorystycznych parametrach obróbki (ciśnienie powyżej 26 bar + rozprężanie). Sassner i in. (2008) w swoich badaniach uzyskali znacznie korzystniejsze rezultaty: w wyniku hydrolizy wierzby traktowanej H₂SO₄ i eksplozją parową uzyskano 55,6 g glukozy i ksylozy ze 100 g materiału natywnego, co stanowiło 88% wartości teoretycznej (w stosunku do polisacharydów zawartych w materiale natywnym).

Eksperymenty prowadzone z udziałem wodorotlenku sodowego obejmowały dwa warianty temperaturowe: 121°C i 200°C. W doświadczeniach realizowanych w 121°C czynnikiem zmiennym była dawka NaOH (0,1–0,2 g/g s.s. wierzby) oraz czas przetrzymywania w autoklawie (1–3 h). Stwierdzono, że najkorzystniejszy efekt spośród analizowanych wariantów obróbki przyniosły doświadczenie z udziałem materiału przetrzymywanego przez 3 h w ustalonej temperaturze niezależnie od dawki wodorotlenku. Hydroliza enzymatyczna tak przygotowanego substratu z udziałem preparatów firmy Novozymes spowodowała uwolnienie ok. 27 g/dm³ cukrów redukujących, co skutkowało wydajnością ponad 41%. Zbliżone wyniki uzyskali w swoich badaniach Gupta i in. (2011), którzy poddali hydrolizie enzymatycznej sosnę (*Pinus juliflora*) wstępnie traktowaną z udziałem 5% roztworu NaOH w temperaturze 121°C, uzyskując wydajność uwolnionych cukrów z substratu na poziomie 52%. Silverstein i in. (2007) zastosowali podobną metodę do obróbki wstępnej odpadów bawełnianych. Za najkorzystniejsze warunki procesu uznali: stężenie NaOH 2%, temperaturę 121°C, czas 60 min. Pozwoliło to na uzyskanie w kolejnym etapie wydajności hydrolizy enzymatycznej celulozy na poziomie 60,8%. Wybrane parametry obróbki zastosowano w kolejnych doświadczeniach mających na celu sprawdzenie przydatności preparatów enzymatycznych cellulazy i ksylanazy z *T. longibrachiatum*. Wymienione enzymy zastosowano w różnych kompozycjach z preparatami firmy Novozymes. Jak widać na rysunku 4, zestawem najsukceszniej hydrolizującym substrat były cellulaza i ksylanaza z *T. longibrachiatum* w połączeniu z β -glukozydazą Novozyme 188 (Świątek i in. 2012).



Rys. 4. Porównanie efektów 72-godzinnej hydrolizy polisacharydów wierzby po obróbce alkalicznej (121°C/3h) w zależności od zastosowanej kompozycji preparatów enzymatycznych

Wybrana kompozycja enzymów została również zastosowana do hydrolizy robinii i topoli oraz w kolejnych doświadczeniach sprawdzających skuteczność innych sposobów wstępного traktowania substratu. Postęp hydrolizy robinii, topoli i wierzby przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2
Postęp hydrolizy polisacharydów wierzby, robinii lub topoli po obróbce alkalicznej
z wykorzystaniem wybranej kompozycji enzymów

Czas hydrolizy (h)	Wierzba		Robinia akacjowa		Topola	
	stężenie uwolnionej glukozy (g/dm ³)	wydajność* (%)	stężenie uwolnionej glukozy (g/dm ³)	wydajność* (%)	stężenie uwolnionej glukozy (g/dm ³)	wydajność* (%)
0	8,64	12,3	12,41	18,3	11,51	17,5
6	25,61	36,5	25,42	37,6	23,38	35,6
12	28,71	40,9	28,91	42,7	26,36	40,1
24	33,34	47,5	32,38	47,8	30,39	46,2
30	36,03	51,3	33,76	49,9	32,13	48,9
36	38,35	54,6	35,02	51,7	32,34	49,2
48	40,78	58,1	37,90	56,0	36,70	55,8
54	40,85	58,2	40,15	59,3	38,64	58,8
60	47,30	67,4	41,30	61,0	39,05	59,4
72	48,48	69,0	45,26	66,9	40,60	61,8

* 3 h; 121°C; 0,1 g NaOH na g substratu

Próba wykorzystania do hydrolizy enzymatycznej innych niż wierzba surowców ligninozelulozowych (robinii i topoli) nie przyniosła korzystniejszych rezultatów. Wydajność biokonwersji polisacharydów robinii do cukrów redukujących była zbliżona do uzyskiwanych z udziałem wierzby (67% wobec 69%). Topola okazała się mniej podatna na hydrolizę w zaproponowanych warunkach. Wszystkie sprawdzone substraty charakteryzowały się zbliżonym składem chemicznym oraz strukturą lignocelulozy (drewno twarde), stąd skuteczność hydrolizy nie była istotnie zróżnicowana. Podobne rezultaty uzyskali Cara i in. (2006), prowadząc hydrolizę enzymatyczną wstępnie traktowanego obróbką ciśnieniowo-alkaliczną drewna drzewa oliwnego: efektywność hydrolizy enzymatycznej mierzona stężeniem cukrów prostych mieściła się w zakresie 39,6–59,3 g/dm³. Większość badań prowadzonych z wykorzystaniem

materiału drzewnego w kierunku pozyskiwania etanolu opiera się na stosowaniu technik wstępnej obróbki kwasowej lub autohydrolizy hydrotermicznej (Gütsch i Sixta 2011; Jung i in. 2013; Cai i in. 2012). Najnowsze badania, w których stosowane są katalizatory alkaliczne podczas wstępnego przygotowania materiału lignocelulozowego przed hydrolizą enzymatyczną, dotyczą głównie substratów trawiastych lub słomiastych (McIntosh i Vancov 2010; Kim i Han 2012; Karki i in. 2012; Sills i Gossett 2011). Taki sposób obróbki przynosi jednak korzyści wynikające z ograniczonego formowania substancji o charakterze inhibitorów hydrolizy i fermentacji.

Kolejny etap doświadczeń obejmował określenie wpływu podwyższonej temperatury (200°C) i zabiegu rozprężania na skuteczność obróbki alkalicznej wierzby. Eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem substratu w formie zrębków lub mielonego, przy czym po obróbce i wysuszeniu ujednoliciono go do jednakowej formy rozdrobnienia. Materiał został oceniony pod względem zmian w składzie podstawowych frakcji (tab. 3) i poddany hydrolizie po ustaleniu stężenia 10% udziału frakcji stałej w wodzie. Zastosowanie temperatury 200°C oraz gwałtownego rozprężania substratu po działaniu termicznym przyczyniło się do istotnych zmian w składzie wierzby wiciowej.

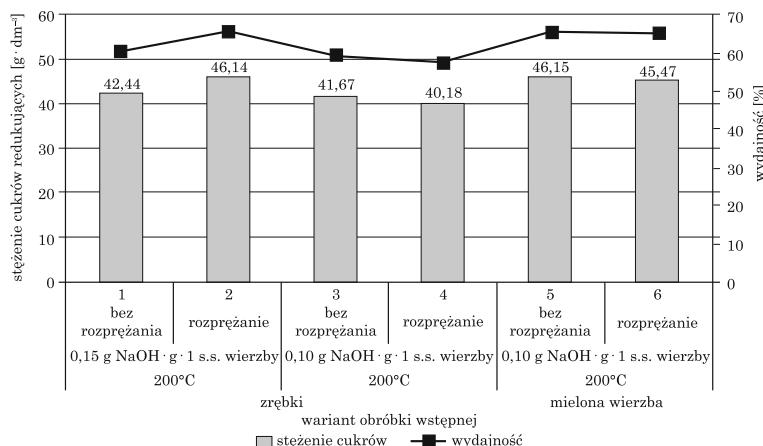
Tabela 3.

Udział głównych frakcji lignocelulozy w biomasie wierzby wiciowej po obróbce ciśnieniowo alkalicznej w zależności od zastosowanych parametrów procesu działania (% s.s.)

	Wariant obróbki/forma substratu	Celuloza	Hemiceluloza	Lignina
1	Zrębki 0,15 g NaOH · g ⁻¹ s.s. $200^{\circ}\text{C}/\text{bez rozprężania}$	41,34	nz	14,84
2	Zrębki 0,15 g NaOH · g ⁻¹ s.s. $200^{\circ}\text{C}/\text{rozprężanie}$	42,75	2,96	15,92
3	Zrębki 0,10 g NaOH · g ⁻¹ s.s. $200^{\circ}\text{C}/\text{bez rozprężania}$	42,32	nz	16,06
4	Zrębki 0,10 g NaOH · g ⁻¹ s.s. $200^{\circ}\text{C}/\text{rozprężanie}$	46,23	4,46	15,08
5	Mielona wierzba 0,10 g NaOH · g ⁻¹ s.s. $200^{\circ}\text{C}/\text{bez rozprężania}$	32,15	nz	11,65
6	Mielona wierzba 0,10 g NaOH · g ⁻¹ s.s. $200^{\circ}\text{C}/\text{rozprężanie}$	36,72	nz	13,38

nz – nie zidentyfikowano

W zależności od wariantu zastosowanych parametrów odnotowano stratę celulozy w zakresie 4,2–8,6% oraz nieomal całkowitą eliminację hemiceluloz, której obecności nie stwierdzono w próbach nie poddanych rozprężaniu. Zmiany udziału poszczególnych frakcji prawdopodobnie spowodowane były degradacją polimerów do cząsteczek o mniejszej masie, nie identyfikowanych jako frakcje NDF, ADF bądź ADL. Największe zmiany zawartości poszczególnych frakcji nastąpiły w próbkach wierzby potraktowanej obróbką ciśnieniowo-alkaliczną, w których stosowano materiał w formie zmielonej (częstki o wielkości 1 mm). Dowodzi to istotnej roli poziomu rozdrobnienia materiału na zmiany w obrębie kompleksu, wynikające z rozwinięcia powierzchni materiału, co skutkuje efektywniejszym działaniem czynników ciśnieniowo-alkalicznych i powoduje niewątpliwie większy stopień depolimeryzacji polisacharydów i ligniny. Hydroliza enzymatyczna tak przygotowanego materiału doprowadziła do uwolnienia 40,18–46,14 g cukrów/dm³ hydrolizatu (57–66% wydajności, rys. 5), co stanowiło wynik mniej korzystny niż uzyskany z udziałem substratu traktowanego obróbką alkaliczną w temperaturze 121°C – bez rozprężania, natomiast w dłuższym czasie (3 h) (Świątek i in. 2012). Tę metodę – uznawaną za najkorzystniejszą – stosowano w dalszych badaniach własnych.



Rys. 5. Efekty 72-godzinnej hydrolizy enzymatycznej wierzby wiciowej poddanej wstępemu traktowaniu obróbką ciśnieniowo-alkaliczną w różnych wariantach

Odrzucenie frakcji płynnej po obróbce alkaliami i przepłukanie wodą frakcji stałej może być stosowane jako metoda detoksykacji – usuwania inhibitów procesu hydrolizy oraz fermentacji – pochodnych cukrów 5- i 6-węglowych oraz pochodzących z rozkładu ligniny. Występujące we wstępnie traktowanych surowcach lignocelulozowych związki hamujące to głównie: kwas mrówkowy, lewulinowy, 5-hydroksymetylfurfural, furfural, 4-hydroksybenzaldehyd,

wanilina. Zgodnie z wynikami przedstawionymi przez Jing i in. (2009), wszystkie wymienione substancje identyfikowane w materiale po obróbce wstępnej mogą być przyczyną ograniczenia aktywności enzymatycznej preparatów stosowanych w etapie hydrolizy. Wykorzystywana w badaniach obróbka alkaliczna materiału lignocelulozowego, zgodnie z przewidywaniami, przyczyniła się do powstania niewielkich ilości substancji o charakterze inhibitorym: stwierdzono obecność jedynie kwasów mrówkowego i lewulinowego w ilościach 1,13 i 6,44 mg/dm³ (tab. 4).

Tabela 4
Obecność związków inhibujących w hydrolizatach wierzby wiciowej (mg/dm³)

Oznaczany związek	Stężenie inhibitorów w hydrolizatach wierzby po obróbce alkalicznej	
	wierzba nie płukana po obróbce	wierzba poddana detoksykacji
Kwas mrówkowy	1,138	0,198
Kwas lewulinowy	6,437	1,017
5-hydroksymetylofurfural	nw	nw
Furfural	nw	nw
4-hydroksybenzaldehyd	0,003	poniżej poziomu detekcji
Wanilina	0,002	poniżej poziomu detekcji

nw – nie wykryto

Nie wykryto hydroksymetylofurfuralu i furfuralu – oba wymienione ziązki generowane są z reguły w wyniku traktowania substratów lignocelulozowych obróbką kwasową. Uzyskane rezultaty pozostają w zgodności z wynikami prezentowanymi przez Koo i in. (2011), którzy porównywali wpływ wstępnej degradacji tulipanowca amerykańskiego (*Liriodendron tulipifera*). Wspomniani autorzy stwierdzili obecność 16–56 mg 5-HMF oraz 1,7–35 mg furfuralu/dm³ w roztworach uzyskanych po zastosowaniu katalizatora kwasowego oraz odpowiednio 0,0 i 0,2–0,3 mg/dm³ w półprodukcie otrzymanym w wyniku zastosowania katalizatora alkalicznego.

Oddzielenie frakcji płynnej zawierającej ziązki hamujące oraz przepłukanie wodą pozostałą frakcję stałej pozwoliło na ok. 6-krotne zmniejszenie stężenia kwasów mrówkowego i lewulinowego w hydrolizatach wierzby. Zabieg przepłukiwania materiału po obróbce wstępnej i separacja frakcji były

również powodem strat składników wierzby: ogólna strata masy wyniosła 24,7%, w tym hemicelulozę usunięto w największym stopniu (25,9%). Delignifikacja w tych warunkach osiągnęła wartość 19,6% a strata celulozy 18% (tab. 5).

Tabela 5
Straty składników wierzby wiciowej wynikające z zabiegu detoksykacji (%)

Sucha masa	Celuloza	Hemiceluloza	Lignina
24,7	18,0	25,9	19,6

Straty masy na etapie obróbki wstępnej generowane są niezależnie od sposobu jej prowadzenia. Traktowanie alkaliami powoduje mniejsze ubytki masy i zachowanie we frakcji stałej ponad 60% węglowodanów. Jak podają Koo i in. (2011), zastosowanie katalizatora kwasowego prowadzi do uwolnienia do frakcji płynnej 30–39% składników suchej masy lignocelulozy i jest silnie uzależnione od temperatury. Straty obserwowane w wyniku zastosowania alkaliów są mniejsze – nie przekraczają 27%, co znalazło potwierdzenie w badaniach własnych.

6.4. Podsumowanie

Eksperymentalnie potwierdzono niezbędnosć zastosowania obróbki wstępnej stosowanych substratów, głównie wierzby wiciowej, poprzedzającej etap hydrolyzy enzymatycznej polisacharydów. Porównując efekty trzech stosowanych procedur wstępnego traktowania, tj. biologicznej, kwasowej i alkalicznej, wykazano, że najkorzystniejsze przygotowanie substratu do hydrolyzy enzymatycznej polisacharydów zapewnia zastosowanie obróbki wierzby w środowisku alkalicznym w 121°C/60 min. Sekwencyjnie przeprowadzona hydroliza z udziałem wybranej kompozycji enzymów skutkowała uwolnieniem ok. 48 g cukrów/dm³ z wydajnością ok. 70% mierzoną względem polisacharydów dostępnych w materiale natywnym.

Literatura

- Billard H., Faraj A., Ferreira N.L., Menir S., Heiss-Blanquet S. 2012. *Optimization of a synthetic mixture composed of major Trichoderma reesei enzymes for the hydrolysis of steam-exploded wheat straw*. Biotechnol. Biofuels, 5: 9.
- Cai B.Y., Ge J.P., Ling H.Z., Cheng K.K., Ping W.X. 2012. *Statistical optimization of dilute sulfuric acid pretreatment of corncob for xylose recovery and ethanol production*. Biomass and Bioenergy, 36: 250–257.
- Cara C., Ruiz E., Ballesteros I., Negro M.B., Castro E. 2006. *Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification*. Proc. Biochem., 41: 423–429.

- Chen W.-H., Tu Y.-J., Sheen H.-K. 2011. *Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating.* Appl. Energy, 88: 2726–2734.
- El-Zawawy W.K., Ibrahim M.M., Abdel-Fattah Y.R., Soliman N.A., Mahmoud M.M. 2011. *Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production.* Carbohydrate Polymers, 84: 865–871.
- Górska E.B., Kopczyńska J., Russel S. 2006. *Wytwarzanie enzymów celulolitycznych i lignolitycznych w hodowli grzyba Trametes versicolor z dodatkiem słomy zbożowej o różnym stopniu rozdrobnienia.* Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, 546: 71–77.
- Gupta R., Mehta G., Khasa J. P., Kuhad R.Ch. 2011. *Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of cellulosics.* Biodegradation, 22: 797–804.
- Gusakov A. V. 2011. *Alternatives to Trichoderma reesei in biofuel production.* Trends in Biotechnology, 29 (9): 419–425.
- Gütsch J.S., Sixta H. 2011. *Purification of Eucalyptus globulus water prehydrolyzates using the HiTAC process (high-temperature adsorption on activated charcoal).* Holzforschung, 65: 511–518.
- Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., Lindén G., Zacchi G. 2006. *Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today.* Trends in Biotechnology, 24 (12): 549–556.
- Han Y., Chen H. 2010. *Synergism between hydrophobic proteins of corn stover and cellulose in lignocellulose hydrolysis.* Biochemical Engineering Journal, 48: 218–224.
- Hwang S.S., Lee S.J., Kim H.K. 2008. *Biodegradation and saccharification of wood chips of Pinus strobus and Liriodendron tulipifera by white rot fungi.* J. Microbiol Biotechnol, 18: 1819–1825.
- Jung Y.H., Kim I.J., Kim H.K., Kim K.H. 2013. *Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation.* Bioresource Technology, 132: 109–114.
- Karki B., Maurer D., Box S., Kim T.H., Jung S. 2012. *Ethanol production from soybean fiber, a co-product of aqueous oil extraction, using a soaking in aqueous ammonia pretreatment.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 89: 1345–1353.
- Kim I., Han J.-I. 2012. *Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology.* Biomass and Bioenergy, 46: 210–217.
- Kirk K.K., Croan S., Tien M. 1986. *Production of multiple ligninases by Phanerochaete chrysosporium: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain.* Enzyme Microb. Technol., 8: 27–32.
- Koo B.-W., Park N., Jeong H.-S., Choi J.-W., Yeo H., Choi I.-G. 2011. *Characterization of by-products from organosolv pretreatments of yellow poplar wood (Liriodendron tulipifera) in the presence of acid and alkali catalysts.* Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 17: 18–24.
- Kumar R., Mago G., Balan V., Wyman C.E. 2009. *Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies.* Bioresource Technology, 100: 3948–3962.
- McIntosh S., Vancov T. 2010. *Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment.* Bioresource Technology, 101: 6718–6727.
- Miller G.L. 1959. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.* Anal. Chem., 31 (3): 426–428.
- Pasze. *Oznaczanie zawartości włókna kwaśno-detergentowego (ADF) i ligniny kwaśno-detergentowej (ADL) PN_EN ISO 13906, 2009.*
- Qing Q., Wyman C.E. 2011. *Hydrolysis of different chain length xylooligomers by cellulase and hemicellulase.* Bioresource Technology, 102: 1359–1366.
- Saritha M., Arora A., Nain L. 2012. *Pretreatment of paddy straw with Trametes hirsuta for improved enzymatic saccharification.* Bioresource Technology, 104: 459–465.
- Sassner P., Mírtensson C.-G., Galbe M., Zacchi G. 2008. *Steam pretreatment of H_2SO_4 -impregnated Salix for the production of bioethanol.* Bioresource Technology, 99(1):137–145

- Sills D.L., Gossett J.M. 2011. *Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass*. Bioresource Technology, 102: 1389–1398.
- Silverstein R.A. 2004. *A comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol*. Master's Thesis (adv. R. Sharma), Biological and Agricultural Engineering, North Carolina State University.
- Singh D., Zeng J., Laskar D.D., Deobald L., Hiscox W., Chen S. 2011. *Investigation of wheat straw biodegradation by Phanerochaete chrysosporium*. Biomass and Bioenergy, 35: 1030–1040.
- Singhania R.R., Sakumaran R.K., Patel A.K., Larroche Ch., Pandey A. 2010. *Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases*. Enzyme and Microbial Technology, 46: 541–549.
- Świątek M., Lewandowska M., Świątek K., Bednarski W. 2012. *Wpływ parametrów obróbki ciśnieniowej na efektywność hydrolizy polisacharydów surowca lignocelulozowego*. Nauki Inżynierskie i Technologie, 3 (6): 117–126.
- Świątek K. 2012. *Doskonalenie warunków hydrolizy enzymatycznej polisacharydów zawartych w słomie rzepakowej*. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 570; 107–116.
- Talebnia F., Karakashev D., Angelidaki I. 2010. *Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation*. Bioresource Technology, 101: 4744–4753.
- Taniguchi M., Suzuki H., Watanabe D., Sakai K., Hoshino K., Tanaka T. 2005. *Evaluation of pretreatment with Pleurotus ostreatus for enzymatic hydrolysis of rice straw*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 100 (6): 637–643.
- 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*. J. Dairy Science, 74: 3583–3597.

7. Dobór oraz doskonalenie warunków fermentacji etanolowej hydrolizatów lignocelulozowych

Małgorzata Lewandowska, Karolina Świątek, Natalia Kordala

7.1. Wprowadzenie

Fermentacja jako biologiczna metoda konwersji cukrów do alkoholu etylowego jest najpowszechniej stosowaną metodą jego otrzymywania. Zachodzi w warunkach beztlenowych dzięki aktywności katalitycznej enzymów obecnych w drożdżach oraz niektórych bakteriach. W tradycyjnym gorzelnictwie najpowszechniej wykorzystywanym gatunkiem są *Saccharomyces cerevisiae*, zdolne do szybkiego odfermentowania zacierów (hydrolizatów) skrobiowych. W technologiiach wykorzystujących substraty lignocelulozowe fermentacji podlegają hydrolizaty zawierające w swoim składzie mieszaninę cukrów – pochodnych celulozy i hemicelulozy, takich jak: glukoza, ksyloza, arabinoza, mannoza czy galaktoza (Limayem i Ricke 2012). Typowy hydrolizat biomasy lignocelulozowej zawiera przeciętnie 60–70% glukozy i 20–40% ksylozy, a jego skład uzależniony jest zarówno od rodzaju substratu (materiał trawisty lub drzewny), jak i sposobu obróbki wstępnej (Mosier i in. 2005). Heksozy stanowią dominujące źródło cukrów w hydrolizatach, a ich fermentacja może zachodzić przy udziale wspomnianych wcześniej drożdży z gatunku *S. cerevisiae*, powszechnie wykorzystywanych w przemyśle gorzelniczym. Drożdże te nie posiadają jednak aparatu enzymatycznego umożliwiającego fermentację pentoz – drugiej pod względem ważności frakcji pochodnych hemiceluloz. Stąd fermentacja z ich wyjątkowym udziałem nie wykorzystuje w pełni potencjału surowca lignocelulozowego.

W ostatnich latach w związku z licznymi badaniami nad doskonaleniem fermentacji pochodnych lignocelulozy nastąpił wzrost poszukiwań drobno-ustrojów zdolnych do fermentowania pentoz oraz charakteryzujących się innymi korzystnymi cechami operacyjnymi (m.in. termo-, alkoholo- i inhibitoro-odpornością oraz wysoką produktywnością etanolu). Zainteresowanie badaczy kieruje się zarówno w stronę szczepów naturalnych, jak i pozyskiwanych metodami inżynierii genetycznej (Sarkar i in. 2012). Wśród gatunków posiadających naturalną zdolność fermentacji pentoz wymienia się

drożdże z rodzajów *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* (Zhao i in. 2008). Zawierają one zestaw enzymów: reduktazę ksylozy (XR) i dehydrogenazę ksylitolu (XDH) pozwalający na dwuetapową konwersję ksylozy do ksylulozy z ksylitolem jako produktem pośrednim szlaku przemian. Ksyluloza jest następnie fosforylowana przez ksylulokinazę (XK) do ksylulozo-5-fosforanu, który występuje w szlaku pentozofosforanowym i glikolizie (Chandel i in. 2011a; Matsushika, Sawayama 2011). Specyfika wspomnianego szlaku przemian wymaga jednak obecności pewnej ilości tlenu w środowisku, gdyż warunki *stricto* beztlenowe sprzyjają tworzeniu się ksylitolu. Licznie prowadzone badania dowiodły, że korzystnym rozwiązaniem jest zapewnienie warunków mikroaerofilnych, tj. takich, w których stężenie tlenu jest mniejsze niż w ziemskiej atmosferze (Bellido i in. 2013). Tego typu rozwiązanie ogranicza jednak możliwość zastosowania wymienionych drożdży w procesach skojarzonych, wymagających odfermentowania obu grup monocukrów z wykorzystaniem fermentacji dwuszczepowych. Proponuje się rozwiązania oparte na frakcjonowaniu cukrów, które są realizowane przy okazji innych, wcześniej stosowanych operacji technologicznych przetwarzania lignocelulozy. To zadanie spełnia m.in. wstępna obróbka substratu, w wyniku której tworzy się frakcja tzw. prehydrolizatu – zawierającego głównie cukry 5-węglowe.

W procesach fermentacji pochodnych lignocelulozy bardzo istotną kwestią jest dobór strategii jej prowadzenia. Powszechnie stosowany system SHF (sekwencyjna hydroliza i fermentacja) pozwala na zastosowanie optymalnych warunków inżynierii środowiska dla każdego z etapów (odpowiednio: ok. 50 i ok. 30°C). Strategia SSF (symultaniczna hydroliza i fermentacja) wymusza konieczność zastosowania kompromisowych parametrów procesu, co wiąże się najczęściej z obniżeniem jego temperatury, a tym samym z rezygnacją z optimum działania enzymów katalitycznych. Każdy ze sposobów prowadzenia fermentacji przynosi jednak specyficzne korzyści. W trakcie procesów skojarzonych nie obserwuje się zjawiska hamowania hydrolizy produktami reakcji dzięki natychmiastowemu ich wykorzystaniu przez drożdże (Olofsson i in. 2008). Sprzyja to pełniejszemu wykorzystaniu dostępnych polisacharydów surowca. Powstający półprodukt – odfermentowana zawieszona zawiera w sobie jednak nie więcej niż 3–4% etanolu, a to mało korzystny efekt w procesach przemysłowych w związku z koniecznością ponoszenia wysokich kosztów destylacji. System sekwencyjny pozwala na wprowadzenie pośredniej operacji zatężania hydrolizatu, co podwyższa stężenie cukrów dostępnych do fermentacji. Może się to jednak wiązać z niekorzystnym zjawiskiem koncentrowania substancji towarzyszących cukrom fermentującym (np. oligosacharydów), które zwiększaając ciśnienie osmotyczne środowiska, ograniczają aktywność fermentacyjną drożdży. Liczne doniesienia literaturowe wskazują na popieranie strategii SSF. Rozważane są różne rozwiązania

zmierzające do zwiększenia końcowej koncentracji alkoholu w prowadzonym procesie, np. dodatkowe wielokrotne zasilanie substratem (Liu i in. 2010; Kim i in. 2013) lub specjalne rozwiązania konstrukcyjne bioreaktorów (Zhang i in. 2010).

7.2. Materiał i metody

7.2.1. Surowce badawcze

Głównym surowcem wykorzystywanym w badaniach była wierzba wiciowa (*Salix viminalis*) pochodząca z upraw doświadczalnych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Materiał w postaci wysuszonej poddawano mieleniu w urządzeniu Retch SM 100, wstępnej obróbce alkalicznej oraz hydrolizie enzymatycznej w wybranych warunkach opisanych w rozdziale 6.

7.2.2. Szczepy drożdży

- Szczepy przemysłowych drożdży gorzelniczych pochodzące z Zakładu Technologii Gorzelnictwa i Odnawialnych Źródeł Energii w Bydgoszczy:
 - *Saccharomyces cerevisiae* B4 (optimum temperaturowe fermentacji: 30–32°C),
 - *Saccharomyces cerevisiae* o symbolach D2 i As4, termofilne (optimum temperaturowe fermentacji: 38–39°C).
- Szczep z kolekcji Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie: *Sacchromyces cerevisiae* 7 (NRRL 978) (optimum temperaturowe: 30–35°C).
- Szczepy drożdży predysponowane do fermentacji cukrów pięciowęglowych (z kolekcji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie):
 - *Pichia stipitis* CCY 39-50-1,
 - *Pichia stipitis* CBS 5773 Schoffers, Holandia,
 - *Candida tropicalis* (KKP 1236),
 - *Candida utilis* (KKP 1238),
 - *Pachysolen tannophilus* (KKP 546).

Szczepy drożdży *S. cerevisiae* prowadzono na stałym podłożu YPG o składzie: 2% glukozy, 2% peptonu, 1% ekstraktu drożdżowego, 2% agaru o kwasowości pH 5,2.

Szczepy drożdży *Pichia*, *Candida* i *Pachysolen* prowadzono na podłożu Sabouraud Agar (Merck)

7.2.3. Preparaty enzymatyczne

- Celulaza z *Trichoderma longibrachiatum* (SIGMA-ALDRICH) o aktywności $\geq 1000 \text{ U}^1/\text{g}$, stosowana w dawce 15 U/g s.s. substratu.
- Ksyilanaza z *Trichoderma longibrachiatum* (SIGMA-ALDRICH) o aktywności $\geq 1000 \text{ FXU}^2/\text{g}$, stosowana w dawce 15 FXU/g s.s. substratu.
- Celobiaza z *Aspergillus niger* – Novozyme 188 (Novozymes A/S) o aktywności $\geq 250 \text{ CBU}^3/\text{g}$, stosowana w dawce 30 CBU/g s.s. substratu.

7.2.4. Podłoża hodowlane

7.2.4.1. Podłoże do prowadzenia inoculum

Do prowadzenia hodowli drożdży stosowano płynne podłoże YPG o składzie i kwasowości wymienionych wcześniej (bez dodatku agaru).

7.2.4.2. Brzeczki modelowe

Do oceny aktywności fermentacyjnej drożdży predysponowanych do fermentacji pentoz zastosowano podłoża z udziałem 8% glukozy, 8% ksylozy, 4% ksylozy lub 2% ksylozy + 2% glukozy oraz niezbędnych źródeł azotu i fosforu.

W celu określenia odporności drożdży *S. cerevisiae* na inhibitory obecne w hydrolizatach substratu lignocelulozowego zastosowano podłoża z udziałem 8% glukozy, niezbędnych źródeł azotu i fosforu oraz z dodatkiem następujących związków: furfuralu (0,03) lub 5-hydroksymetylfurfuralu (0,03%) lub waniliny (0,02%) lub 4-hydroksybenzaldehydu (0,02%) lub kwasu mrówkowego (0,1%) lub kwasu lewulinowego (0,1%)

7.2.4.3. Hydrolizat enzymatyczny syrowca lignocelulozowego pozyskanego z wierzby wiciowej

Wierzbę wiciową poddano obróbce wstępnej w warunkach: 3 h, 121°C, 0,1 g NaOH/g s.s. substratu w formie 10% zawiesiny w medium reakcyjnym. Po upływie wymaganego czasu całość neutralizowano za pomocą 99% kwasu

¹ U – ilość enzymu uwalniająca 1 µmol glukozy z celulozy w czasie 1 h w warunkach: pH 5,0, 37°C, 2 h.

² FXU – ilość enzymu uwalniająca 1 µmol glukozy z celulozy w czasie 1 h w warunkach: pH 5,0, 37°C, 2 h.

³ CBU (ang. *cellobiase units*) – jednostka aktywności celobiaz: 1 CBU oznacza aktywność enzymu powodującą uwalnianie 2 µmoli glukozy w ciągu 1 min w warunkach: pH 4,8, 50°C.

octowego do pH 5,0 bądź poddawano detoksykacji metodą frakcjonowania i płukania wodą, każdorazowo odwirowując fazę stałą w warunkach: 10 min, 5°C, RCF 4248 g. Do zawiesiny wierzby dodawano następnie wymienione wyżej preparaty enzymatyczne i prowadzono hydrolizę w warunkach: 72 h, 50°C, wytrząsanie 250 obr./min (inkubator Innova 40, New Brunswick Scientific). Po zakończonej hydrolizie w hydrolizacie oznaczono zawartość cukrów redukujących metodą z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (DNS). Oznaczono również skład monosacharydów 5- i 6-węglowych metodą chromatografii gazowej w urządzeniu Thermo Scientific Focus GC z detektorem płomieniowojonizacyjnym oraz kolumną kapilarną CP-SIL 5CB o długości 15 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm i grubości filmu 0,25 µl. Analizy jakościowej dokonano poprzez porównanie czasu retencji oznaczanego cukru z czasem retencji standardu zewnętrznego (glukoza, galaktoza, mannoza, ksyloza, arabinoza). Analizę ilościową przeprowadzono na podstawie porównania powierzchni piku oznaczanego cukru z powierzchnią piku odpowiadającego znanej ilości standardu wewnętrznego (ksylitol), wykorzystując program Chrom-Card.

7.2.4.4. Zagęszczony hydrolizat biomasy lignocelulozowej pozyskanej z wierzby

Hydrolizat wierzby uzyskany z surowca poddanego obróbce i detoksykacji poddano frakcjonowaniu metodą wirowania, uzyskując roztwór zhydrolizowanych polisacharydów. W płynnym hydrolizacie sprawdzono zawartość cukrów redukujących metodą z DNS i poddano go zatężaniu w wyparce próżniowej (Buchi R-210).

7.2.5. Fermentacja

Podłożą fermentacyjne (brzeczki modelowe lub hydrolizaty wierzby) uzupełniono dodatkiem źródeł azotu i fosforu w postaci peptunu i ekstraktu drożdżowego w ilościach odpowiednio 20 g/dm³ podłożu i 10 g/dm³ podłożu lub (NH₄)₂SO₄ – 11,00 g/dm³ oraz KH₂PO₄ – 2,02 g/dm³ podłożu i spasteryzowano w warunkach 90°C/20 min, a następnie zaszczepiono dodatkiem 5% (v/v) inokulum odpowiedniego szczepu drożdży. Fermentację prowadzono w warunkach beztlenowych lub ograniczonego natleniania (dla wybranych drożdży) przez 72 h w temperaturze właściwej dla każdego z zastosowanych szczepów. W czasie trwania procesu (co 24 h) oraz po jego zakończeniu oznaczano ilość wydzielonego CO₂ metodą wagową, natomiast po zakończeniu fermentacji oznaczono zawartość alkoholu, kwasowość, ekstrakt pozorny i właściwy.

7.2.6. Symultaniczna hydroliza i fermentacja (SSF)

Wierzbę wiciową poddano wstępnej obróbce i detoksykacji w warunkach opisanych powyżej. Do zawiesiny substratu dodawano następnie preparaty enzymatyczne i prowadzono hydrolizę w warunkach: 24 h, 50°C, 250 obr./min (inkubator Innova 40, New Brunswick Scientific). Po tym czasie hydrolizat uzupełniono o dodatek źródeł azotu i fosforu, a następnie obniżono temperaturę do 38°C i zaszczepiono inoculum (5% v/v) odpowiedniego szczepu drożdży *S. cerevisiae*. Fermentację i hydrolizę kontynuowano przez 96 h (4 dni) w warunkach beztlenowych w temperaturze 38°C. W czasie trwania procesu (co 24 h) oraz po jego zakończeniu oznaczano ilość wydzielonego CO₂ metodą wagową, natomiast po zakończeniu fermentacji oznaczono zawartość alkoholu, kwasowość, ekstrakt pozorny oraz właściwy. Na podstawie zawartości alkoholu w odfermentowanych brzeczkach/hydrolizatach wyznaczono wyroźniki oceny procesu fermentacyjnego:

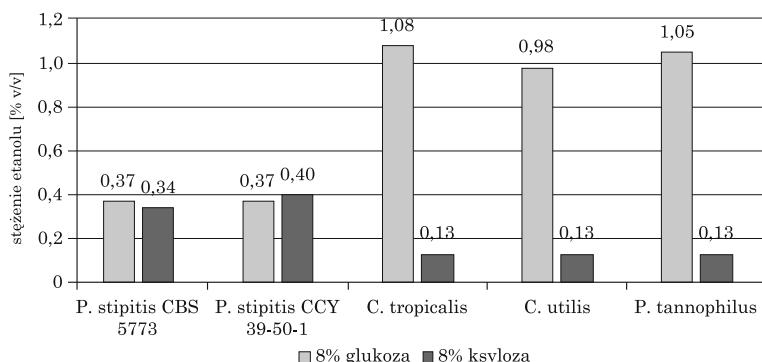
- wydajność procesu (dm³ A₁₀₀/100 kg monosacharydu),
- sprawność fermentacji (wydajność procesu/teoretyczna wydajność procesu w %),
- właściwą szybkość procesu (cm³ A₁₀₀/kg monosacharydu × h),
- produktywność procesu fermentacji (cm³ A₁₀₀/dm³ podłoża × h).

7.3. Omówienie wyników i dyskusja

W pierwszym etapie doświadczeń przeprowadzono ocenę przydatności wybranych szczepów drożdży do fermentacji pochodnych lignocelulozy z wykorzystaniem brzeczek modelowych. Ocenie poddano drożdże predysponowane do fermentacji cukrów 5-węglowych wymienione w punkcie 7.2.2. W związku z tym, że szczepy wykazują zdolność do wzrostu i rozwoju w środowisku względnie beztlenowym lub mikroaerofilnym (Thein 2007; Limayem i Ricke 2012), doświadczenie przeprowadzono przez 96 h w warunkach stacjonarnych bez dostępu powietrza, wykorzystując brzeczki z udziałem 8% ksylozy lub 8% glukozy. W żadnym z doświadczeń nie odnotowano korzystnego poziomu odfermentowania ksylozy (rys. 1).

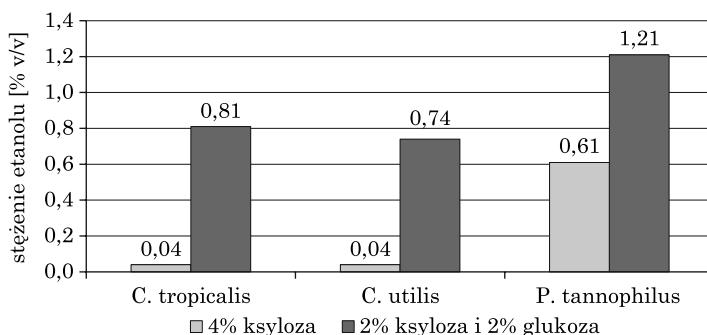
Wszystkie przebadane szczepy drożdży charakteryzowały się jedynie niewielkimi zdolnościami do fermentacji glukozy, co w przeliczeniu na sprawność procesu nie przekraczało 10%. Wybrane szczepy przetestowano również w warunkach ograniczonego natleniania z wykorzystaniem brzeczek zawierających ksylozę (4%) oraz dwa rodzaje cukrów (2% glukozy + 2% ksylozy). Mieszane źródło węgla zastosowano w celu sprawdzenia wpływu obecności glukozy na wykorzystywanie ksylozy przez analizowane drożdże. Zależność ta najczęściej wiąże się ze zjawiskiem represji katabolicznej, stanowiącym

jedno z ważniejszych systemów regulacji metabolicznej drobnoustrojów. Skutkuje to preferencyjnym wykorzystaniem najlepszego (energooszczędnego) źródła węgla w środowisku. Jednakże występowanie tego mechanizmu u szczepów przemysłowych jest niepożądane ze względu na ograniczenie wydajności syntezy bioproduktów, zwłaszcza gdy substratem jest mieszanina cukrów – pochodnych biomasy lignocelulozowej. Represja kataboliczna może prowadzić w tym przypadku do wydłużenia czasu fermentacji oraz obniżenia wydajności, co utrudnia wdrożenie technologii w warunkach przemysłowych (Park i in. 2012).



Rys. 1. Porównanie odfermentowania brzeczek z glukozą lub ksylozą z udziałem drożdży predysponowanych do fermentacji cukrów 5-węglowych

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że szczepem potencjalnie przydatnym do fermentacji pentoz jest *P. tannophilus*, gdyż produkował alkohol w warunkach ograniczonego natleniania w brzeczkach zawierających zarówno ksylozę, jak i mieszaninę cukrów. W odfermentowanej brzeczce z ksylozą (4%) odnotowano 0,61% (v/v) etanolu, natomiast w podłożu z udziałem mieszaniny cukrów uzyskano stężenie 1,21% alkoholu (rys. 2).



Rys. 2. Zawartość etanolu w brzeczkach modelowych po 72 h fermentacji w warunkach tlenowych w zależności od szczepu mikroorganizmu oraz rodzaju cukru w pożywce

Według Zhao i in. (2008) w środowisku reakcyjnym, w którym znajduje się ksyloza i glukoza, *P. tannophilus* wykorzystuje najpierw glukozę jako źródło węgla, a dopiero po całkowitym jej zużyciu prowadzi konwersję ksylozy do etanolu. Wyższe stężenie etanolu w tego typu podłożu świadczy o ograniczonej represji katabolicznej – po takim samym czasie fermentacji uzyskano 2-krotnie wyższe stężenie alkoholu. Obecność glukozy nie upośledziła więc zużycia ksylozy, a okres adaptacyjny *P. tannophilus* wykorzystania ksylozy do wytwarzania etanolu po wyczerpaniu glukozy był stosunkowo krótki. Należy jednak pamiętać, że w omawianym eksperymencie suma dostępnych cukrów była niewielka, co mogło sprzyjać szybkości zachodzących reakcji.

W kolejnym etapie przeprowadzono doświadczenia fermentacji brzczek modelowych (8% glukozy) z dodatkiem różnych substancji o właściwościach potencjalnie inhibujących fermentację. Na rysunku 2 zobrazowano wyniki eksperymentu mierzone sprawnością procesu fermentacji brzczek z dodatkiem różnych inhibitorów i z zastosowaniem wszystkich analizowanych szczepów drożdży z gatunku *S. cerevisiae*. W omawianych doświadczeniach wykazano, że niższą odpornością na działanie czynników hamujących charakteryzowały się termofilne szczepy *S. cerevisiae* As4 i D2. Drożdże mezofilne okazały się lepiej przystosowane do fermentacji heksoz w środowisku zawierającym inhibitory – stwierdzono ich wrażliwość jedynie na 4-hydroksybenzaldehyd, który spowodował obniżenie sprawności fermentacji odpowiednio o 14% i 11,5%. Pozostałe inhibitory w nieznacznym stopniu wpłynęły na efektywność procesu. W fermentacjach z udziałem *S. cerevisiae* As4 i D2 najskuteczniejszym inhibitorem okazał się 4-hydroksybenzaldehyd – sprawność procesu spadła do poziomu zaledwie 7–7,6%. Odnotowano również istotny wpływ obecności waniliny i kwasu mrówkowego – sprawność fermentacji prowadzonej w brzczkach z ich udziałem nie przekroczyła 73%. Brak wrażliwości badanych drożdży na furfural i HMF jest zgodny z wynikami uzyskanymi przez Huang i in. (2011), którzy w swoich badaniach z udziałem piekar-skich drożdży *S.cerevisiae* nie stwierdzili wpływu wymienionych związków na efektywność prowadzonej przez nie fermentacji, wskazując jednocześnie na negatywne oddziaływanie waniliny. Z kolei Chandel i in. (2011b) wymieniają pochodne ligniny jako związki najskuteczniej inhibujące aktywność fermentacyjną drożdży – w tym wypadku stwierdzony negatywny wpływ 4-hydroksybenzaldehydu oraz waniliny w badaniach własnych potwierdza sugestie cytowanych autorów.

W kolejnych doświadczeniach fermentacji poddano hydrolizaty wierzby wiciowej uzyskane w wyniku hydrolizy enzymatycznej substratu wstępnie potraktowanego obróbką alkaliczną. Zawiesina wierzby przed hydrolizą była neutralizowana z zastosowaniem kwasu octowego do poziomu kwasowości optymalnego dla zastosowanych preparatów enzymatycznych (pH 5,0) bądź też poddawana zabiegowi przepłukiwania wodą (detoksykacji).

Hydrolizaty uzyskane po 72 h reakcji traktowano jako bazę cukrów do sporządzenia brzeczek fermentacyjnych. W pierwszej kolejności oceniono w nich skład monosacharydów 5- i 6-węglowych metodą chromatografii gazowej w kontekście możliwości ich wykorzystania w procesie fermentacyjnym (tab. 1).

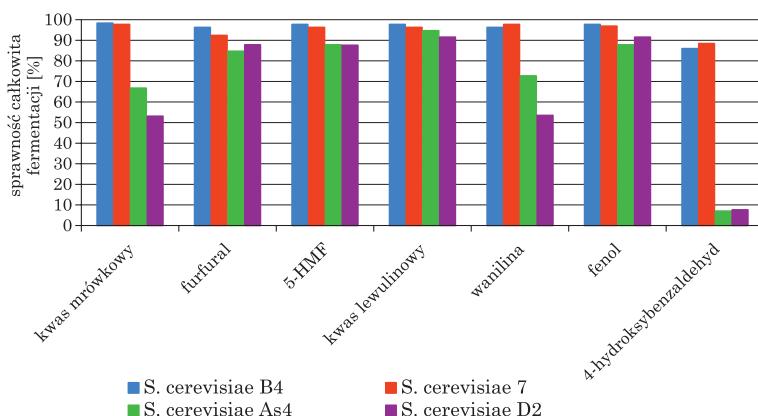
Tabela 1
Skład cukrów prostych w hydrolizacie wierzby

Rodzaj monosacharydu	Stężenie (g/dm ³)
Glukoza (C6)	22,15
Galaktoza (C6)	0,28
Mannoza (C6)	0,69
Ksyloza (C5)	5,14
Arabinoza (C5)	0,33
C5 + C6	28,59
C6 ogółem	23,12
C5 ogółem	5,47
C6 / C5	4,20

Zawartość cukrów 6-węglowych (glukozy, galaktozy i mannozy) była ponad 4-krotnie wyższa od koncentracji cukrów 5-węglowych (ksyloza i arabinoza). Spośród cukrów 6-węglowych odnotowano największe stężenie glukozy – 22,15 g/dm³, co wynika z dostępnej ilości celulozy w surowcu natywnym – 50,72% s.s. Istotnie większa zawartość cukrów 6-węglowych w stosunku do cukrów 5-węglowych stanowi korzystny aspekt w procesie fermentacji alkoholowej hydrolizatów – drożdże *Saccharomyces cerevisiae* nie posiadają bowiem zdolności do asymilacji cukrów 5-węglowych, takich jak ksyloza czy arabinoza. Rodzaj zastosowanego surowca wyznacza więc strategię prowadzenia fermentacji – do podobnych konkluzji doszli Schenck i in. (2013), precyzując ilość dostępnych cukrów fermentujących w porównywanych dwóch gatunkach drewna osiki (suma celulozy i glukomannanu = 62,4 wobec 7,8 ksylanu) oraz sosny (51,9 wobec 23,1). W tych przykładach proporcje pochodnych cukrów C6/C5 wypadają więc rażąco różnie (osika 8, sosna 2,2) i tym samym sugerują konieczność zagospodarowania cukrów 5-węglowych w procesie fermentacyjnym pochodnych drewna sosnowego, gdyż w tym wypadku stanowią prawie 1/3 dostępnych sacharydów, podobnie jak ma to miejsce w trakcie przetwarzania materiałów trawiastych i słomiastych (Kim i Han 2012; McIntosh i Vancov 2011).

Z uwagi na istotną przewagę monosacharydów 6-węglowych (ponad 80%) w hydrolizatach wierzby, wykorzystywanej jako główny substrat w badaniach własnych, skupiono się więc na dopracowaniu sposobu prowadzenia fermentacji z udziałem drożdży *S. cerevisiae*. W celu przygotowania prawidłowo skomponowanych brzeczek fermentacyjnych hydrolizaty wierzby uzupełniono niezbędnymi źródłami azotu i fosforu w postaci związków organicznych (peptonu i ekstraktu drożdżowego) lub mineralnych. Substraty linoceululozowe wykorzystywane w procesach fermentacji są ubogie w składniki odżywcze niezbędne do prawidłowego funkcjonowania mikroorganizmów, wymagają dostarczenia składników pokarmowych (witaminy, minerały, azot, fosfor itp.). Ich źródłem mogą być produkty lizy komórek bakteryjnych lub substancje dostarczane do mieszaniny (ekstrakty drożdży, pepton, trypton, mocznik lub związki mineralne). Składniki wzrostowe dodawane są najczęściej do medium (zacieru, brzeczków) przygotowywanego do fermentacji, co pozwala na wzrost i namnożenie mikroorganizmów w początkowym etapie fermentacji.

Fermentacje brzeczek sporządzonych na bazie hydrolizatów wierzby prowadzono z wykorzystaniem dwóch szczepów drożdży *S. cerevisiae* B4 lub *S. cerevisiae* 7. Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń fermentacyjnych oraz zestawienie obliczonych wyrozników fermentacji przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Porównanie sprawności całkowitej fermentacji brzeczek modelowych (8% glukozy) w zależności od zastosowanego szczepu i rodzaju inhibitora w podłożu

Równolegle przeprowadzono doświadczenia z udziałem termofilnych szczepów drożdży *S. cerevisiae* As4 i D2, które wykorzystano w alternatywnej strategii fermentacji połączonej z hydrolizą (SSF). Tego typu sposób prowadzenia biokonwersji polisacharydów lignocelulozy do etanolu wymaga doboru mikroorganizmów o właściwościach temperaturowych zbliżonych do temperatury hydrolizy enzymatycznej – zastosowanie w tym wypadku

drożdży o optimum temperaturowym fermentacji 38–39°C wymusiło obniżenie temperatury hydrolizy o 12°C, a nie o 20°C, jak miałoby to miejsce w przypadku wykorzystania szczepów *S. cerevisiae* B4 lub 7. Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń jednociesnej hydrolizy i fermentacji oraz zestawienie obliczonych wyróżników fermentacji przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2
Charakterystyka jednociesnej hydrolizy i fermentacji etanolowej polisacharydów wierzby wiciowej z udziałem drożdży *S. cerevisiae*: As4 lub D2 w zależności od sposobu przygotowania substratu (z neutralizacją po obróbce lub bez)

Wyróżniki	<i>S. cerevisiae</i> D2		<i>S. cerevisiae</i> As4	
	substrat po neutralizacji	substrat po detoksykacji	substrat po neutralizacji	substrat po detoksykacji
	30,07±0,96	29,22±2,03	31,24±0,90	27,97±0,60
Wyjściowa zawartość cukrów redukujących (g/dm ³)	30,07±0,96	29,22±2,03	31,24±0,90	27,97±0,60
Masa wydzielonego CO ₂ (g/100g)	24h	0,16±0,06	0,61±0,09	0,16±0,08
	48h	0,32±0,11	0,72±0,07	0,33±0,12
	72h	0,45±0,12	0,81±0,08	0,46±0,11
	96h	0,52±0,11	0,86±0,08	0,54±0,11
Energia fermentacji (%)	24h	29,20±5,32	70,57±4,33	28,40±9,47
	48h	60,66±8,31	84,19±0,62	60,32±10,81
	72h	85,29±5,01	94,13±0,54	85,39±3,46
pH	5,05±0,06	5,07±0,02	5,09±0,05	5,12±0,01
Ekstrakt pozorný (°Blg)	8,3±0,1	6,1±0,0	8,6±0,1	5,7±0,6
Ekstrakt właściwy (°Blg)	8,6±0,3	6,8±0,1	9,0±0,5	6,6±0,5
Zawartość alkoholu (% v/v)	0,79±0,22	1,39±0,05	0,76±0,20	1,22±0,19
Produktywność (cm ³ A100/dm ³ podłoża × h)	0,08±0,02	0,15±0,01	0,08±0,02	0,13±0,02

Otrzymane wyniki wykazały istotną rolę zabiegu detoksykacji w biokonwersji lignoceluloz. Fermentacja hydrolizatów wierzby wiciowej nie poddanych uprzedniej detoksykacji pozwoliła na uzyskanie stężenia etanolu w podłożu na poziomie 0,8 i 0,9% (v/v), odpowiednio w fermentacji sekwencyjnej i symultanicznej. Sprawność całkowita procesu, uwzględniająca ilość dostępnych

w podłożu cukrów fermentujących, nie przekroczyła 45%. Z kolei w eksperymencie, w którym zastosowano zabieg detoksykacji, uzyskano 1,39% (v/v) etanolu w brzeczce, niezależnie od zastosowanej strategii fermentacji. Wyznaczona sprawność całkowita procesu przekroczyła 60%, co oznacza zwiększenie wydajności o ponad 30% w porównaniu do rezultatów doświadczenia bez płukania materiału po obróbce wstępnej.

Podobne tendencje odnotowali Kwon i in. (2011), wskazując na istotną rolę zabiegu przemywania substratu po obróbce wstępnej, cytując za Lu i in. (2010), którzy uzyskali korzystniejszą o prawie 30% sprawność fermentacji hydrolizatów łuski kukurydzianej z udziałem *S. cerevisiae*. Z kolei Öhgren i in. (2007) dzięki zastosowaniu tego samego zabiegu wykazali poprawę efektywności fermentacji wspomnianego substratu lignocelulozowego z udziałem *S. cerevisiae* Tembec 1, wyrażoną parametrem produktywności procesu z 0,73 do 0,81 g /dm³ × h.

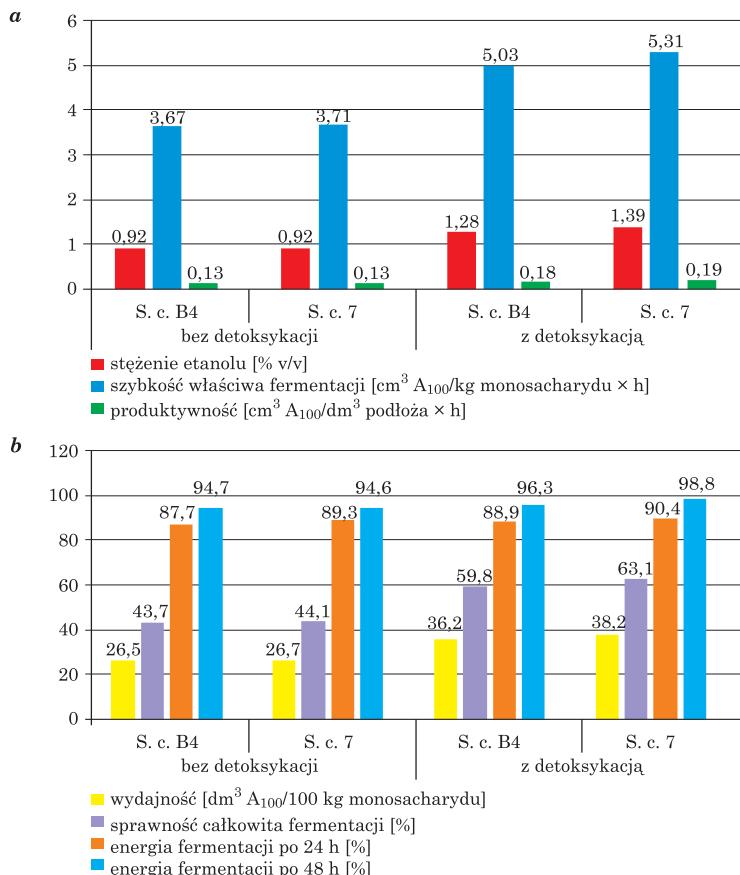
Ze względu na jednakowe rezultaty poziomu odfermentowania, w dalszych doświadczeniach zastosowano system dwuetapowy, zakładając, że fermentacja zostanie poprzedzona zatężaniem hydrolizatu w celu zwiększenia w medium fermentacyjnym dostępnych cukrów fermentujących.

W kolejnym eksperymencie sprawdzono wpływ innych (tańszych) źródeł azotu i fosforu w podłożu fermentacyjnym – zastosowano sole mineralne: diwodorofosforan potasu oraz siarczan amonu, których dawki wyznaczono zależnie od ilości dostępnego źródła węgla (cukru) w hydrolizacie. Fermentację podłoż sporządzonych na bazie hydrolizatów z dodatkiem ww. soli przeprowadzono z udziałem drożdży *S. cerevisiae* B4 lub 7 w temperaturze 30°C przez 72 h. W wyniku doświadczeń stwierdzono, że zastosowanie mineralnych źródeł azotu i fosforu pozwoliło na uzyskanie minimalnie wyższej sprawności fermentacji (61,2–65,6%) w porównaniu do efektów eksperymentu, w którym źródło substancji odżywczych stanowiły ekstrakt drożdżowy i pepton, zwłaszcza z udziałem szczepu drożdży przemysłowych *S. cerevisiae* B4 (rys. 4).

Niewielki wpływ rodzaju źródeł związków odżywczych zaobserwowali w swoich badaniach Chu i in. (2012), którzy uzyskali zbliżone rezultaty odfermentowania mediów wspomaganych ekstraktem drożdżowym, (NH₄)₂SO₄ lub DDGS (suszony wywar gorzelniczy).

Kolejne doświadczenie przeprowadzone w ramach badań dotyczyło efektywności fermentacji hydrolizatów poddanych wstępemu zatężaniu. W tym celu wierzbę wiciową poddano alkalicznej obróbce wstępnej i hydrolizie w warunkach opisanych wcześniej. Po 72 h hydrolizy zawiesinę poddano frakcjonowaniu metodą wirowania, odrzucając osad (frakcję stałą), a supernatant po oznaczeniu zawartości cukrów redukujących metodą z DNS zatężono pod obniżonym ciśnieniem w wyparce BUCHI R-210 w temperaturze 40°C. Proces zagęszczania prowadzono do uzyskania stężenia cukrów redukujących na poziomie minimum 80 g/dm³ hydrolizatu (ok. 2-krotnie),

120 g/dm³ (ok. 3-krotnie) oraz 160 g/dm³ (ok. 4-krotnie). W wyniku takiego postępowania uzyskano koncentraty hydrolizatu o składzie przedstawionym w tabeli 3.



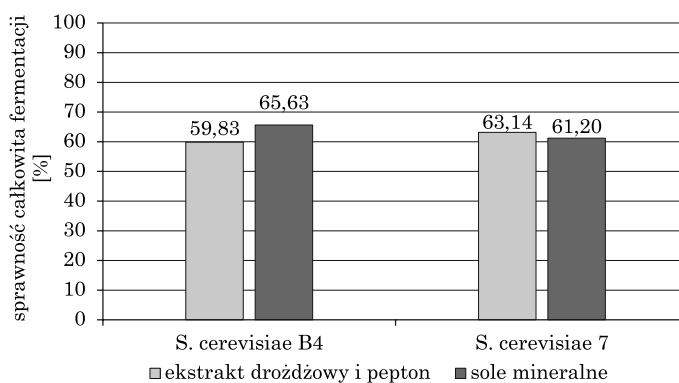
Rys. 4. Wpływ procesu detoksykacji substratu po obróbce wstępnej na poziom odfermentowania hydrolizatów i wyróżniki oceny procesu:
 a – zawartość alkoholu, szybkość fermentacji, produktywność fermentacji;
 b – wydajność procesu, sprawność całkowita, energia ferme

Koncentrację pochodnych lignocelulozy stosowali w swoich badaniach Lan in. (2013) w odniesieniu do tzw. prehydrolizatu – frakcji płynnej powstającej w trakcie obróbki wstępnej drewna sosny wydmowej (*Pinus contorta*) z udziałem kwasu siarkowego i siarczanu sodu, zawierającej istotną ilość cukrów uwalnianych w tym etapie. Ok. 6-krotna koncentracja frakcji określanej jako *spent liquor* pozwoliła na efektywne wykorzystanie w dalszym procesie fermentacji składnika medium zawierającego ok. 36,2 g/dm³ glukozы, 5,6 g/dm³ arabinozy, 13 g/dm³ galaktozy, 17,9 g/dm³ ksylozy oraz 47 g/dm³ mannozy. W badaniach własnych skoncentrowane hydrolizaty zaszczepiono

dodatkiem inoculum drożdży *S. cerevisiae* 7 w ilości 5% (v/v) i przeprowadzono 72 h fermentację w temperaturze 30°C. Po jej zakończeniu oceniono poziom cukrów resztkowych oraz stężenie uzyskanego alkoholu. Na tej podstawie wyznaczono sprawność poszczególnych fermentacji. Uzyskane wyniki zobrazowano na rysunku 5.

Tabela 3
Skład zagęszczonych hydrolizatów wierzby wiciowej w zależności od stopnia koncentracji

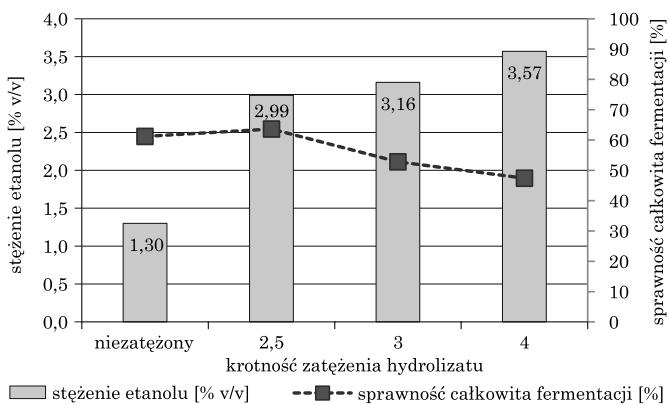
Substrat do fermentacji (źródło cukrów)	Zawartość cukrów redukujących (g/dm ³)	Ekstrakt właściwy (°Blg)	Stopień koncentracji	
			planowany	uzyskany
Hydrolizat	41,36	5,5	–	–
Hydrolizat po zagęszczeniu I	91,51	14,7	2	2,21
Hydrolizat po zagęszczeniu II	121,78	15,9	3	2,94
Hydrolizat po zagęszczeniu III	157,82	20,2	4	3,82



Rys. 5. Wpływ rodzaju źródła azotu i fosforu w brzeczkach fermentacyjnych sporządzonych na bazie hydrolizatów wierzby na poziom ich odfermentowania z udziałem drożdży *S. cerevisiae* B4 lub 7

Zwiększone stężenie cukrów w zatężonych hydrolizatach pozwoliło na uzyskanie średnio 2,9% v/v (I wariant), 3,16% v/v alkoholu (II wariant) oraz ok. 3,6% v/v (III wariant) alkoholu, co przełożyło się na obniżenie sprawności fermentacji względem odnotowanej w próbach nie poddanych zatężaniu do poziomu odpowiednio 52% (II) i 47% (III). Jedynie w doświadczeniu z najmniej skoncentrowanym hydrolizatem (wariant I) uzyskano niewielką poprawę omawianego wyróżnika. Przypuszczalnie może być to spowodowane zwiększeniem koncentracji innych niż cukry proste składników hydrolizatu

(rys. 6). Substancjami odpowiedzialnymi za to zjawisko mogły być niecukrowe związki ekstrahowane z drewna bądź ksylooligomery lub inne oligocukry zwiększące ciśnienie osmotyczne środowiska i wpływające niekorzystnie na aktywność fermentacyjną drożdży. O ich obecności świadczył zmierzony przed fermentacją ekstrakt rzeczywisty hydrolizatów, wynoszący odpowiednio 15,9°Blg (121,8 g cukrów/dm³) w wariantie II oraz 20,2°Blg (157,8 g cukrów/dm³) w wariantie III, który przypuszczalnie przekroczył wartość granicznej odporności drożdży na stężenie związków rozpuszczonych w medium fermentacyjnym.



Rys. 6. Wpływ stopnia koncentracji hydrolizatu wierzby wiciowej na poziom odfermentowania brzeczek przygotowanych z ich udziałem oraz sprawność całkowitą procesu fermentacji

7.4. Podsumowanie

Przeprowadzone doświadczenia wykazały niewielką aktywność fermentacyjną drożdży predysponowanych do wykorzystywania pentoz. Jedynie szczep *Pachysolen tannophilus* w warunkach ograniczonego natleniania charakteryzował się zdolnościami do fermentacji mieszaniny glukozy i ksylozy o niewielkim stężeniu wyjściowym. Proporcja cukrów 5- i 6-węglowych w hydrolizacie wierzby, wynosząca 4,2:1, wskazuje na marginalne znaczenie fermentacji pentoz, stąd istotniejsze stało się doskonalenie warunków fermentacji z udziałem drożdży *S. cerevisiae*. Zabieg detoksykacji substratu po obróbce wstępnej korzystnie wpływał na efektywność fermentacji. Ze względu na zbliżone wyniki uzyskane w procesach hydrolizy i fermentacji przebiegających w systemach sekwencyjnym i symultanicznym, za korzystniejszą strategię uznano wariant dwustopniowy, pozwalający na wprowadzenie pośredniego zabiegu zatężania hydrolizatu przed fermentacją. Poziom zatężenia hydrolizatów należy jednak skorelować z odpornością stosowanych

drożdży ze względu na zbyt wysokie stężenie związków niecukrowych – obecnych w koncentracji substancji ekstraktywnych z drewna, obniżających sprawność fermentacji.

Literatura

- Bellido C., González-Benito G., Coca M., Lucas S., García-Cubero M. T. 2013. *Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using Pichia stipitis*. Bioresource Technology, 133: 51–58.
- Chandel A.K., Chandrasekhar G., Radhika K., Ravinder R., Ravindra P. 2011a. *Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions*. Biotechnology and Molecular Biology Review, 6(1): 008–020.
- Chandel A.K., Silva S.S., Singh O.V. 2011b. *Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production*. W: Dos Santos Bernardes M.A. (ed.). *Biofuel production recent developments and prospects*. InTech. [online] <www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-and-prospects/detoxification-of-lignocellulosic-hydrolysates-for-improved-bioethanol-production>.
- Chu D., Zhang J., Bao J. 2012. *Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of corn stover at high temperature and high solids loading by a thermotolerant strain Saccharomyces cerevisiae DQ1*. Bioenerg. Res., 5: 1020–1026.
- Huang H., Xinyan G., Dongmin L., Mengmeng L., Jiafang W., Haiyu R. 2011. *Identification of crucial yeast inhibitors in bio-ethanol and improvement of fermentation at high pH and high total solids*. Bioresource Technology, 102: 7486–7493.
- Kim T.H., Choi C.H., Oh K.K. 2013. *Bioconversion of sawdust into ethanol using dilute sulfuric acid-assisted continuous twin screw-driven reactor pretreatment and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation*. Bioresource Technology, 130: 306–313.
- Kim I., Han J-I. 2012. *Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology*. Biomass and Bioenergy, 46: 210–217.
- Kwon Y-J., Ma A-Z., Li Q., Wang F., Zhuang G-Q., Liu C.Z. 2011. *Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant Issatchenkovia orientalis*. Bioresource Technology, 102: 8099–8104.
- Lan T.Q., Gleisner R., Zhu J.Y., Dien B.S., Hector R.E. 2013. *High titer ethanol production from SPORL-pretreated loblolly pine by simultaneous enzymatic saccharification and combined fermentation*. Bioresource Technology, 127: 291–297.
- Limayem A., Ricke S.C. 2012. *Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects*. Progress in Energy and Combustion Science, 38: 449–467.
- Liu K., Lin K., Yue J., Li X., Fang X., Zhu M., Lin J., Qu Y., Xiao L. 2010. *High concentration ethanol production from corn cob residues by fed-batch strategy*. Bioresource Technology, 101: 4952–4958.
- Lu Y.F., Wang Y.H., Xu G.Q., Chu J., Zhuang Y.P., Zhang S.L. 2010. *Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam exploded corn stover biomass*. Appl. Biochem. Biotechnol., 160: 360–369.
- McIntosh S., T. Vancov T. 2011. *Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw*. Biomass and Bioenergy, 35: 3094–3103.
- Matsushika A., Inoue H., Murakami K., Takimura O., Sawayama S. 2009. *Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting Saccharomyces cerevisiae*. Bioresour. Technol., 100: 2392–2398.
- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapfel M. 2005. *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*. Bioresource Technology, 96: 673–686.

- Olofsson K., Bertilsson M., Liden G. 2008. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol. Biofuels*, 1: 7.
- Öhgren K., Bura R., Lesnicki G., Saddler J., Zacchi G. 2007. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochem.*, 42: 834–839.
- Park J.M., Vinuselvi P., Lee S.K. 2012. The mechanism of sugar-mediated catabolite repression of the propionate catabolic genes in *Escherichia coli*. *Gene.*, 504(1): 116–121.
- Sarkar N., Gosh S.K., Bannerjee S., Aikat K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37: 19–27.
- Schenck von A., Berglin N., Uusitalo J. 2013. Ethanol from Nordic wood raw material by simplified alkaline soda cooking pre-treatment, *Applied Energy*, 102: 229–240.
- Thein Z.M., Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P. 2007. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Archives of Oral Biology*, 52(8) :761–767.
- Zhang J., Chu D., Huang J., Yu Z., Dai G., Bao J. 2010. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor, *Biotech. Bioeng.*, 105(4): 718–728.
- Zhao L., Zhang X. Tan. T. 2008. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. *Biomass and Bioenergy*, 32: 1156–1161.

CZEŚĆ II

AUTOGENERACJA ENERGII W BIORAFINERII LIGNOCELULOZOWEJ

8. Katalityczne aspekty procesu elektrotleniania etanolu

Bogusław Pierożyński

8.1. Wprowadzenie

Proces elektrochemicznego utleniania alifatycznych alkoholi jest kluczowy z punktu widzenia rozwoju ogniw paliwowych typu DAFC (*Direct Alcohol Fuel Cells*). Podczas gdy wodór umożliwia uzyskanie większych wydajności elektrycznych niż alkohole w ogniwach typu PEM, jego produkcja, systemy gromadzenia oraz dystrybucji są wciąż na etapie dalekim od pełnej komercjalizacji. Wykorzystanie jako bezpośredniego paliwa w ogniwach paliwowych alkoholi alifatycznych jest korzystne z uwagi na kilka czynników. Przede wszystkim paliwo w formie ciekłej zapewnia uproszczony i w pełni bezpieczny system przechowywania oraz dystrybucji. Jednocześnie alkohole charakteryzują się relatywnie wysokimi wartościami gęstości energii przypadającej na jednostkę masy, tj. 6,1 oraz 8,0 kWh kg⁻¹ odpowiednio w przypadku metanolu oraz etanolu.

Jakkolwiek dotychczas najbardziej zaawansowane technologicznie są systemy metanolowych ogniw paliwowych DMFC (*Direct Methanol Fuel Cells*), systemy etanolowe wzburdzają coraz większe zainteresowanie, przede wszystkim ze względu na brak właściwości toksycznych tego paliwa oraz możliwość jego produkcji w sposób odnawialny (Shao i Adzic 2005; Song i in. 2005; Rousseau i in. 2006; Abd-El-Latif i in. 2010; Han i in. 2008; Gupta i in. 2010; Switzer i in. 2009; Mahapatra i in. 2010).

Katalityczna reakcja anodowego elektrotleniania etanolu na powierzchni metalicznej zachodzi w wyniku szeregu reakcji pośrednich. Po wstępnej elektrosorpcji na powierzchni katalizatora cząsteczka etanolu może ulec dysocjacji

do CO_{ads} oraz do aldehydu, a następnie w obecności zaadsorbowanych jonów hydroksylowych powstaje CO₂ oraz kwas octowy, które to substancje w końcowej fazie reakcji ulegają desorpcji z powierzchni katalizatora. Dotychczasowe studia literaturowe reakcji *EOR* obejmują elektrochemiczne badania szeregu materiałów katalitycznych, przede wszystkim platyny, jej stopów z uwzględnieniem takich modyfikatorów jak: Ru, Rh, Sn, Pd oraz ostatnio tzw. układów mikro- i nanokrystalicznych (Xia i in. 1997; Rousseau i in. 2006; Song i in. 2005; Gupta i Datta 2006; Simoes i in. 2007; Gomes i in. 2008; Fujiwara i in. 2008; Abd-El-Latif i in. 2010; Gupta i in. 2010; El-Shafei i Eiswirth 2010; Mahapatra i in. 2010). Brak dostępności relatywnie taniego oraz efektywnego katalizatora anodowej reakcji utleniania etanolu to wciąż poważny problem limitujący rozwój technologii ogniw paliwowego DEFC.

8.2. Metody

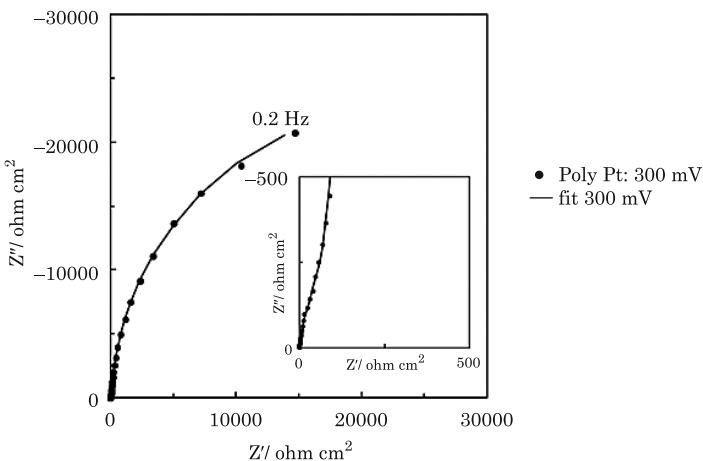
Część eksperymentalna pracy badawczej została wykonana w roztworach bazowych 0,5 mol dm⁻³ H₂SO₄ (Seastar Chemicals, BC, Kanada) oraz 0,1 mol dm⁻³ NaOH (AESAR, 99,996%) sporządzonych na bazie ultraczystej wody dostarczonej przez system 18,2 MΩ Direct-Q3 UV produkowany przez firmę Millipore, przy stężeniach etanolu (Stanlab, p.a., Polska) wynoszących 0,25 oraz 1,0 mol dm⁻³. Badania elektrochemiczne przeprowadzono w trójelektrodowej celi pomiarowej wykonanej w całości ze szkła typu pyrex, gdzie rolę elektrody pomocniczej pełniła spiralna elektroda Pt (drut o średnicy 1,0 mm, 99,9998%, Johnson Matthey, Inc.), natomiast Pd (drut o średnicy 0,5 mm, 99,9%, Aldrich) wykorzystano jako elektrodę referencyjną (RHE). Jako materiały badane zastosowano polikrystaliczną elektrodę Pt, monokryształy Pt o konfiguracjach krystalograficznych (111) i (100), sporządzone z drutu Pt o średnicy 1 mm i czystości 99,9985% (AESAR/Puratronic) oraz 2 stopy platyny: PtRh (Pt90/Rh10, drut o średnicy 1 mm, Goodfellow, UK) i PtRu (Pt95.2/Ru4.8, folia o grubości 0,05 mm, AlfaAesar).

Badania elektrochemiczne (woltamperometria cykliczna: s = 50 mV s⁻¹ oraz spektroskopia impedancyjna: amplituda sygnału a.c. 5 mV, zakres częstotliwości 1,0×10⁵-0,5×10⁻¹ Hz) wykonano przy użyciu zestawu elektrochemicznego Solartron 12,608W, składającego się z analizatora częstotliwości (1260 FRA) oraz potencjostatu (1287 EI) kontrolowanych za pomocą programów ZPlot 2.9 oraz Corrware 2.9 firmy Scribner Associates, Inc. Analiza uzyskanych widm impedancyjnych wykonana została przy użyciu programu ZView 2.9 (Scribner Associates, Inc.) w oparciu o tzw. układ modeli zastępczych (Macdonald 1987).

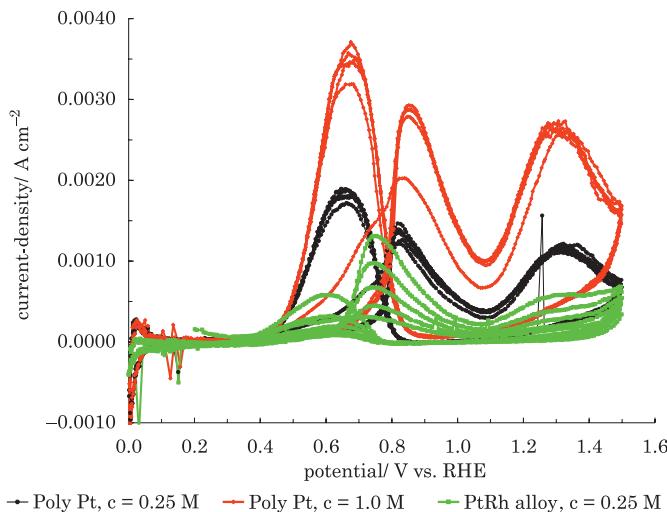
8.3. Dyskusja uzyskanych wyników

8.3.1. Proces utleniania etanolu na Pt w roztworze 0,5 mol dm⁻³ H₂SO₄

W przypadku polikrystalicznej elektrody platynowej początek procesu utleniania alkoholu można zaobserwować na wykresie impedancyjnym Nyquista (rys. 1) już w zakresie potencjałów 200–300 mV/RHE (tab. 1), tzn. w zakresie potencjałowym charakterystycznym dla tzw. procesu *UPD of H* (R_H oraz C_{pH} w tabeli 1 to odpowiednio: rezystancja przeniesienia ładunku oraz pseudopojemność wyznaczone dla procesu *UPD H*). Minimum wyznaczonego parametru rezystancji przeniesienia ładunku ($R_{ct} = 1920 \Omega \text{ cm}^2$) dla inicjacji procesu elektroutleniania alkoholu przypada dla potencjału 600 mV, który zbiega się z maksymalną wartością gęstości prądu dla tego układu (rys. 2). W odniesieniu do elektrody wykonanej ze stopu PtRh inicjacja procesu utleniania etanolu przebiega ze znacznym (ok. +200 mV) przesunięciem w kierunku potencjałów elektrododatnich, na co wskazuje znacząca redukcja zmierzonych gęstości prądu dla katalizatora PtRh (rys. 2), natomiast minimum wyznaczonego parametru R_{ct} wynosi $1345 \Omega \text{ cm}^2$. Bardzo zbliżoną charakterystykę elektrochemiczną (jakkolwiek przy zwiększonych woltamperometrycznych gęstościach prądu) zaobserwowano w przypadku elektrody PtRu, gdzie minimum parametru $R_{ct} = 1327 \Omega \text{ cm}^2$ wyznaczono dla potencjału 700 mV/RHE.



Rys. 1. Wykres impedancyjny Nyquista zarejestrowany dla polikrystalicznej elektrody Pt w roztworze 0,5 mol dm⁻³ H₂SO₄, w obecności 0,25 mol dm⁻³ C₂H₅OH, przy potencjale 300 mV/RHE (temperatura pokojowa)



Rys. 2. Proces elektrotutleniania etanolu przedstawiony za pomocą woltamperometrii cyklicznej (5 kolejnych cykli przy szybkości zmian potencjału 50 mV s⁻¹) dla polikrystalicznej elektrody Pt oraz stopu PtRh w roztworze 0,5 mol dm⁻³ H₂SO₄, w obecności 0,25 oraz 1 mol dm⁻³ C₂H₅OH (temperatura pokojowa)

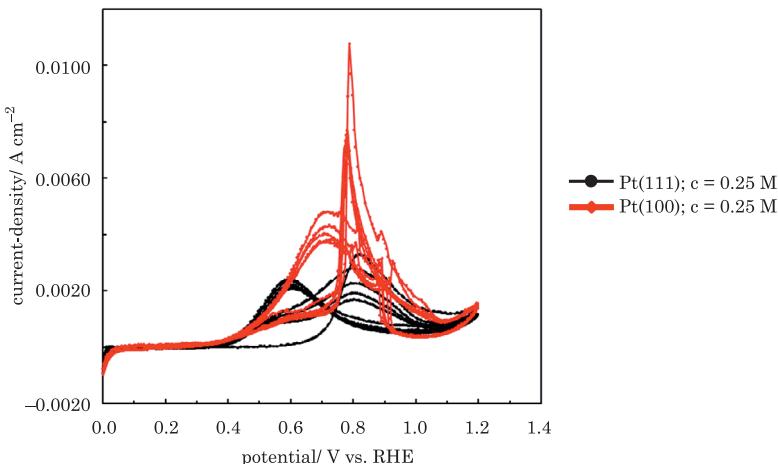
Tabela 1
Parametry kinetyczne (rezystancyjne oraz pojemnościowe) dla procesów elektrotutleniania etanolu oraz tzw. UPD of H (*underpotential deposition of hydrogen*), wyznaczone dla polikrystalicznej elektrody Pt oraz stopu PtRh za pomocą spektroskopii impedancjiowej w roztworze 0,5 mol dm⁻³ H₂SO₄, w obecności 0,25 mol dm⁻³ C₂H₅OH (temperatura pokojowa)

E (mV)	R _H (Ω cm ²)	×10 ⁶ C _{pH} (F cm ⁻² s ^{ρ1-1})	×10 ⁶ C _{dl} (F cm ⁻² s ^{ρ2-1})	R _{ct} (Ω cm ²)
1	2	3	4	5
Polikrystaliczna Pt				
200	55,8 ± 4,5	67,2 ± 7,2	63,3 ± 7,7	105 793 ± 33 800
300	753,4 ± 37,6	7,8 ± 0,3	19,3 ± 0,4	47 898 ± 594
400	—	—	18,9 ± 0,1	25 477 ± 232
500	—	—	23,8 ± 0,3	4 051 ± 54
600	—	—	54,7 ± 1,2	1 920 ± 31
1100	—	—	121,1 ± 1,4	659 ± 7
1200	—	—	94,6 ± 1,3	562 ± 5
1300	—	—	80,1 ± 1,1	1 051 ± 14
1400	—	—	68,6 ± 0,7	2 450 ± 41
1500	—	—	60,2 ± 0,6	2 042 ± 23

cd. tabeli 1

1	2	3	4	5
PtRh				
400	–	–	$30,9 \pm 0,3$	$6\ 376 \pm 77$
500	–	–	$44,8 \pm 0,6$	$1\ 949 \pm 17$
600	–	–	$69,5 \pm 1,5$	$1\ 345 \pm 12$

Badania elektrochemiczne reakcji *EOR* w przypadku monokryształów Pt o orientacjach geometrycznych (111) i (100) potwierdziły znaczącą zależność kinetyki procesu utleniania etanolu od geometrii monokryształów platyny. Jednocześnie elektroda Pt(100) wykazała w środowisku H_2SO_4 najwyższą aktywność katalityczną spośród badanych materiałów elektrodowych – w roztworze $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$ etanolu wyznaczona minimalna wielkość rezystancji przeniesienia ładunku wyniosła zaledwie $80,4 \Omega \text{ cm}^2$ dla potencjału 700 mV (ok. 24-krotny spadek rezystancji reakcji). Skutkuje to dramatycznym wzrostem anodowej gęstości prądu w odniesieniu do pozostałych badanych materiałów w reakcji *EOR*, co przedstawiono porównawczo dla elektrod Pt(100) oraz (111) na rysunku 3.



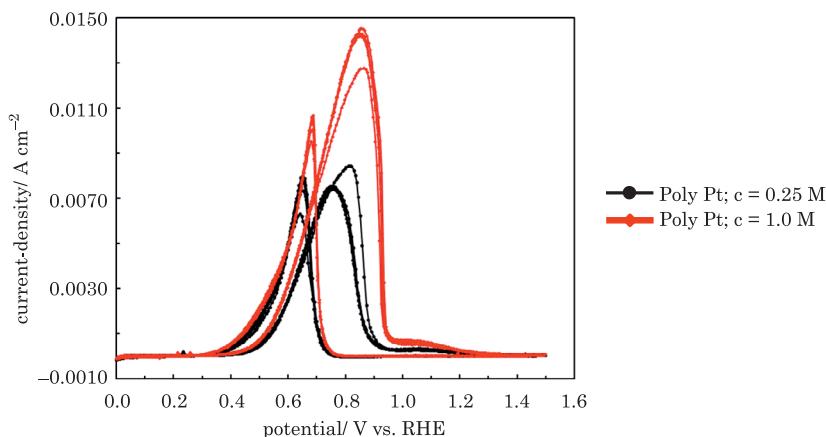
Rys. 3. Proces elektrotutleniania etanolu przedstawiony za pomocą woltamperometrii cyklicznej (5 kolejnych cykli przy szybkości zmian potencjału 50 mV s^{-1}) dla elektrod o konfiguracji krystalograficznej Pt(111) oraz Pt(100) w roztworze $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$, w obecności $0,25 \text{ mol dm}^{-3} \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (temperatura pokojowa)

Jednocześnie zarejestrowane w tabeli 1 wielkości rezystancji reakcji *UPD of H* (parametr R_{H}) dla polikryształycznej Pt w obecności alkoholu etylowego są znacznie większe (ok. 2 rzędy wielkości) niż typowe wielkości tego parametru

dla Pt (Morin i in. 1996; Conway i Pierozynski 2008) wyznaczone w elektrolicie bazowym ($0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$). Tak więc w obecności zaadsorbowanych cząsteczek etanolu (lub produktów pośrednich reakcji utleniania alkoholu) na Pt następuje dramatyczne spowolnienie kinetyki procesu *UPD H*. Na podstawie uzyskanych wyników impedancyjnych należy także stwierdzić, iż kinetyka procesu *UPD H* jest zdecydowanie sprawniejsza niż kinetyka badanego procesu *EOR*.

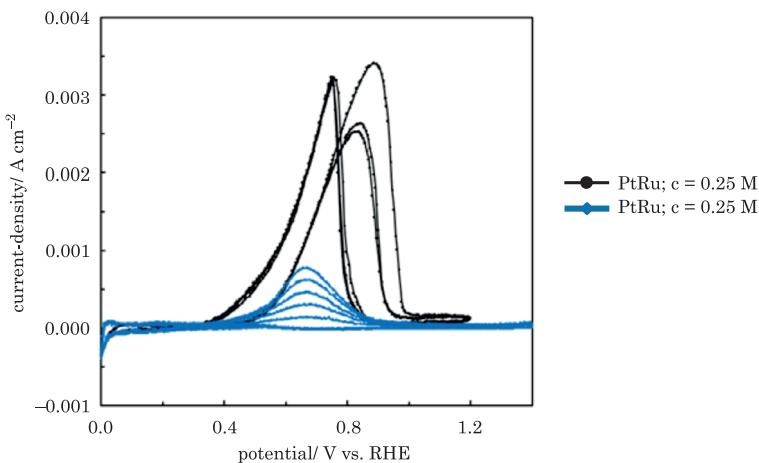
8.3.2. Proces utleniania etanolu na Pt w roztworze $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$

Porównując woltamperometryczne zachowanie elektrody Pt (rys. 4) oraz stopów PtRh i PtRu (rys. 5) w roztworze $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$, można stwierdzić, iż proces elektrotrutleniania etanolu na Pt charakteryzuje się zdecydowanie większymi wartościami anodowych gęstości prądów. Jednocześnie, w przypadku elektrody PtRh zanotowano dramatyczny spadek wartości gęstości prądu (w porównaniu do elektrody PtRu), co ma prawdopodobnie związek z tym, iż obecność Ru w stopie wpływa pozytywnie na proces utleniającej desorpcji CO_{ads} z powierzchni katalizatora. Powyższe spostrzeżenia zostały potwierdzone w wyniku kinetycznych pomiarów przy zastosowaniu spektroskopii impedancyjnej (tab. 3 i 4). Tak więc proces utleniania etanolu na powierzchni polikrystalicznej elektrody Pt charakteryzuje się zdecydowanie zredukowanymi wartościami minimum parametru rezystancji przeniesienia ładunku (R_{ct}), niż ma to miejsce w przypadku elektrod PtRu oraz PtRh.



Rys. 4. Proces elektrotrutleniania etanolu przedstawiony za pomocą woltamperometrii cyklicznej (5 kolejnych cykli przy szybkości zmian potencjału 50 mV s^{-1}) dla polikrystalicznej elektrody Pt w roztworze $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$, w obecności $0,25$ oraz $1,0 \text{ mol dm}^{-3} \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (temperatura pokojowa)

(z porównania wartości minimum parametru R_{ct} zaznaczonych tłustym drukiem w tabelach 2 i 3). Jednocześnie, podobnie jak w przypadku kwasu siarkowego, kinetyka procesu utleniania alkoholu na Pt w roztworze NaOH wykazała silną zależność od stężenia alkoholu w roztworze bazowym, co można zaobserwować na rysunku 4 oraz w tabeli 3.



Rys. 5. Proces elektrotleniania etanolu przedstawiony za pomocą woltamperometrii cyklicznej (przy szybkości zmian potencjału 50 mV s^{-1}) dla elektrod PtRu oraz PtRh w roztworze $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH, w obecności $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (temperatura pokojowa)

Tabela 2
Parametry kinetyczne (rezystancyjne oraz pojemnościowe) dla procesów elektrotleniania etanolu oraz tzw. UPD of H (underpotential deposition of hydrogen) wyznaczone dla polikrystalicznej elektrody Pt za pomocą spektroskopii impedancjiowej w roztworze $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH, w obecności $0,25$ oraz $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (temperatura pokojowa)

E (mV)	$R_H (\Omega \text{ cm}^2)$	$\times 10^6 C_{ph} (\text{F cm}^{-2}\text{s}^{0.5})$	$\times 10^6 C_{dl} (\text{F cm}^{-2}\text{s}^{0.5})$	$R_{ct} (\Omega \text{ cm}^2)$
1	2	3	4	5
$0,25 \text{ mol dm}^{-3} \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$				
100	$303,6 \pm 2,0$	$315,4 \pm 1,2$	$37,4 \pm 0,5$	–
200	$844,3 \pm 18,6$	$192,0 \pm 1,7$	$36,3 \pm 0,7$	–
250	$2\ 585 \pm 101$	$69,1 \pm 0,5$	$33,0 \pm 0,3$	–
400	–	–	$28,4 \pm 0,4$	$1\ 520 \pm 10$
	$R_o / \Omega \text{ cm}^2$	L/H		
500	$293,3 \pm 22,3$	$521,6 \pm 27,3$	$35,5 \pm 1,6$	$352,5 \pm 4,6$

cd. tabeli 2

1	2	3	4	5
1,0 mol dm ⁻³ C ₂ H ₅ OH				
100	316,5 ± 2,7	273,7 ± 1,5	35,2 ± 0,6	–
200	1 196 ± 23	127,3 ± 1,0	35,7 ± 0,6	–
250	1 842 ± 20	72,7 ± 1,3	31,8 ± 1,1	–
400	–	–	26,2 ± 0,4	1 272 ± 11
	R _o / Ω cm ²	L/ H		
500	310,4 ± 23,3	285,4 ± 15,2	33,2 ± 1,4	300,3 ± 3,6

Tabela 3

Parametry kinetyczne (rezystancyjne oraz pojemnościowe) dla procesów elektrotroutleniania etanolu oraz tzw. UPD of H (*underpotential deposition of hydrogen*) wyznaczone dla elektrod PtRu oraz PtRh za pomocą spektroskopii impedancjiowej w roztworze 0,1 mol dm⁻³ NaOH, w obecności 0,25 mol dm⁻³ C₂H₅OH (temperatura pokojowa)

E (mV)	R _H (Ω cm ²)	×10 ⁶ C _{pH} (F cm ⁻² s ^{ρ1-1})	×10 ⁶ C _{dl} (F cm ⁻² s ^{ρ2-1})	R _{ct} (Ω cm ²)
PtRu				
200	133,4 ± 6,9	214,0 ± 12,6	94,0 ± 3,8	–
300	919,2 ± 67,1	87,0 ± 5,3	90,4 ± 4,1	33 164 ± 2.643
400	–	–	64,8 ± 1,4	5 132 ± 101
	R _o / Ω cm ²	L/H	–	–
500	585,6 ± 54,4	312,9 ± 14,5	70,3 ± 2,6	1 021 ± 19
600	331,7 ± 36,2	88,8 ± 5,1	39,9 ± 3,9	2 670 ± 245
PtRh				
100	40,7 ± 2,3	230,9 ± 15,4	127,8 ± 16,3	–
150	434,2 ± 36,0	75,6 ± 5,8	129,2 ± 5,5	–
200	1 274 ± 103	41,8 ± 2,0	92,5 ± 1,7	–
300	–	–	70,8 ± 0,3	44 235 ± 1.858
400	–	–	56,3 ± 0,4	8 961 ± 152
500	–	–	111,9 ± 1,0	1 245 ± 11
600	–	–	170,8 ± 2,2	7 417 ± 875

W roztworze wodorotlenku sodu elektroda Pt(111) wykazała radykalny wzrost aktywności katalitycznej w reakcji *EOR* w porównaniu z aktywnością wyznaczoną dla tej geometrii platyny w roztworze H_2SO_4 ($34,7 \Omega \text{ cm}^2$ przy 700 mV w NaOH w odniesieniu do $883 \Omega \text{ cm}^2$ przy tym samym potencjale w H_2SO_4). Efekt ten spowodowany jest tym, iż Pt(111) w środowisku alkalicznym reprezentuje jedyną konfigurację spośród tzw. *low-index Miller planes*, dla której profil woltamperometryczny wykazuje wyraźny podział zakresów potencjałowych dla odwracalnej elektrosorpcji wodoru (*UPD H*) oraz elektrosorpcji jonów OH^- . W konsekwencji utlenianie etanolu na powierzchni kryształu Pt o konfiguracji (111) rozpoczyna się w warunkach braku adsorpcji jonów hydroksylowych na powierzchni platyny.

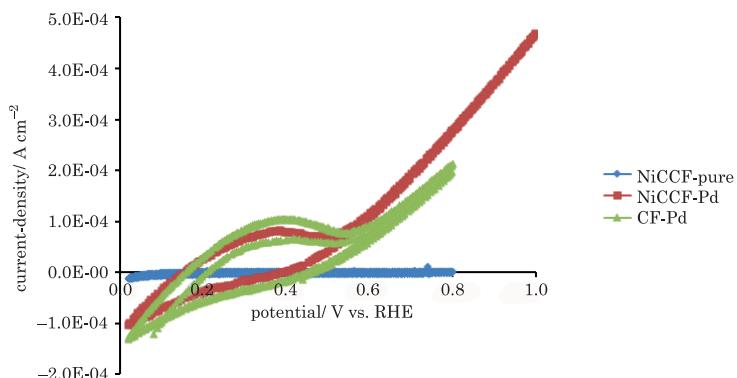
Jednocześnie wyznaczone na podstawie temperaturowej zależności (w zakresie $23\text{--}60^\circ\text{C}$) wykresów Arrheniusa wielkości energii aktywacji dla procesu elektrotleniania etanolu wyniosły odpowiednio w kwasie siarkowym: $33,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ (polikrystaliczna Pt), $29,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ (PtRu) i $33,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ (PtRh) oraz w wodorotlenku sodu: $23,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ (polikrystaliczna Pt), $30,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ (PtRu) i $36,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ (PtRh).

8.3.3. Proces utleniania etanolu na kompozytowych katalizatorach CF (NiCCF)/Pd

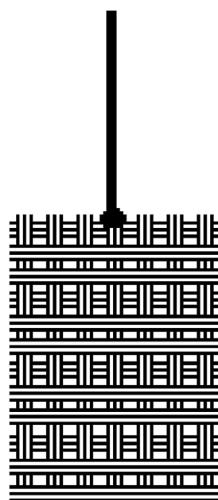
Jakkolwiek prace badawcze prowadzone z wykorzystaniem Pt oraz jej stopów w formie *in bulk* miały przede wszystkim charakter poznawczy, w niniejszej pracy podjęto także próbę uzyskania aktywnego katalizatora reakcji utleniania etanolu w oparciu o „niekatalityczny” materiał bazowy: aktywowane włókna węglowe (CF_{ox}) oraz włókna węglowe z ultracienką powłoką Ni (NiCCF), modyfikowane elektrochemicznie palladem (*ca.* 10–50% wagowych Pd w kompozycie). W środowisku wodorotlenku sodu kompozytowe katalizatory NiCCF/Pd oraz CF/Pd wykazały się zbliżonymi właściwościami katalitycznymi (rys. 6) w reakcji elektrotleniania etanolu do tych zaprezentowanych przez materiały katalityczne na bazie Pt, stosowane w formie *in bulk*, jak opisano powyżej. Wyznaczone przy użyciu spektroskopii impedancjowej wielkości minimalne rezystancji przeniesienia ładunku (w odniesieniu do katalizatorów NiCCF-Pd oraz CF-Pd na rys. 6) wyniosły odpowiednio: $6084 \Omega \text{ cm}^2$ (400 mV/RHE) i $2228 \Omega \text{ cm}^2$ (500 mV) dla elektrody CF/Pd oraz $3832 \Omega \text{ cm}^2$ (400 mV) i $1301 \Omega \text{ cm}^2$ (500 mV) dla elektrody NiCCF/Pd. Jednocześnie wyznaczone dla tych materiałów katalitycznych wielkości pojemności podwójnej warstwy elektrycznej (C_{dl}) oscylowały w granicach $850\text{--}1050 \text{ mF cm}^{-2}$, co świadczy o dramatycznym wzroście elektrochemicznie aktywnej powierzchni katalizatora ponad jej wyjściowe (CF/NiCCF) wymiary geometryczne. W środowisku kwaśnym ($0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$) zarejestrowano

całkowity brak aktywności tychże materiałów kompozytowych w reakcji EOR, poza rozpoznanym procesem *UPD H*. Wykazano także, że kinetyka procesu *UPD H* (dla Pd) w roztworze H_2SO_4 jest zdecydowanie sprawniejsza niż w NaOH, przy czym reakcja ta w środowisku alkalickim przebiega znacznie sprawniej niż proces utleniania alkoholu.

Przykładowy schemat praktycznej, kompozytowej elektrody CF/Pd, wykonanej w układzie „przedzy” jako katalizatora reakcji elektroutleniania etanolu przedstawiono na rysunku 7.



Rys. 6. Proces elektroutleniania etanolu (w obecności $1,0 \text{ mol dm}^{-3} C_2H_5OH$) na powierzchni kompozytu NiCCF oraz modyfikowanych palladem materiałów katalitycznych NiCCF/Pd (ok. 10% Pd) oraz CF/Pd (ok. 20% Pd) w $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ roztworze bazowym NaOH (temperatura pokojowa)



Rys. 7. Przykład konstrukcji kompozytowej elektrody CF/Pd o dużej powierzchni aktywnej jako katalizatora reakcji utleniania etanolu

8.4. Wnioski

Przeprowadzone badania elektrochemiczne wykazały znaczną zależność kinetyki procesu utleniania etanolu od geometrii monokryształów Pt, jak również środowiska oraz temperatury reakcji. Najwyższą aktywność katalityczną spośród badanych elektrod w środowisku kwaśnym wykazał monokryształ Pt(100), natomiast w przypadku Pt(111) w roztworze wodorotlenku sodu zaobserwowano radykalny wzrost aktywności katalitycznej w reakcji *EOR* w porównaniu z aktywnością wyznaczoną dla tej geometrii Pt w roztworze kwasu siarkowego. W środowisku alkalicznym Pt(111) jest jedną konfiguracją krystalograficzną, dla której profil woltamperometryczny wykazuje charakterystyczny podział zakresów potencjałowych dla elektrosorpcji wodoru (*UPD H*) oraz elektrosorpcji jonów OH⁻. W konsekwencji utlenianie etanolu na Pt(111) rozpoczyna się w warunkach braku adsorpcji jonów OH⁻ na powierzchni platyny. Jednocześnie wykazano, iż zarówno w roztworze H₂SO₄, jak i w NaOH inicjacja reakcji utleniania alkoholu przebiega w zakresie potencjałów charakterystycznym dla procesu *UPD H*. Obecność zaadsorbowanych cząsteczek etanolu (lub produktów pośrednich reakcji utleniania alkoholu) powoduje silne spowolnienie kinetyki procesu *UPD H*, w odniesieniu do jego kinetyki wyznaczonej dla elektrolitów bazowych.

Modyfikacja platyny za pomocą Rh lub Ru generalnie nie przyczyniła się do usprawnienia kinetyki procesu utleniania etanolu w odniesieniu do wyników uzyskanych dla polikrystalicznej elektrody Pt (na podstawie porównania wyznaczonych rezystancji oraz energii aktywacji reakcji). W roztworze H₂SO₄, dodatek Rh usprawnił natomiast kinetykę reakcji utleniania etanolu w początkowym jego stadium, ułatwiając rozerwanie wiązania C-C w cząsteczce zaadsorbowanego alkoholu. Podobnie jak niemodyfikowane katalizatory Pt, w przypadku stopów PtRh oraz PtRu obecność zaadsorbowanych cząsteczek etanolu (lub produktów pośrednich reakcji jego utleniania) znacząco spowolniła kinetykę procesu *UPD H*.

Kompozyty z włókien węglowych modyfikowane palladem wykazały znaczną aktywność katalityczną w reakcji utleniania etanolu w środowisku alkalicznym (0,1 mol dm⁻³ NaOH), natomiast w środowisku kwaśnym (0,5 mol dm⁻³ H₂SO₄) całkowity brak aktywności. Jednocześnie wykazano, że kinetyka elektrosorpcji wodoru (dla Pd) w roztworze H₂SO₄ jest zdecydowanie sprawniejsza niż w roztworze NaOH, przy czym proces *UPD H* w środowisku alkalicznym przebiega znacznie szybciej niż proces utleniania samego alkoholu.

Literatura

- Abd-El-Latif A.A., Mostafa E., Huxter S., Attard G., Baltruschat H. 2010. *Electrooxidation of ethanol at polycrystalline and platinum stepped single crystals: A study by differential electrochemical mass spectrometry*. *Electrochimica Acta*, 55: 7951–1960.
- Conway B.E., Pierozynski B. 2008. *A.c. impedance behaviour of processes involving adsorption and reactivity of guanidonium-type cations at Pt(100) surface*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 622: 10–14.
- El-Shafei A.A., Eiswirth M. 2010. *Electrochemical activity of Sn-modified Pt single crystal electrodes for ethanol oxidation*. *Surface Science*, 604: 862–867.
- Fujiwara N., Siroma Z., Yamazaki S., Ioroi T., Senoh H., Yasuda K. 2008. *Direct ethanol fuel cells using an anion exchange membrane*. *Journal Power Sources*, 185: 621–626.
- Gomes J.F., Busson B., Tadjeddine A., Tremiliosi-Filho G. 2008. *Ethanol electro-oxidation over Pt(h₀k₀l): Comparative study on the reaction intermediates probed by FTIR and SFG spectroscopies*. *Electrochimica Acta*, 53: 6899–6905.
- Gupta S.S., Datta J. 2006. *A comparative study on ethanol oxidation behavior at Pt and PtRh electrodeposits*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 594: 65–72.
- Gupta S.S., Singh S., Datta J. 2010. *Temperature effect on the electrode kinetics of ethanol electro-oxidation on Sn modified Pt catalyst through voltammetry and impedance spectroscopy*. *Materials Chemistry and Physics*, 120: 682–690.
- Han S.B., Song Y.J., Lee J.M., Kim J.Y., Park K.W. 2008. *Platinum nanocube catalysts for methanol and ethanol electrooxidation*. *Electrochemistry Communications*, 10: 1044–1047.
- Macdonald J. R. 1987. *Impedance spectroscopy, emphasizing solid materials and systems*. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Mahapatra S.S., Dutta A., Datta J. 2010. *Temperature effect on the electrode kinetics of ethanol oxidation on Pd modified Pt electrodes and the estimation of intermediates formed in alkali medium*. *Electrochimica Acta*, 55: 9097–9104.
- Morin S., Dumont H., Conway B.E. 1996. *Evaluation of the effect of two-dimensional geometry of pt single-crystal faces on the kinetics of upd of h using impedance spectroscopy*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 412: 39–52.
- Rousseau S., Coutanceau C., Lamy C., Leger J.M. 2006. *Direct ethanol fuel cell (DEFC): Electrical performances and reaction products distribution under operating conditions with different platinum-based anodes*. *Journal of Power Sources*, 158: 18–24.
- Shao M.H., Adzic R.R. 2005. *Electrooxidation of ethanol on a Pt electrode in acid solutions: in situ ATR-SEIRAS study*. *Electrochimica Acta*, 50: 2415–2422.
- Simoës F.C., Ajnos dos D.M., Vigier F., Leger J.M., Hahn F., Coutanceau C., Gonzalez E.R., Tremiliosi-Filho G., Andrade de A.R., Olivi P., Kokoh K.B. 2007. *Electroactivity of tin modified platinum electrodes for ethanol electrooxidation*. *Journal of Power Sources*, 167: 1–10.
- Song S.Q., Zhou W.J., Zhou Z.H., Jiang L.H., Sun G.Q., Xin Q., Leontidis V., Kontou S., Tsiakaras P. 2005. *Direct ethanol PEM fuel cells: The case of platinum based anodes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30: 995–1001.
- Switzer E.E., Olson T.S., Datye A.K., Atanassov P., Hibbs M.R., Cornelius C.J. 2009. *Templated Pt–Sn electrocatalysts for ethanol, methanol and CO oxidation in alkaline media*. *Electrochimica Acta*, 54: 989–995.
- Xia X.H., Liess H.D., Iwasita T. 1997. *Early stages in the oxidation of ethanol at low index single crystal platinum electrodes*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 437: 233–240.

9. Produkcja wodoru z biomasy z użyciem mikrobiologicznego ogniska elektrolitycznego

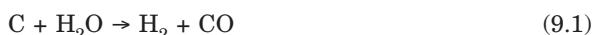
Marek Lieder, Milena Jabłońska, Marcin Solski, Maria Rybarczyk

9.1. Wprowadzenie

Świat potrzebuje nowych nośników energii, takich, które mogą być wytwarzane bez szkody dla środowiska, są łatwe do przenoszenia i magazynowania, bezpieczne w użyciu, a nadto wszystko uwolniona z nich energia, np. w postaci mechaniczną lub cieplną, nie prowadzi do powstania niebezpiecznych produktów ubocznych lub odpadów. Elektryczność jest nośnikiem energii o walorach spełniających prawie wszystkie wymienione postulaty z wyjątkiem pierwszego. Trzeba jednak przyznać, że nowoczesne techniki bezpośredniego pozyskiwania elektryczności z energii wiatru, światła słonecznego czy ruchu fal zbliżają się do przedstawionego wzorca.

Wodór, choć należy do 10 pierwiastków najbardziej rozpowszechnionych w skorupie ziemskiej, jest postrzegany jako nośnik energii podobny do elektryczności, gdyż w stanie wolnym praktycznie nie występuje na naszym globie. Tak więc gazowy wodór musi być wytwarzany, co oznacza konieczność przeniesienia części energii, głównie wiązań węgiel-wodór, do wiązania chemicznego wodór-wodór. W ten sposób wyodrębniona energia może być przekształcona w ciepło lub ruch mechaniczny poprzez spalanie wodoru. Takie ujęcie pokazuje, że wytwarzanie wodoru poprzez rozkład wody nie ma sensu, gdyż zysk energetyczny nie jest termodynamicznie możliwy, chyba że użyta zostanie inna dostępna forma energii dotworzenia gazowego wodoru.

Takim rozwiązaniem jest technologia zgazowania węgla:



oraz procesy termokatalityczne z użyciem węglowodorów pochodzących z gazu ziemnego lub ropy naftowej, w których do wytwarzania wodoru wykorzystywana jest energia wiązania węgiel-wodór:

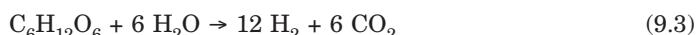


Reakcja ta nie jest jednak termodynamicznie samorzutna, a więc wymaga dostarczenia energii cieplnej z innego źródła (w przybliżeniu cała energia wiązań w metanie zostaje przeniesiona do wiązań H-H, jednakże powstające wiązania C=O nie kompensują energii potrzebnej do dysocjacji wody). Popularność tej technologii (wraz z technologią zgazowania węgla stanowi połowę obecnie wytwarzanego wodoru) wynika z dostępności i niskich cen paliw kopalnych.

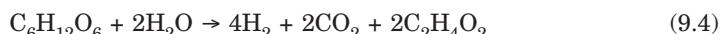
Potencjalnym zamiennikiem węglowodorów mineralnych są policukry, np. celuloza lub ogólnie biomasa pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego. Trzeba jednak zgodzić się, że z uwagi na znacznie mniejszą ilość wiązań wodor-węgiel oraz dużą zawartość wody niezwiązanej chemicznie bilans energetyczny zgazowania tych surowców jest jeszcze bardziej mniej korzystny.

Z biomasy można wyprodukować wodór także z użyciem technologii fermentacyjnej. Jednakże wydajność ciemnej fermentacji ścieków węglowodorowych, najbardziej obiecującej spośród obecnie znanych technologii, jest zasadniczo niższa niż 15% (Angenent i in. 2004). Powodem tak niskiej wydajności jest metanogenna konsumpcja wodoru (Hawkes i in. 2002; Kim i in. 2004), oraz ograniczenia termodynamiczne. Z powodu tych ograniczeń termodynamicznych większość substancji wyjściowych jest przemieniana w produkty uboczne (np. octany, maślany) zamiast w wodór (w innym ujęciu taki koszt trzeba ponieść, aby w ogóle wydzielanie wodoru stało się termodynamicznie możliwe).

Jeśli, dla uproszczenia, za modelową biomasę przyjmiemy 1 mol glukozy, wówczas całkowita jej mineralizacja wytworzy 12 moli wodoru.



W praktyce fermentacja glukozy wszystkimi znanymi mikrobiologicznymi sposobami (przede wszystkim przez *Clostridia*) wytwarza 4 mole wodoru/mol glukozy jeśli obok wodoru powstają 2 mole octanu, ale już tylko 2 mole wodoru powstają, jeśli maślany jest głównym produktem fermentacji. Zwykle podczas fermentacji cukru 60–70% wodnego produktu to maślany:



Nawet stosując bakterie modyfikowane genetycznie, nie można przekroczyć teoretycznej wartości konwersji 33%.

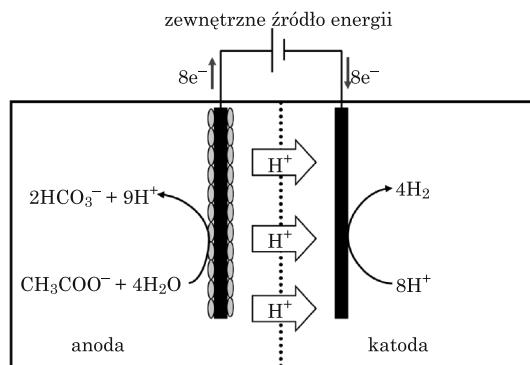
Z niektórych analiz wynika, że opłacalność ekonomiczna zaczyna się od stopnia pozyskiwania wodoru z rozpuszczonych substancji organicznych w granicach 60–80%. Aby osiągnąć taki stopień konwersji, konieczna jest także przemiana produktów ubocznych do wodoru. Ciemna fermentacja nie

umożliwia tego, gdyż obejmuje reakcje endotermiczne. Z tego powodu zaczęto badać procesy fotofermentacyjne (Oh 2004), które wykorzystują energię słoneczną, aby pokonać barierę termodynamiczną. Jednakże dyfuzyjny charakter promieniowania słonecznego (konieczne są reaktory o ogromnych powierzchniach) oraz ograniczone wydajności przemiany znaczająco zawężają ekonomiczną wykonalność tych procesów (Hallenbeck i Benemann 2002).

Innym sposobem na wykorzystanie pozostałej energii jest zastosowanie nowych technologii z użyciem mikroorganizmów w procesach galwanicznych (mikrobiologiczne ogniwa paliwowe) bądź elektrolitycznych (elektroliza katalizowana mikrobiologicznie). Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (MOP) wykorzystują rozmaite występujące naturalnie mikroorganizmy posiadające metaboliczne szlaki do utleniania związków organicznych:



Publikowane badania zwykle obejmują jako dawcę elektronów łatwo ulegające metabolicznym przemianom organiczne związki, m.in. pochodzące z czarnej fermentacji uboczne niskocząsteczkowe kwasy organiczne (Rabaey i in. 2003; Liu i in. 2005; Niessen i in. 2004).



Rys. 1. Schemat działania mikrobiologicznego ogniwa elektrolitycznego

W trakcie normalnego, aerobowego utleniania substancji organicznych katalizowanego przez mikroorganizmy, generowane w reakcji elektrony przekazywane są do tlenu, który podlega redukcji do wody. Bakterie pozyskują w ten sposób energię, którą zużywają na wzrost lub magazynują. Jeśli w środowisku brakuje tlenu, bakterie (kolonie anaerobowe) zmuszone są do przekazywania elektronów do innego utleniacza obecnego w środowisku, np. siarczanów lub azotanów. Znane są także bakterie wykazujące zdolność wykorzystywania utleniacza w stanie stałym, np. związki żelaza lub manganu, i ten właśnie rodzaj bakterii jest wykorzystywany w MOP, w którym stałym utleniaczem jest wolny metal lub grafit – elektroda (anoda) (Rabaey

i Verstraete 2005). Bakterie takie określane są jako „elektroaktywne” i są to m.in. *Aeromonas hydrophila* (Pham i in. 2003), *Clostridium butyricum* (Park 2001), *Desulfobulbus propionicus* (Holmes i in. 2004) *Enterococcus gallinarum* (Kim i in. 2005), *Geobacter sulfurreducens* (Bond i Lovley 2003), *Rhodoferax ferrireducens* (Bond i Lovley 2003), *Shewanella putrefaciens* (Kim i in. 1999; Kim i in. 2002). Bakterie aerobowe nie mogą przekazywać elektronów do stałego utleniacza, gdyż ich błona komórkowa nie przewodzi elektronów, ponadto aktywne centrum redoksowego mikroorganizmu osłonięte jest przez łańcuch peptydowy (Debabov 2008). Natomiast bakterie elektroaktywne wykorzystują trzy sposoby przekazywania elektronów na zewnątrz swojego ustroju:

- 1) bezpośredni kontakt błony komórkowej z utleniaczem, dzięki obecności w niej specjalnych związków przewodzących elektryny (Bond i Lovley 2003; Schroder 2007; Schaetzle i in. 2008);
- 2) przewodzące nanodruty wystające z błony komórkowej (Reguera i in. 2005; Gorby i in. 2006);
- 3) rozpuszczalne związki produkowane przez bakterie będące nośnikami elektronów pomiędzy komórką i utleniaczem, np. *Piocyanina* (Friedheim i in. 1931) lub chinony (Newman i in. 2000).

Podobnie jak w konwencjonalnych ogniwach, anodowe utlenianie musi być uzupełnione o redukcję na katodzie. Elektryny przenoszone są z anody do katody poprzez zewnętrzny obwód elektryczny zawierający odbiornik mocy. W celu zamknięcia obwodu elektrycznego i zachowania elektroobojętności roztworów protonów, które także powstają podczas utleniania materii organicznej, muszą przemieszczać się z anolitu do katolitu. Redukcja na katodzie biegnie z udziałem utleniacza, elektronów i jonów wodorowych. Jeśli utleniaczem jest tlen, to produktem końcowym staje się woda. Podczas gdy liczba możliwych reakcji anodowych jest praktycznie nieograniczona, liczba reakcji katodowych w MOP jest znacznie mniejsza – zwykle to reakcja redukcji tlenu. Testowano także innego utleniaczy, np. heksacyanożelazianu (Kim i in. 2000; Choi i in. 2001; Rabaey i in. 2004), syntetycznych barwników, związków metaloorganicznych (Park i Zeikus 2000), zmineralizowanego biologicznie ditlenku manganu (Shantaram i in. 2005) lub żelaza (Park i Zeikus 2002). Katody anaerobowe są także badane i rozwijane. Umożliwiają one redukcję takich akceptorów elektronów, jak azotany i siarczany poprzez metabolizm mikrobowy (He 2006; Clauwaert i in. 2007; Virdis i in. 2009). Obserwowano także redukcję tlenu katalizowaną przez biofilm (He 2006).

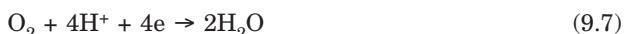
Konstrukcje MOP zwykle składają się z anody i katody umieszczonych w oddzielnych komorach przedzielonych przez polimerową, kationoselektywną membranę (PEM). Przegroda taka jest niezbędna, gdy w reakcji katodowej wykorzystywany jest tlen. W takim przypadku roztwór katolitu nasycony jest

tlenem, który nie powinien dyfundować do anolitu, gdzie konieczne są warunki anaerobowe. PEM muszą zatrzymywać tlen i jednocześnie umożliwiać swobodny transfer jonów wodorowych z anolitu do katolitu. Niestety, obecnie dostępne membrany przepuszczają protony mało wydajnie (selektywnie), co powoduje powstanie gradientu pH – kwaśnego w anolicie i zasadowego w katolicie. Ten gradient potencjału obniża różnicę potencjałów termodynamicznych pomiędzy elektrodami (tzn. moc elektryczna ognia spada). Niektórzy autorzy badali ognia pozbawione membrany, jednakże takie rozwiązanie powoduje znaczny spadek wydajności kulombowskiej (nawet do poziomu 12%), wskutek bezpośredniego utleniania substancji organicznej przez tlen (Liu i Logan 2004).

Użytkowa moc elektryczna MOP zależy od wielu czynników, w tym wydajności transferu elektronów z mikroorganizmów do anody, rodzaju biopaliwa, powierzchni elektrod, wewnętrznego oporu elektrycznego ognia (tj. anolitu, katolitu i PEM), kinetyki katodowej reakcji redukcji oraz warunków pracy narzuconych ogniu (np. temperatura, transport paliwa do anody, tlenu do katody itp.). W przeciągu ostatnich dwóch dekad udało się znacznie zwiększyć moc użytkową ogniw aż do 6,86 W/m² (Fan i in. 2008).

Chociaż moc elektryczna tych urządzeń jest wciąż względnie niska, to jednak technologia szybko się doskonali i w przyszłości może być użyta w małych oczyszczalniach ścieków (szczególnie atrakcyjna możliwość dla krajów rozwijających się), znaleźć zastosowanie do oczyszczania ścieków pochodzących z farm zwierzęcych, zakładów przetwarzających żywność, a nawet załogowych statków i stacji kosmicznych. Ponadto istnieje możliwość wykorzystania MOP do usuwania pojedynczych zanieczyszczeń, np. azotanów (Clauwaert i in. 2007; Jia i in. 2008) lub p-nitrofenoli (Zhu i Ni 2009). Innym potencjalnym zastosowaniem może być produkcja wybranych związków chemicznych, np. H₂O₂ (Zhu i Ni 2009) lub konstrukcja biosensorów do pomiaru biologicznego zapotrzebowania tlenu w ściekach (Kim i in. 2003; Lorenzo i in. 2009).

Lawinowo przyrastająca liczba prac badawczych była wielokrotnie opisywana i analizowana w publikacjach o charakterze przeglądowym. Skupiają się one na wybranych aspektach badawczych, np. budowie, działaniu i osiągów ogniw (Logan i in. 2006; Bullen i in. 2006; Du i in. 2007), mikrobiologicznym metabolizmie (Rabaey i Verstraete 2005), działaniu bioanod (Pham i in. 2009), kinetyce reakcji katodowych (Rismani-Yazdi i in. 2008). Jak już wspominano, najczęściej stosowanym reagentem katodowym w MOP jest tlen z powodu powszechnej dostępności w środowisku, bardzo wysokiego potencjału redoksowego oraz zrównoważenie ekologiczne.



Pewne ograniczenia jednakże obniżają skuteczność tlenu jako akceptora elektronowego, tj. jego niska rozpuszczalność w wodzie oraz wysoka energia aktywacji (wysoki nadpotencjał redukcji do wody, zwłaszcza na elektrodzie grafitowej, czego efektem jest spadek napięcia ogniw). Ten wysoki nadpotencjał aktywacji można obniżyć, stosując katalizatory, np. platynę (Cheng i in. 2006), porfiryny, ftalocyjaniny metali przejściowych (Zhao i in. 2005) lub ditiookarbaminany (Lieder, Zgłoszenie patentowe). Wiele spośród tych katalizatorów jest jednak bardzo drogich i/lub podatnych na zatrucia.

W celu poprawienia sprawności reakcji redukcji na katodzie badano różnorodne modyfikacje składu katolitu i powierzchni elektrody. Napowietrzanie katolitu i obniżanie jego pH powoduje podwyższenie kinetyki reakcji katodowej, jednakże niewystarczająco (Gil i in. 2003; Jang i in. 2004; Oh i in. 2004). Zastosowanie heksacyanożelazianu (III) jako akceptora elektronów znacząco przyśpiesza szybkość reakcji redukcji (Rabaey i Verstraete 2005; Oh i in. 2004; Rabaey i in. 2003), lecz ten związek nie jest odpowiedni do praktycznych zastosowań z powodu toksyczności i niemożności regeneracji za pomocą tlenu (Rabaey i in. 2005).

Zastosowanie platyny jako katalizatora redukcji tlenu na elektrodzie grafitowej znacznie obniża nadpotencjał aktywacji reakcji (Jang i in. 2004; Oh i in. 2004; Liu i Logan 2004). Chociaż platyna jest bardzo dobrym katalizatorem, to jej wysoka cena i podatność na zatrucia powoduje konieczność poszukiwania zamienników (Zhao i in. 2005). Z takim nastawieniem badano porfiryny i ftalocyjaniny metali przejściowych (Co, Fe) (Zhao i in. 2006; Cheng i in. 2006). Biologiczne katalizatory są także atrakcyjne, gdyż utrzymują aktywność w temperaturze otoczenia i podlegają odtwarzaniu (Palmore i Kim 1999).

Biologiczne katalizatory można zastosować w postaci enzymów lub wykorzystać mikroorganizmy (Palmore i Kim 1999; Topcagic 2006). Te ostatnie mają dodatkowy atut, gdyż wytwarzają potrzebny enzym w miejscu reakcji. Bergel i inni (2005) odkryli, że biofilm na stalowej katodzie w środowisku morskim zwiększa wydajność redukcji tlenu.

Rhoads i inni (2005) zastosowali biomineralizowane tlenki manganu jako katodowe reagenty. Podczas pracy mikrobiologicznego ogniwita ditlenek manganu podlegał redukcji do rozpuszczalnych soli Mn(II), które następnie były utleniane biokatalitycznie do wyjściowej formy MnO_2 z udziałem tlenu rozpuszczonego w wodzie. Para redoks Mn(II)/ MnO_2 działała w takich okolicznościach jako mediator transferu elektronów pomiędzy elektrodą i mikroorganizmami redukującymi tlen.

Heijne i inni (2006) badali możliwość użycia pary redoks Fe(III)/Fe(II) jako katodowego mediatora dla redukcji tlenu, gdyż wówczas szybkość przebiegu reakcji na elektrodzie grafitowej jest bardzo duża, standardowy poten-

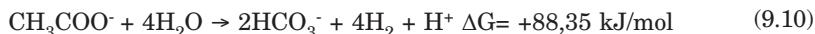
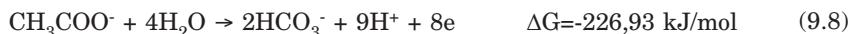
cjał redoks wysoki – wynosi +0,77V vs standardowej elektrody wodorowej (SEW), zaś jony Fe(II) mogą być biologicznie utlenione do Fe(III) z udziałem tlenu jako akceptora elektronów aż do potencjału od +0,850 do 0,950 V vs SEW. Rozwiązań to ma poważną wadę w postaci konieczności utrzymywania niskiego pH katolitu dla zapewnienia rozpuszczalności związków Fe(III). Jak już wcześniej wspominano, najczęściej stosowane w badaniach typowe membrany kationoselektywne, np. Nafion, nie zapobiegają gradientowi pH w ogniwie, a zatem w katolice utrzymuje się wyższe pH niż w anolice.

Od czasu odkrycia bezpośredniego przeniesienia elektronu przez elektrochemiczne aktywne mikroorganizmy na powierzchni elektrod pod koniec minionego stulecia (Kim i in. 1999) bioelektrochemiczna obróbka ścieków stała się gwałtownie rozwijającym się obszarem badań (Rabaey i in. 2007). Najbardziej rozwijanymi bioelektrochemicznymi technologiami są mikrobiologiczne ogniwa paliwowe służące do wytwarzania energii elektrycznej (Kim i in. 1999; Rabaey i in. 2007; Logan i in. 2006) oraz biokatalityczna elektroliza dla otrzymywania wodoru (Liu i in. 2005; Rozendal i in. 2006).

Ostatnio odkryta technologia – biokatalizowana elektroliza (Liu i in. 2005) wywodząca się z mikrobiologicznych ogniów paliwowych (Bond i Lovley 2003; Chaudhuri i Lovley 2003; Kim i in. 2002; Liu i in. 2005; Liu i Logan 2004; Liu i in. 2004; Oh i in. 2004; Rabaey i in. 2003; Rabaey i in. 2004) umożliwia obniżenie termodynamicznej bariery wydzielania wodoru poprzez niewielki wkład energii elektrycznej. To uniezależnia proces od powierzchni reaktora i zbliża system do ekonomicznej wykonalności. Biokatalizowana elektroliza wykorzystuje elektrochemiczne aktywne mikroorganizmy, które przekształcają rozpuszczone substancje organiczne w wodorowęglan, protony i elektrony. Mikroorganizmy przekazują wytworzone elektrony do powierzchni elektrody albo poprzez bezpośredni kontakt z powierzchnią elektrody (Kim i in. 1999; Holmes i in. 2004) lub z pomocą mediatora redoksywnego (Rabaey i in. 2004). Strumień tych elektronów stanowi prąd elektryczny.

Przez połączenie tej biologicznej anody z katodą redukującą protony za pośrednictwem zewnętrznego źródła energii elektrycznej możliwa jest bezpośrednia przemiana rozpuszczonej substancji organicznej w wódór. Całkowity proces biegnie w naczyniu elektrolitycznym, w którym utlenianie rozpuszczonej substancji organicznej i redukcja protonów są rozdzielone pomiędzy dwie komory. Rozdziela je membrana jonoselektywna (np. Nafion). Anoda i katoda są podłączone na zewnątrz do zasilacza elektrycznego. Gdy zasilacz przekazuje do katody elektrony płynące z anody z procesów utleniania, wówczas przez membranę przenika adekwatna ilość protonów do komory, w której znajduje się katoda. Tu następuje połączenie protonów z elektronami i w efekcie powstaje gazowy wódór.

Octan jest modelowym związkiem dla doświadczeń z biokatalizowaną elektrolizą, ponieważ nie może być bezpośrednio przekształcony w wodór na drodze ciemnej fermentacji:



Obliczenia termodynamiczne pokazują, że wyprodukowanie wodoru w warunkach standardowych z octanu wymaga wkładu energii 88,35 kJ/mol. Odpowiada to teoretycznej wartości napięcia rozkładowego octanu do wodoru wynoszącego tylko 0,11 V. Przy pH=7, odpowiada to potencjałom równowagowym utleniania octanu (1 mol/dm³) i redukcji protonu: odpowiednio -0,28 i -0,42 V (wzgl. NEW). W praktyce jednakże należy oczekwać, że konieczne będzie wyższe napięcie niż 0,11 V, aby taka reakcja biegła. Po pierwsze, elektrochemicznie aktywne mikroorganizmy zużywają część dostępnej energii dla podtrzymania życia i wzrostu. W konsekwencji uwalniają elektrony przy wyższych od równowagowych wartościach potencjałów. Po drugie, potrzebne napięcie jest podwyższane (nadpotencjał) przez rezystancję omową układu elektrochemicznego oraz przez inne przyczyny (polaryzacja stężeniowa lub aktywacyjna, również związane z procesem redukcji jonów wodorowych na katodzie). Tym niemniej istnieją doniesienia literaturowe o wydzielaniu wodoru już przy napięciu 0,2 V dla roztworów o pH 7. Dla porównania: wydzielenie wodoru na drodze zwykłej elektrolizy roztworów wodnych wymaga napięcia ponad 1,23 V. Zasadniczo rozpuszczone substancje organiczne w procesie elektrolizy z udziałem elektroaktywnych mikroorganizmów degradują się do ditlenku węgla i wodoru. Dlatego dla tego procesu proponuje się nazwę „biokatalizowana elektroliza” lub „elektrochemiczna produkcja wodoru wspomagana przez mikroorganizmy”.

Minimalne napięcie mikrobiologicznego wydzielania wodoru odpowiada zużyciu energii 0,26 kWh/Nm³ H₂. Przewiduje się, że w przyszłych komercyjnych realizacjach nie przekroczy on 1 kWh/Nm³ H₂. Dla porównania: abiotyczna elektroliza wody wymaga wkładu energii od 4,4 do 5,4 kWh/Nm³ H₂.

Laboratoryjne mikrobiologiczne ogniwa paliwowe i elektrolyczne zwykłe wyposażone są w katodę aktywowaną platyną, która sprawdziła się jako skuteczny katalizator w typowych ogniach paliwowych. Jednakże konwencjonalne ogniwa paliwowe i typowe elektrolizery pracują w zakresie gęstości prądowych (~10³ ÷ 10⁴ A/m²), które są o kilka rzędów wielkości wyższe od tych, w których pracują MOP lub biokatalityczne ogniwa elektrolyczne

Tabela 1

Reakcje elektrodowe oraz potencjały teoretyczne dla mikrobiologicznego ogniska paliwowego (MFC), biokatalizowanej elektrolizy (MEC) i elektrolizy wody w standardowych warunkach (298 K, pH = 7, pH2 = 1 bar) – octany zostały użyte jako modelowy donor elektronów

Proces	Reakcja anodowa/potencjał	Reakcja katodowa/potencjał	Różnica potencjałów (V)
Mikrobiologiczne ognisko elektrolityczne (biokatalizowana elektroliza)	$\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 9\text{H}^+ + 8e^-$ $E = -0,296 \text{ V}$	$2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{H}_2$ $E = -0,414 \text{ V}$	-0,118
Mikrobiologiczne ognisko paliwowe	$\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 9\text{H}^+ + 8e^-$ $E = -0,296 \text{ V}$	$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4e^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ $E = 0,806 \text{ V}$	1,102
Elektroliza wody	$2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4e^-$ $E = 0,82 \text{ V}$	$2\text{H}^+ + 2e^- \rightarrow \text{H}_2$ $E = -0,414 \text{ V}$	-1,23

(~1 ÷ 10 A/m²). Wskutek tego ilości wytwarzanej energii elektrycznej lub produkowanego wodoru (w przeliczeniu na jednostkę masy katalizatora Pt) w tych urządzeniach są zbyt niskie, aby użycie tak drogiego katalizatora jak platyna było uzasadnione ekonomicznie. To zachęciło naukowców do poszukiwania zastępczych katalizatorów reakcji katodowej w MOP i biokatalitycznych ogniwach elektrolitycznych. Mikrobiologiczne biokatody są bardzo obiecujące jako zamiennik platyny, gdyż mogą zawierać niedrogi materiał elektrodowy (np. grafit) i mają zdolność samoregeneracji (He 2006). Szereg interesujących pomysłów udało się dotąd z powodzeniem zastosować do katalizowania reakcji redukcji tlenu. Przykłady obejmują cykle redoksowe metali przejściowych (Mn, Fe) pomiędzy katodą i bakterią utleniającą metal (Rhoads i in. 2005; Heijne i in. 2007; Heijne i in. 2006) lub układy wykorzystujące mikroorganizmy zdolne do bezpośredniego przeniesienia elektronu do metalu elektrody (Bergel i in. 2005).

9.2. Metodologia badań

Konstrukcja ogniw mikrobiologicznych

Jednokomorowe ognisko mikrobiologiczne wykonano z poliwęglanu. Cylindryczna komora (średnica wewnętrzna 80 mm) o objętości całkowitej 0,7 dm³ zawiera anodę w kształcie szczotki wykonanej z włókien grafitowych uplecionych na drucie tytanowym, całkowita powierzchnia grafitu to 1,1 m². Gazową katodę dyfuzyjną, stanowiącą jednocześnie szczelne dla cieczy zamknięcie cylindra, wykonano z tkaniny węglowej impregnowanej politetrafluoroetylenem i aktywowanej materiałem katalitycznym. Brak przegrody jonoselektywnej

redukuje opór omowy układu oraz znacząco obniża koszt urządzenia. Elektroda gazowa nie styka się z powietrzem, lecz zamyka jednostronnie komorę do gromadzenia wodoru. Ogniwo wypełniono roztworem buforowym i podłączono do potencjostatu, który umożliwia kontrolę potencjału anody podczas wzrostu biofilmu po inokulacji. Przed pomiarami komorę ognia wysterylizowano 6% roztworem nadtlenku wodoru.

Ogniwo dwukomorowe wykonano z cylindrycznych komór (średnica wewnętrzna 100 mm) o objętości całkowitej 1,1 dm³, które zostały rozdzielone przegrodą kationoselektywną typu Nafion 117 o powierzchni 75 cm². W każdej komorze znajdowała się elektroda odniesienia Ag/AgCl do pomiaru potencjałów obu elektrod. Anoda w kształcie szczotki wykonana została z włókien grafitowych uplecionych na drucie tytanowym, całkowita powierzchnia grafitu wynosiła 1,1 m². Katodę wykonano z filcu grafitowego o powierzchni geometrycznej 0,005 m². Powierzchnię katody aktywowano platyną w stężeniu 0,5 mg Pt/cm². Obie elektrody zanurzono w odpowiednich roztworach i podłączono do potencjostatu, który umożliwia kontrolę potencjału anody podczas wzrostu biofilmu po inokulacji. Przed pomiarami, elektrolizer wysterylizowano 6% roztworem nadtlenku wodoru.

Katoda

Filc węglowy stanowiący matrycę katody w pierwszej kolejności został odtłuszczone w acetonie, a następnie poprzez wkręcenie w filc zainstalowano w nim drut tytanowy o średnicy 0,8 mm, pokryty pastą srebrową w miejscu styku z katodą. Drut umożliwiał mocowanie elektrody na króćcu oraz stanowił wyprowadzenie bieguna katody poza komorę katolitu. Następnie filc zainpregnowano obustronnie materiałem powłokotwórczym z politertrafluoroetylenu (2 cm³ PTFE + 1 cm³ H₂O), wysuszonym w dalszej kolejności w temperaturze 70°C w czasie 1 h. W kolejnym etapie naniesiona została warstwa aktywna powłoki zawierająca katalizator – platynę (350 mg Pt na nośniku węglowym, 2 cm³ PTFE, 1cm³ H₂O) w ilości 4,5 mgPt/cm² katody. Po operacji przygotowania powierzchni aktywnej mocowany był tytanowy drut o średnicy 0,8 mm wyprowadzający biegun katody poza komorę katolitu.

Anoda

Szczotka grafitowa pełniąca rolę anody oraz przyszłego nośnika biofilmu bakteryjnego została w pierwszym etapie poddana procesowi 3-krotnego odtłuszczania w acetonie celem pozbycia się wszelkich śladów tłuszczy i lakierów. Po tym etapie w celu aktywacji powierzchni węglowej szczotka przenoszona

była do zlewki z 40% HNO_3 oraz traktowana przez 1 h w temperaturze wrzenia. W wyniku reakcji powierzchni węglowej z silnym utleniaczem, jakim jest HNO_3 , na powierzchni włókien węglowych zostały wytworzone grupy hydrofilowe, takie jak: -COOH, -OH, =CO. Po wypłukaniu szczotki kilku-krotnie w wodzie destylowanej gotowa była do montażu.

Membrana

Wycięty z arkusza materiał membranowy Nafion 117 został przycięty na wymiar oraz umieszczony w szerokiej zlewce wypełnionej roztworem o składzie: 72 cm^3 30% H_2O_2 i 2 cm^3 96% H_2SO_4 oraz ogrzewany do wrzenia przez 1 h. W drugim etapie membrana przez godzinę podgrzewana była do wrzenia z 1 M roztworem H_2SO_4 , natomiast w trzecim etapie konsekwentnie z czystą wodą destylowaną. Po takim przygotowaniu membrana mogła zostać bezpośrednio zamontowana w bioelektrolizerze.

Przygotowanie roztworów

Komora anody została wypełniona autoklawowanym roztworem (pH 7) buforu fosforanowego o składzie (g/dm³):

KH_2PO_4	1,74
KHPO_4	1,38
NH_4Cl	0,54
NaCl	2,93
CaCl_2	0,15
MgCl_2	0,21

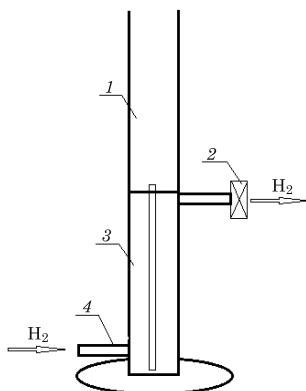
Ponadto do buforu dodano 10 cm^3 roztworu mineralnego Wolfe'a, o składzie (g/dm³):

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,00
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,50
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,10
CaCl_2	0,10
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{KAl(SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,01
H_3BO_3	0,01
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01
EDTA	0,50

Siła jonowa powstałego roztworu elektrolitu wynosi $0,096 \text{ mol}/\text{dm}^3$. Siła jonowa wpływa na rozwój biofilmu warunkując proces adhezji biofilmu. Wartość siły jonowej zbliżonej do wartości $0,1 \text{ mol}/\text{dm}^3$, sprzyja osiedlaniu się mikroorganizmów na powierzchni anody. Dozowanie paliwa organicznego odbywało się poprzez nastrzyknięcie określonej ilości roztworu do anolitu.

Gromadzenie wodoru

Do efektywnego gromadzenia wydzielającego się w trakcie bioelektrolizy wodoru wykorzystano cylindryczne naczynie wykonane według poniżej zamieszczonego schematycznego rysunku 2. Umożliwia ono zmierzenie objętości generowanego wodoru poprzez pomiar objętości wypartej cieczy (wodny roztwór gliceryny, $V_{\max} = 10 \text{ cm}^3$), która jednocześnie utrzymuje zamknięty wodór pod ciśnieniem. Wodór, napływając do dolnego zbiornika, wypiera ciecz poprzez kapilarę łączącą oba zbiorniki: górny na ciecz wypieraną oraz dolny na wodór, zajmując objętość dolnego zbiornika. Zebrany gaz uwolnić można poprzez otwarcie zaworu wylotowego. Wydzielający się gaz jest w 100% wodorem.



Rys. 2. Cylinder do gromadzenia wodoru

1 – zbiornik górny, 2 – zawór wylotowy wodoru, 3 – zbiornik dolny, 4 – wlot wodoru

Analiza zawartości całkowitego węgla organicznego (TOC)

TOC (ang. *total organic carbon*) jest metodą analizy pozwalającą na pomiar zawartości węgla organicznego w roztworach wodnych. Próbki do analizy pobierano z ogniw przed i po zakończeniu pomiarów elektrochemicznych. Taki tryb postępowania służy określeniu zmiany stężenia octanów w anolicie wskutek generowania energii elektrycznej lub wydzielania wodoru, co umożliwia obliczenie wydajności konwersji energii.

Próbkę do badań oddzielano od ciał stałych (w tym bakterii) za pomocą mikrofiltrów 0,2 µm. Następnie 1 cm³ próbki przenoszono do kolby miarowej o objętości 25 cm³, rozcieńczano ultraczystą wodą i poddawano analizie aparatem TOC *High Temperature TOC/TN6 Analyzer LiquiTOC elementar*. Dla każdej próbki pomiar TOC wykonywany był trzykrotnie celem ograniczenia błędu pomiaru.

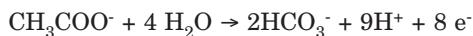
Warunki pracy mikrobiologicznego ogniwka elektrolitycznego

W trakcie pomiarów elektrochemicznych, gdy przykładowo zewnętrzne napięcie do układu, obie komory były ciągle nasycane gazowym azotem. Przykładowe napięcie wzrastało stopniowo od 0 do 0,75 V z szybkością 0,1 V/h. Tak powolna zmiana była spowodowana dążeniem do obniżenia prądów pojemnościowych (niefaradajowskich) do możliwie najniższego poziomu. Po zakończeniu każdego okresu polaryzacji potencjał anody powracał do 0 V na 4 h w celu ustalenia równowagi chemicznej i elektrochemicznej. Podczas polaryzacji komora katodowa pozostawała zamknięta, aby umożliwić gromadzenie i pomiar objętości wydzielanego wodoru. W trakcie pomiarów temperatura układu wynosiła 30°C. Próbki gazu analizowano za pomocą chromatografu gazowego. Całkowitą objętość wodoru mierzono za pomocą zbiornika zewnętrznego połączonego z komorą katodową (rys. 2).

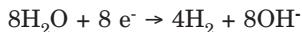
Zjawiska wpływające na zmiany pH w ogniwie

Zmiana pH w komorze bioelektrolizera następuje w czasie każdej elektrolizy, pomimo obecności buforu fosforanowego. Dla procesów trwających godzinę ta zmiana jest niemal niezauważalna i wynosi kilka setnych wartości pH, natomiast po pomiarach trwających 3 h i dłużej zmiany te przekraczają 0,1 jednostki pH. Z tego względu po przeprowadzeniu kilku procesów wydzielania wodoru wymagana jest korekta pH poprzez dozowanie określonych ilości roztworów HCl (obniżenie pH) lub odpowiednio NaOH (podniesienie pH) do pracujących roztworów anolitu i katolitu do prawidłowego zakresu pH = 6,5–7,0.

W miarę postępu elektrolizy w anolicie następuje spadek pH elektrolitu, zgodnie z przebiegiem reakcji utleniania paliwa:



W związku z niską efektywnością transferu protonów przez membranę ulegają one akumulacji w roztworze anolitu, natomiast w katolicie faktycznie redukcji ulegają cząsteczki wody. Roztwór katolitu ulega alkalizacji w związku z redukcją cząsteczek wody:

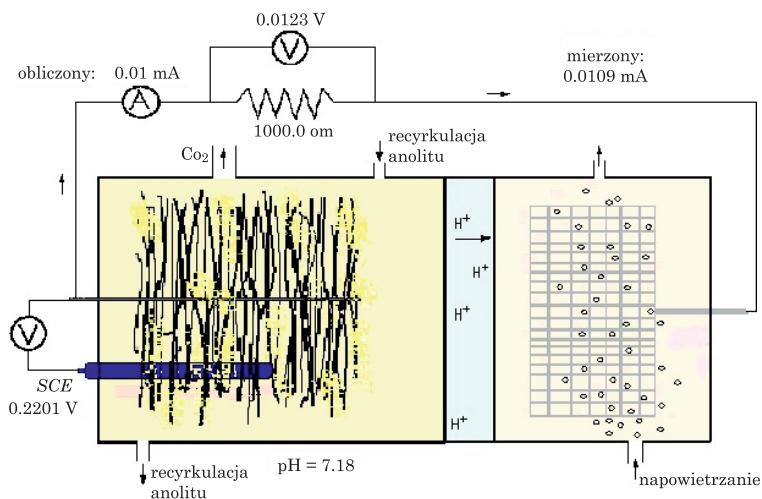


W miarę postępu procesu elektrolizy i utleniania octanów narastają straty energii układu spowodowane wzrostem nadpotencjału transportu masy. Ma miejsce akumulacja protonów w anolice, głównie w obszarze biofilmu, gdzie szybkość transportu octanów i produktów jego utleniania do i z powierzchni elektrody jest ograniczona (dyfuzja i mieszanie). Dodatkowo transfer protonów przez membranę charakteryzuje się niską efektywnością, co skutkuje narastaniem gradientu pH, a szczególnie szkodliwym zjawiskiem jest obniżanie się pH w biofilmie – powodujące inhibitowanie metabolizmu bakterii. Spodziewane jest zatem spowolnienie wydzielania wodoru w miarę trwania procesu bioelektrolizy dla procesów prowadzonych dłużej niż przez 2 h.

Po zakończeniu pomiaru wydzielania wodoru, układ powraca do pracy w trybie mikrobiologicznego ognia paliwowego poprzez ponowne załączenie ciągłego napowietrzania katody oraz przyłożenie zewnętrznego oporu.

Parametry pomiarów elektrochemicznych

Napięcie elektryczne (V) pomiędzy anodą i katodą, jak również pomiędzy anodą i elektrodą odniesienia (nasycona elektroda kalomelowa, SCE) mierzone za pomocą specjalnie zbudowanego systemu sterującego i pomiarowego (rys. 3).



Rys. 3. Ekran kontrolny pracy mikrobiologicznego ognia

Prąd (I) i moc (P) ogniw obliczano z pomiarów spadku napięcia na oporniku $R = 1\text{ k}\Omega$, stanowiącym stałe obciążenie elektryczne urządzenia, zgodnie z równaniami: $I = V/R$ oraz $P = V^2/R$.

Moc elektryczną ogniw oraz generowany prąd zostały znormalizowane względem powierzchni geometrycznej anody. Krzywe polaryzacyjne generowano poprzez zmianę obciążenia elektrycznego ogniska w przedziale od 10 do 100 kΩ.

Wydajność kulombowska (CE) została obliczona jako stosunek całkowitego ładunku przepływającego przez układ (całka prądu po czasie) do teoretycznej ilości ładunku generowanego przez paliwo, zakładając możliwość uzyskania 8 moli elektronów z 1 mola octanów.

Odzysk energii szacowano, dzieląc całkowity uzysk energii elektrycznej (całka mocy po czasie) przez entalpię spalania octanów.

Wydajność potencjałowa (PE) została obliczona z uśrednionego napięcia ogniska (całkowita energia dzielona przez zmierzony ładunek elektryczny) i z termodynamicznego potencjału ogniska (E) zgodnie z równaniem $PE = V/E$.

Wydajność konwersji energii (ECE) szacowano wyłącznie w oparciu o parametry elektryczne ogniw, tj. wydajności kulombowskiej i potencjałowej. CE reprezentuje tę część strumienia elektronów, którą bakterie przekierowują z paliwa do powierzchni anody, zaś PE jest skutecznym udziałem różnicy potencjałów pomiędzy paliwem i końcowym akceptorem elektronów (tlenem). Zatem ECE można obliczyć, mnożąc CE przez PE. ECE zostało także obliczone poprzez podzielenie całkowitej energii elektrycznej ($P \times \text{czas}$) przez teoretyczną entalpię swobodną ogniska ΔG .

Siła elektromotoryczna (SEM) ogniska została otrzymana z krzywych polaryzacyjnych poprzez ekstrapolację liniowej części wykresu do przecięcia z osią napięcia (prąd = 0).

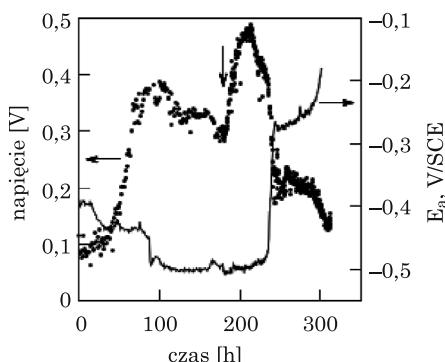
Opór wewnętrzny ogniska obliczono z zależności SEM/I.

9.3. Rozruch ogniska

Przed rozpoczęciem formowania biofilmu w komorze anody zapewnione zostały warunki anaerobowe. Następnie dokonano inokulacji bakterii poprzez znajdujący się na wlotowym przewodzie cyrkulacyjnym port karmienia w ilości 15 cm^3 inokulum. Inokulum pochodziło z osadu czynnego pobranego z oczyszczalni ścieków komunalnych „Dębogórze” wymieszanego z fermentowaną kapustą. Opór przepływu prądu w obwodzie pomiędzy elektrodami ustalono jako stały na poziomie 1 kΩ. Zgodnie z oczekiwaniem, po ok. 20 h inkubacji napięcie ogniska zaczęło powoli wzrastać. W tym czasie potencjał anody obniżył się z -0,33 V do -0,37 V. Gdy napięcie dalej rosło przez kolejne 25 h, potencjał anodowy pozostał bez zmian. Takie zachowanie tłumaczy się aktywnością bakterii w formie planktonu (przypuszczalnie za pośrednictwem mediatorów). Kiedy napięcie ogniska osiągnęło wartość maksymalną, potencjał anody znowu obniżała się skokowo do wartości -0,44 V. Świadczy to

o utworzeniu biofilmu, którego bakterie przejmują rolę transferu elektronów do powierzchni elektrody.

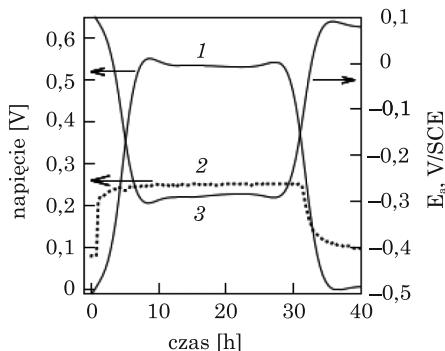
Przez następne godziny obserwowano powolny spadek napięcia wraz z niewielkimi fluktuacjami potencjału. Po 180 h, zanim pojawiły się widoczne objawy głodowania biofilmu, roztwór anolitu został zasilony 4 mg ekstraktu drożdżowego. Napięcie wówczas wzrosło, uzyskując bardzo szybko wartość maksymalną, po czym bez przechodzenia w obszar plateau równie szybko spadło. W tym samym czasie potencjał powoli wzrastał aż do momentu przejścia w fazę głodu biofilmu, kiedy to odnotowano dramatyczny wzrost potencjału.



Rys. 4. Początek pracy mikrobiologicznego ogniwka paliwowego z osadu ściekowego.
Strzałka pionowa oznacza moment dodania 4 mg ekstraktu drożdżowego

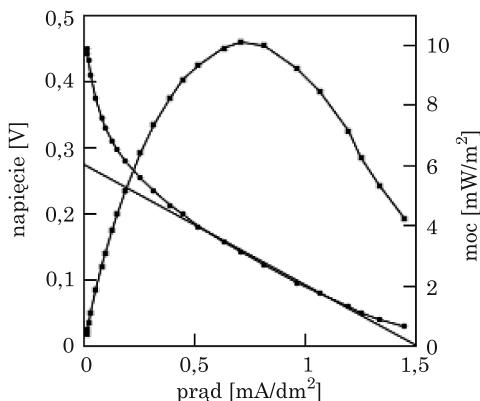
Dalsze rozbudowanie i wzmacnianie biofilmu przeprowadzono poprzez stymulowanie układu stałym napięciem elektrycznym. W tym celu wymieniony został roztwór buforu w anolicie, uzupełniono ubytek octanów oraz podłączono źródło stałego napięcia do ogniwka. Anodę polaryzowano potencjałem -0,1 V wzgl. SCE przez trzy dni, a następnie -0,4 V przez następne dwa dni. Po tym czasie przeprowadzono badania polaryzacyjne i stwierdzono, że prąd zwiększył się z 1,2 mA do 10 mA. W celu sprawdzenia, czy nastąpiło ustabilizowanie biofilmu, potencjał anody polaryzowano potencjałem -0,4 V przez kolejne trzy dni. Przez ten czas rejestrowany prąd (oraz potencjał przy stałym obciążeniu – rys. 5) nie wzrósł. Świadczy to o uzyskaniu przez biofilm optymalnej struktury i sprawności konwersji energii. W czasie okresu wzrostu biofilmu pH anolitu było regularnie sprawdzane i korygowane do 7, jeśli pojawiała się taka konieczność.

Charakterystyka przemiany energii chemicznej w elektryczność, zachodzącej w ogniwach mikrobiologicznych, została przeprowadzona poprzez pomiar ustalającego się (ok. 15 min) napięcia ogniwka wskutek zmiany (od bardzo wysokiego do prawie zerowego) zewnętrznego oporu elektrycznego pomiędzy elektrodami (rys. 6). Uzyskana zależność napięcia od prądu (krzywa polaryzacyjna) pokazuje początkowy bardzo silny spadek napięcia



Rys. 5. Wykres zależności napięcia (1), potencjału katody (2) i anody (3) od czasu uzyskanych z mikrobiologicznego ogniwka paliwowego z wykształconym biofilmem i zawierającym octany

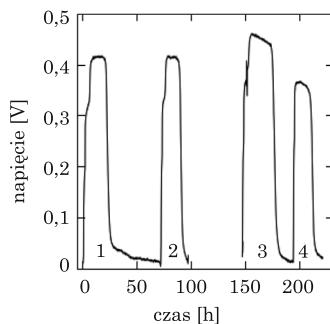
(zakres aktywacyjnej kontroli przeniesienia ładunku) wynoszący ok. 300 mV. Względnie wysoka aktywacyjna strata napięcia to skutek spowolnionego transferu ładunku do elektrody zarówno z biofilmu, jak i z bakterii występujących w postaci planktonu. Wpływ tych ostatnich na kształtowanie się napięcia w ogniwie wynika ze stosowania rozpuszczalnych mediatorów służących do przenoszenia ładunku pomiędzy błoną komórkową bakterii a powierzchnią grafitowej elektrody. W dalszej części wykresu polaryzacyjnego widoczne jest prawie liniowe obniżanie napięcia w zakresie prądu od 0,5 do 1,2 mA/dm². Ta część krzywej odzwierciedla omowy zakres kontroli pracy ogniwka. Odwzorowanie liniowe tego wycinka wykresu umożliwia wyznaczenie oporu wewnętrznego ogniwka wynoszącego ok. 360 Ω. Na tę wartość składają się m.in. przewodność elektryczna roztworów, a także opory elektryczne membrany i styków elektrod. Ognisko osiąga największą moc 10 mW/m² dla prądu 0,7 mA/dm² (400 Ω).



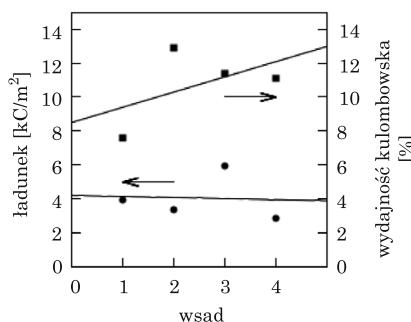
Rys. 6. Wykres krzywej polaryzacyjnej i zależność mocy ogniwka od generowanego prądu

Należy podkreślić, że moc mikrobiologicznych ogniw może różnić się znacząco między poszczególnymi rozwiązaniami, gdyż duży wpływ na nią mają: stężenie elektrolitu, dostępność węgla organicznego, reakcja katodowa, opór omowy układu, włączając w to membranę rozdzielającą anolit od katolitu, a także rodzaj materiału, z jakiego wykonana jest anoda oraz skład i struktura biofilmu.

We wszystkich opisywanych badaniach użyto octanów jako jedynego źródła elektronów i żaden inny, poza anodą, akceptor elektronów nie był dostępny dla bakterii. Na rysunku 7 przedstawiono zależność napięcia od czasu pracy ognia dla sekwencyjnego zasilania ognia 1 i 0,5 mM octanami. Napięcie zaczęło rosnąć niedługo po dodaniu paliwa, osiągając plateau po 2 h i utrzymywało wartość ok. 0,42 V przez następne 20 h. Niższe stężenie octanów generowało takie same napięcie, jak stężenie wyższe, chociaż w poprzednim wypadku czas trwania napięcia był znacznie krótszy. Napięcie ognia spadało gwałtownie, gdy stężenie octanu w roztworze się wyczerpywało. Uzupełnienie ubytku paliwa powodowało wznowienie transferu elektronów do anody i napięcie znowu rosło. Dane widoczne na rysunku zostały użyte do obliczenia parametrów elektrycznych ognia, takich jak ładunek, energia elektryczna, gęstość prądu, a także wydajność konwersji energii.



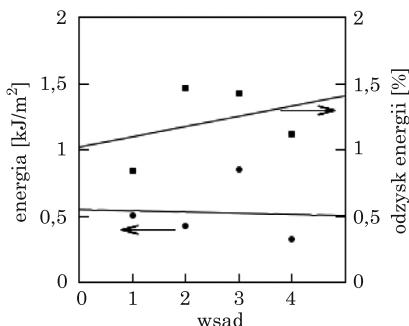
Rys. 7. Generowanie energii elektrycznej poprzez sekwencyjne zasilanie ognia octanami w stężeniach 1 i 0,5 mM



Rys. 8. Zależność ładunku i wydajności kulombowskiej dla mikrobiologicznego ognia paliwowego zasilanego sekwencyjnie 1 mM octanów

Rysunek 8 ilustruje zależność ładunku elektrycznego i wydajności kulombowskiej, uzyskanych w ogniwie sekwencyjnie zasilanym paliwem organicznym. Prąd szczególny o wartości 0,020 mA, który płynie w ogniwie przed dodaniem paliwa i po jego wyczerpaniu, jest skutkiem nagromadzenia paliwa w biofilmie. Całkowita wymiana anolitu nie umożliwia usunięcia tych „resztek” paliwa biofilmu, dlatego wartości przedstawione na wykresie uwzględniają niezerowy prąd szczególny. Występowanie prądu szczególnego obserwowano także w innych badaniach (Borole i in. 2009; Freguia i in. 2007). Całkowity ładunek generowany przez ogniwko po dodaniu octanów wynosił ok. 4 kC/m² i nie zmieniał się w czasie kolejnych doświadczeń. Ponieważ teoretyczny ładunek elektryczny zawarty w 1 mM octanów wynosi 262 C, to wydajność kulombowska oscylowała w granicach 8–12%. Uzyskane wyniki wskazują na dużą trwałość i powtarzalność pracy wytworzzonego biofilmu.

Uzysk i odzysk energii są względnie niewielkie i pozostają praktycznie niezmienne dla poszczególnych wsadów paliwa (rys. 9). Wytworzoną w ogniwie energia wyniosła ok. 0,5 kJ/m² lub 10–11 kJ/mol. Oszacowany odzysk energii chemicznej zawartej w paliwie wynosił 1–1,5%.



Rys. 9. Zależność energii i odzysku energii uzyskanych z mikrobiologicznego ogniwka paliwowego zasilanego sekwencyjnie 1 mM octanów

Degradacja złożonej materii organicznej, zwłaszcza bogatej w węglowodany, za pomocą fermentacji lub przemian elektrogennych w ogniwach mikrobiologicznych (paliwowych bądź elektrolitycznych) często prowadzi do powstania kwasu octowego jako produktu końcowego lub przejściowego, który w kolejnych etapach ulega dalszej konwersji do metanu, biowodoru lub elektryczności. Dlatego, obok glukozy, octany są prawdopodobnie najczęściej stosowanym pojedynczym źródłem węgla organicznego w badaniach nad mikrobiologicznymi ogniwami (Geelhoed i in. 2010). Elektrogenna przemiana energii chemicznej octanów (jak również każdej innej utlenianej substancji organicznej) może prowadzić do powstania elektryczności oraz całego szeregu zjawisk ubocznych – traktowanych w tym przypadku jako straty:

- 1) obecność śladowych ilości tlenu w anaerobowej części ogniska (wynikająca z przenikania tlenu do anolitu przez membranę jonoselektywną), chociaż nie wiemy definitywnie, czy tlen podtrzymuje bakterie tlenowe, które metabolizują „bezużytecznie” paliwo organiczne, czy też obniża sprawność działania elektrogennego biofilmu (zbiera elektrony z powierzchni elektrody w trakcie ich transferu z bakterii);
- 2) utrata paliwa spowodowana innymi procesami redoks, włączając powstawanie wodoru lub metanu (odpowiednie formy bakterii muszą być w układzie obecne), powiązana z jednoczesną redukcją siarczanów do siarczków;
- 3) paliwo wykorzystywane do wzrostu biomasy (metabolizm asymilacyjny);
- 4) część energii tracona w formie nieodwracalnej wymiany ciepła, która towarzyszy zarówno przemianom metabolicznym, jak i przepływowi strumienia elektronów.

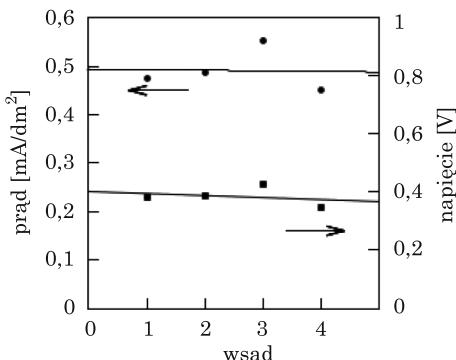
Energia wiązań uwolniona podczas reakcji utleniania jest przekazywana do produktów finalnych (CO_2) i do nośników energii, czyli protonów i elektronów. Istotą oddychania komórkowego jest synteza ATP powiązana z transportem protonów w poprzek membrany komórkowej. Postuluje się, że na utworzenie 1 mola ATP wymagany jest transfer 3 moli H^+ i utrata ciepła w ilości 20 kJ/mol (Schink i in. 1997). W przypadku utleniania octanów, które skutkuje powstaniem 9 moli protonów, przybliżona wielkość strat ciepła wynosi 60 kJ/mol, tj. ok. 27% całkowitej energii przenoszonej przez elektrony i protony (potencjał redoks pary $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{HCO}_3^-$, H^+ wynosi -0,288 V, co odpowiada $\Delta G = +222,3 \text{ kJ/mol}$).

Ponadto octany są prawdopodobnie wykorzystywane do wzrostu biomasy bakterii, w postaci kwasu beta-hydroksymasłowego, zgodnie z reakcją:



Octany są wykorzystywane przez bakterie do pozyskiwania energii (metabolizm dysymilacyjny) poprzez jego utlenianie w cyklu cytrynowym. Potencjał redoks tej reakcji (w warunkach panujących w ustroju żywych bakterii: $\text{pH} = 7$, $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 1 \text{ mM}$ i $[\text{HCO}_3^-] = 5 \text{ mM}$) wynosi -0,288 V. Tlen jako zewnętrzny akceptor elektronów w ogniskach zapewnia bakteriom najwyższy możliwy uzysk energii (najefektywniejszą produkcję ATP), jednakże redukcja tlenu na elektrodach stałych (metale, tlenki metali, grafit, grafen, nanoruki węglowe) przebiega z bardzo wysokim nadpotencjałem (dodatkowa energia będąca różnicą pomiędzy rzeczywistym potencjałem przebiegu reakcji a potencjałem równowagowym wynikającym z zależności termodynamicznych). Nadpotencjał redukcji tlenu wynika z silnej adsorpcji tlenu i hydroksytlenków na powierzchni elektrody. Energia związana ze zjawiskiem nadnapięcia nie jest dostępna dla bakterii. Możemy więc mówić o stracie energii, która wpływa na wszystkie parametry pracy mikrobiologicznych ognisk, zwłaszcza

generowanego napięcia i mocy (rys. 10). Nadnapięcie wydzielania tlenu jest zmienne w zależności od rodzaju użytego materiału elektrodowego (katody). W przypadku platyny i żelaza wynosi odpowiednio 110 i 250 mV.



Rys. 10. Zależność gęstości prądu i napięcia uzyskanych z mikrobiologicznego ogniska paliwowego zasilanego sekwencyjnie 1 mM octanów

9.4. Bioelektrolityczne wydzielanie wodoru

Wielkością obrazującą sprawność pracy bioelektrolizera jest objętościowa wydajność wydzielania wodoru, normalizowana na objętość anolitu (m^3) i czas trwania elektrolizy (doby). Na wyniki bioelektrolizy, obok czynników abiotycznych, takich jak przewodność elektryczna roztworów, transport masy przez elektrolit i membranę jonoselektywną, pH wpływ mają zjawiska występujące w biofilmie, a w szczególności:

- 1) biofilm tworzą mieszane kultury bakterii stąd możliwość pojawiения się alternatywnego metabolizmu – metanogenezy, w związku ze wzrostem ilości bakterii metanogennych w roztworze (wzrost w miarę upływu czasu pracy ogniska) zmniejsza się dostępność paliwa dla biofilmu;
- 2) długi okres pracy anolitu (10 dni od wymiany anolitu) przyczynia się do narastania stężenia protonów oraz innych metabolitów w biofilmie, hamując w ten sposób aktywność metaboliczną bakterii aktywnych bioelektrochemicznie;
- 3) okresowa wymiana roztworu anolitu ma na celu wypłukanie z biofilmu nagromadzonych produktów przemian metabolicznych bakterii, usunięcie zawieszonych w roztworze bakterii metanogennych oraz odświeżenie buforu fosforanowego – czynność ta spowodowała zauważalny wzrost wydajności wydzielania wodoru w kolejnych procesach bioelektrolizy.

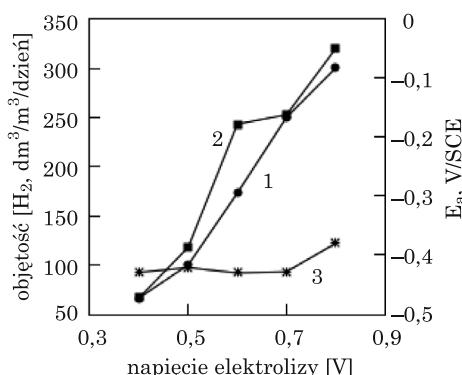
W tabeli 2 i na rysunku 11 przedstawione zostały wydajności objętościowe wydzielania wodoru średnie oraz maksymalne dla poszczególnych napięć bioelektrolizy. Przebieg linii wykresu wskazuje na niemal propor-

cjonalny wzrost wydzielania wodoru ze wzrostem napięcia bioelektrolizy. Największa wydajność $Q_{\text{obj}} = 320 \text{ dm}^3$ została zarejestrowana dla napięcia 0,8 V.

Tabela 2

Maksymalne oraz średnie wydajności wydzielania wodoru Q_{obj}

U (V)	Q_{obj} (dm^3)	$Q_{\text{obj}} \text{ max}$ (dm^3)
0,4	66,5	66,8
0,5	100,0	118,0
0,6	173,1	243,2
0,7	250,1	252,8
0,8	300,3	320,0

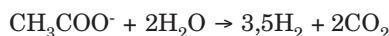


Rys. 11. Średnia (1) oraz maksymalna (2) objętościowa wydajność wydzielania wodoru oraz potencjał anody (3) w zależności od napięcia elektrolizy

Na rysunku 11 widoczne są zmiany potencjału anody w zależności od napięcia bioelektrolizy dla poszczególnych maksymalnych wydajności Q_{obj} . Jak widać, dla napięcia elektrolizy $U = 0,8 \text{ V}$ potencjał anody raptownie wzrasta, w porównaniu z napięciem $U = 0,7 \text{ V}$ następuje wzrost wartości od $-0,428$ do $-0,38 \text{ V}$. Podana zmiana potencjału anody wynikać może z wystąpienia nadpotencjału stężeniowego. Dla wartości $0,8 \text{ V}$ prąd bioelektrolizy jest największy. W związku z tym szybkość wydzielania wodoru oraz utleniania paliwa jest większa w porównaniu z niższymi napięciami prowadzenia procesu. Powoduje to niedostatecznie szybką migrację paliwa do biofilmu. Czynnikiem ograniczającym jest zatem zjawisko niedostatecznego dostępu paliwa dla bakterii, które hamuje jego aktywność bioelektrochemiczną.

9.5. Stopień konwersji paliwa do wodoru

Stopień konwersji paliwa do wodoru jest dla procesów biokatalizowanej elektrolizy znaczącym parametrem decydującym o jego sprawności przetwarzania biomasy do wodoru. Przy zastosowaniu octanów jako paliwa możliwe jest uzyskanie teoretycznie 3,5 moli wodoru na mol utlenionego octanu, zgodnie z reakcją:



Maksymalny stopień konwersji uzyskany w badaniach wyniósł 3,3 mol wodoru na mol paliwa podczas napięcia bioelektrolizy równego 0,5 V. Rezultaty dla poszczególnych napięć prezentuje tabela 3.

Tabela 3
Stopień konwersji octanów do wodoru w zależności od napięcia elektrolizy

U (V)	$W_{\text{H}_2/\text{OCT}}$ (mol/mol)
0,4	1,0
0,5	3,3
0,6	1,5
0,7	0,4
0,8	0,6

9.6. Wydajność kulombowska

Maksymalna wartość wydajności kulombowskiej uzyskanej w procesie to 54,7% dla napięcia bioelektrolizy 0,5 V. Najwyższe wartości, nieco ponad 1%, zostały uzyskane dla największych napięć, co sugeruje, że udział energii pochodzącej z octanów zmniejsza się wraz ze wzrostem napięcia >0,5 V, a rośnie udział energii elektrycznej dostarczanej z zewnętrznego źródła napięcia. Uśrednione wyniki dla każdej wartości napięcia przedstawia tabela 4.

Tabela 4
Wartości wydajności kulombowskiej dla poszczególnych napięć

U (V)	Wc (%)
0,4	11,5
0,5	12,0
0,6	3,9
0,7	1,2
0,8	1,9

Wydajności kulombowskie uzyskane w wyniku procesu wahają się w granicach 1,2–12,0%.

Na tak niską wydajność kulombowską wpływ mogło mieć wystąpienie alternatywnego metabolizmu, tj. metanogenezy, bądź procesu metabolizmu aerobowego związanego z przedostawaniem się tlenu do anolitu, będących przyczyną strat paliwa.

9.7. Wydajności energetyczne

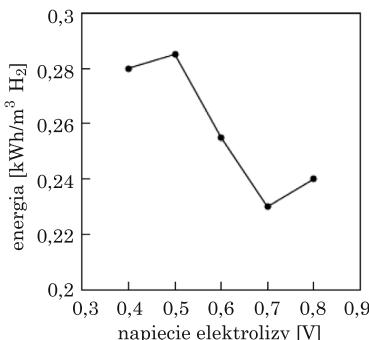
Całkowitą wydajność energetyczną uwzględniającą energię dostarczoną z zasilacza oraz octanów przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5

Całkowite wydajności energetyczne procesu bioelektrolizy dla poszczególnych napięć

U (V)	η_c (%)
0,4	30,8
0,5	34,3
0,6	28,5
0,7	11,4
0,8	18,2

Całkowita wydajność energetyczna, a więc stopień wykorzystania energii z zewnętrznego źródła oraz substratów η_c dla układu waha się w granicach 11,4–34,8%. Najwyższą wydajność energetyczną uzyskano dla napięcia bioelektrolizy wynoszącego 0,5 V. Zwiększenie napięcia bioelektrolizy powoduje obniżenie wydajności energetycznej, podobnie jak wydajności kulombowskiej (tab. 4). Może być to spowodowane wzrostem udziału nadnapięć związanych z transportem masy do i z elektrod (procesy biegnące na elektrodach zależą m.in. od szybkości dostarczania substratów do ich powierzchni, zaś w przypadku wyższych napięć, a więc i prądów, wymiana masy następuje szybciej, co może powodować niedostatecznie szybkie dostarczanie reagentów do elektrod). Ponadto należy zwrócić uwagę na fakt, iż proces bioelektrolizy dla napięć o najwyższych wydajnościach energetycznych oraz wydajności kulombowskiej prowadzony był średnio w czasie dłuższym (ok. 3 h) niż dla napięć wyższych (1 h). Stąd wydajność energetyczna i kulombowska zależy od czasu trwania elektrolizy i to na korzyść procesów prowadzonych dłużej – ok. 3 h. Nakład energetyczny wytwarzania 1 m³ wodoru w procesie bioelektrolizy w zależności od zastosowanego napięcia zilustrowano na rysunku 12.



Rys. 12. Średni nakład energetyczny w przeliczeniu na 1 m³ wydzielonego wodoru w zależności od napięcia bioelektrolizy

Z analizy otrzymanych wyników pod kątem nakładów energetycznych płynie wniosek, iż koszt wytworzenia wodoru metodą biokatalizowanej elektrolizy, w porównaniu z nakładami energii w procesie konwencjonalnej elektrolizy, jest znacznie niższy. W zakresie przykładanej z sieci energii elektrycznej do bioelektrolizera nakład energetyczny oscyluje w granicach 0,22–0,28 kWh/m³H₂. Konwencjonalny proces elektrolizy przemysłowej pochłania natomiast ok. 4,5–5,0 kWh/m³H₂. Poniesione koszty energii elektrycznej do produkcji wodoru w wyniku procesu bioelektrolizy wynoszą ok. 0,07 zł za 1 m³ wodoru, natomiast w przeliczeniu na 1 kg wodoru – ok. 0,8 zł (stawka za 1 kWh wg taryfy polskiego dostawcy energii to 0,28 zł). Biorąc pod uwagę wartość opałową wodoru, czyli 3,0–3,54 kWh/m³H₂, odnotowujemy zysk energetyczny wynikający z faktu, iż wartość energetyczna otrzymanego wodoru jest większa niż wkład energii elektrycznej (poniesiony w ilości 0,22–0,28 kWh/m³H₂). Zysk energetyczny powstały w wyniku procesu wydzielania wodoru metodą bioelektrolizy wynosi ponad 1000%. Uzyskujemy zatem ponad 10-krotnie więcej energii w postaci wydzielonego wodoru w stosunku do nakładu energii elektrycznej.

Tabela 6
Porównanie kosztów produkcji wodoru*

Nakład energetyczny		Koszt energii		Energia wydzielonego wodoru	Zysk energetyczny
MOE	elektroliza	MOE	elektroliza		
0,25 kWh	4,8 kWh	0,07 zł	1,34 zł	3,3 kWh	1300 %

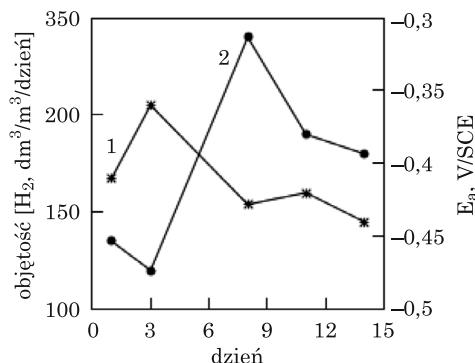
* szacunkowe obliczenia dotyczą 1 m³ H₂

MOE – mikrobiologiczne ognivo elektrolityczne (biokatalizowana elektroliza)

9.8. Praca biofilmu

Praca bioelektrolizera charakteryzowała się nieregularnością przeprowadzania procesów bioelektrolizy (odstęp czasowy pomiędzy pomiarami), których czas prowadzenia nie przekraczał zwykle 3 h. Układ pracował zatem jako mikrobiologiczne ogniwo paliwowe generujące prąd elektryczny, natomiast na czas procesu bioelektrolizy, zwykle dwóch procesów w ciągu dnia, układ zasilany był dodatkową energią pochodzącą z zasilacza. Dostarczana energia umożliwiała wydzielanie wodoru, oddziałując w sposób znaczący na potencjał bioanody. W trakcie trwania bioelektrolizy potencjał bioanody wzrastał.

Praca biofilmu zależy od zakresu wartości pH oraz stężenia paliwa w anolicie. Udowodniono, iż pH o wartości niższej od optymalnego zakresu 6,5–7,0 powoduje wzrost potencjału anody wraz ze zmniejszeniem wydajności wydzielania wodoru. Nieuniknione gromadzenie się protonów w biofilmie wywołuje osłabienie czynności metabolicznych bakterii, prowadząc do obniżenia wydajności układu. Obserwujemy wówczas wzrost potencjału anody w wyniku osłabienia przekazywania elektronów z bioanody na elektrodę. Wraz ze spadkiem stężenia paliwa potencjał anody rośnie, obniżając wydajność wydzielania wodoru.



Rys. 13. Potencjał anody (1) oraz wydajność wydzielania wodoru (2) w kolejnych dniach pracy biofilmu dla napięcia elektrolizy 0,6 V

Przebieg krzywych na rysunku 13 jest zróżnicowany. Po procesie bioelektrolizy w pierwszym dniu zaobserwowano spadek wydajności wydzielania wodoru w dniu następnym. Spowodowane to było obniżeniem stężenia paliwa w anolicie. Zgodnie z przewidywaniami, potencjał anody rośnie w odpowiedzi na mniejszą dostępność paliwa dla mikroorganizmów. W 8 dniu odnotowano dwukrotną poprawę wydajności wydzielania wodoru. Tego dnia tuż przed procesem bioelektrolizy wymieniony został roztwór anolitu, dodane

paliwo oraz regulacja wartości pH do 7. Trzy dni później, w miarę wyczerpywania się dostępnego paliwa, uzyskana wydajność była mniejsza. Po upływie kolejnych trzech dni, w czasie których przeprowadzono procesy bioelektrolizy dla innych napięć, wydajność również była obniżona (6 dni po wymianie anolitu) na skutek niskiego stężenia paliwa oraz stopniowego nagromadzania się na biofilmie produktów metabolizmu bakterii, głównie protonów.

9.9. Degradacja biofilmu

Istnieje przypuszczenie, że biofilm może ulegać degradacji na skutek polaryzacji zewnętrznym źródłem zasilania. W przemyśle zastosowanie mają techniki elektrolizy mające na celu, jako alternatywy dla chemicznych środków, kontrolowaną degradację biofilmu w aspekcie technologii zabezpieczenia przeciwporostowego mikroorganizmów na wszelkiego rodzaju przemysłowych rurociągach pompujących surową wodę (np. morską lub rzeczną do wykorzystania w procesach wymiany ciepła). Stwierdzono, iż przykładanie napięcia rzędu 1 V wraz z prądem w zakresie 50–100 mA/m² powoduje skutecną degradację rzędu 80% zaniku biofilmu w okresie badania.

Badania wykazały, iż przykładowe napięcie o wartości poniżej 2 V nie wpływa na wydajność pracy biofilmu, natomiast zastosowanie napięć większych niż 3 V skutkuje minimum 15-godzinną fazą regeneracji biofilmu (osiagnięcie napięcia pracy sprzed bioelektrolizy). Napięcie rzędu 9 V wywołuje 60-godzinną fazę regeneracji, a więc bardzo poważne uszkodzenia biofilmu. Wówczas okres ten stanowi czas rozwoju nowych kolonii bakteryjnych zawieszonych w anolicie.

Warunki prowadzenia bioelektrolizy w niniejszych badaniach charakteryzowały się maksymalną gęstością prądu rzędu 2,3 mA/m² oraz napięciem nie przekraczającym 0,8 V. Stąd wszelkie domniemania odnośnie uszkodzeń biofilmu, które pojawiają się na skutek obserwacji wzrostu potencjału anody bądź obniżenia wydajności wydzielania wodoru, tłumaczone są głównie takimi czynnikami, jak niedobór paliwa bądź zmianami pH. Wystąpienie uszkodzenia biofilmu sugerowałoby znaczące obniżenie wydajności wydzielania wodoru w kolejnym procesie bioelektrolizy (prowadziowych często w odstępach kilkugodzinnych). Tego typu korelacji jednak nie stwierdzono.

9.10. Podsumowanie

W celu zbadania możliwości wydzielania wodoru z materii organicznej z zastosowaniem bakterii aktywnych elektrochemicznie jako katalizatora oraz paliwa organicznego skonstruowany został bioelektrolizer oraz zbudowane stanowisko badawcze. Nakłady energetyczne ponoszone poprzez dostarczanie

energii z zasilacza do bioelektrolizera okazały się znaczco niższe niż nakłady energetyczne ponoszone w konwencjonalnej elektrolizie w przeliczeniu na wydzielony 1 m³ wodoru. Stanowi to o wartości procesu bioelektrolizy ze względów ekonomicznych.

Wyniki uzyskiwane na bazie octanów jako paliwa pokazują, iż możliwe jest uzyskiwanie biowodoru z dobrą wydajnością przy kilkukrotnie niższych nakładach energii elektrycznej niż w przemysłowej elektrolizie. Jednocześnie z wydzielaniem wodoru redukcji ulegała zawartość węgla organicznego na skutek aktywności biokatalitycznej bakterii na biofilmie anody. Mamy więc do czynienia z systemem, który w efektywny sposób wykorzystuje aktywne elektrochemicznie bakterie do produkcji wodoru oraz redukcji zawartości materii organicznej odpadów ściekowych (zastosowany został modelowy odpad ściekowy/pofermentacyjny, jakim jest octan).

Objętościowa wydajność wydzielania wodoru uzyskana została na poziomie 320 dm³ wodoru na 1 m³ anolitu w przeliczeniu na dobę dla napięcia 0,8 V, natomiast stopień konwersji energii (wydajności kulombowskiej) osiągnął maksymalnie 54,7% dla napięcia 0,5 V. Całkowita wydajność energetyczna, a zatem uwzględniająca wkład energii elektrycznej oraz zawartości energii paliwa (na podstawie energii spalania octanów) osiągnęła 60,9% dla napięcia bioelektrolizy równego 0,5 V. Wyniki te są bardzo obiecujące.

Stopień konwersji paliwa do wodoru waha się w granicach 0,4–3,3 mola wodoru na 1 mol octanu. Są to wielkości świadczące o stosunkowo dużej efektywności konwersji zaprojektowanego bioelektrolizera. Wadą konstrukcji pozostaje duży opór wewnętrzny układu na poziomie 240 Ω, który znaczco wpływa na obniżenie wydajności układu.

Ostatecznie nakład energetyczny obliczony został na poziomie 0,22–0,28 kWh na 1 m³ wodoru, co stanowi ok. 20-krotnie tańsze źródło wodoru niż przemysłowa elektroliza. Istnieje jednak jeden warunek, aby technologie biokatalizowanej elektrolizy uznać za przyjazną środowisku zrównoważoną metodę wydzielania wodoru – energia elektryczna przykładana do układu powinna pochodzić wyłącznie ze źródeł odnawialnych.

Literatura

- Angenent L.T., Karim K., Al-Dahhan M.H., Wrenn B.A., Domiguez-Espinosa R. 2004. *Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater*. Trends in Biotechnology, 22: 477–485.
- Bergel A., Feron D., Mollica A. 2005. *Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm*. Electrochim. Commun., 7: 900–904.
- Bond D.R., Lovley D.R. 2003. *Electricity production by Geobacter sulfurreducens attached to electrodes*. Appl. Environ. Microbiol., 69: 1548–1555.
- Borole A.P., Hamilton C.Y., Vishnivetskaya T., Leak D., Andras C. 2009. *Improving power production in acetate-fed microbial fuel cells via enrichment of exoelectrogenic organisms in flow-through systems*. Biochem. Eng. J., 48: 71–80.

- Bullen R.A., Arnot T.C., Lakeman J.B., Walsh F.C. 2006. *Biofuel cells and their development.* Biosens. Bioelectron., 21: 2015–2045.
- Chaudhuri S.K., Lovley D.R. 2003. *Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells.* Nat. Biotechnol., 21: 1229–1232.
- Cheng S., Liu H., Logan B.E. 2006. *Power densities using different cathode catalysts (Pt and CoTMPP) and polymer binders (Nafion and PTFE) in single chamber microbial fuel cells.* Environ. Sci. Technol., 40: 364–369.
- Choi Y.J., Song J.-Y., Jung S.-H., Kim S.-H. 2001. *Optimization of the performance of microbial fuel cells containing alkalophilic *Bacillus* sp.* J. Microbiol. Biotechnol., 11: 863–869.
- Clauwaert P., Rabaeij K., Aelterman P., Schampheleire L.D., Pham T.H., Boeckx P., Boon N., Verstraete W. 2007. *Biological denitrification in microbial fuel cells.* Environ. Sci. Technol., 41: 3354–3360.
- Debabov V.G. 2008. *Electricity from microorganisms.* Microbiology, 77: 123–131.
- Du Z., Li H., Gu T. 2007. *A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy.* Biotechnology Advances, 25: 464–482.
- Fan Y., Sharbrough E., Liu H. 2008. *Quantification of the internal resistance distribution of microbial fuel cells.* Environ. Sci. Technol., 42: 8101–8107.
- Freguia S., Rabaeij K., Yuan Z., Keller J. 2007. *Electron and carbon balances in microbial fuel cells reveal temporary bacterial storage behavior during electricity generation.* Environ. Sci. Technol., 41: 2915–2921.
- Friedheim E.A.H. 1931. *Pyocyanine, an accessory respiratory pigment.* J. Exp. Med., 54: 197.
- Geelhoed J.S., Hamelers H.V.M., Stams A.J.M. 2010. *Electricity-mediated biological hydrogen production.* Current Opinion in Microbiology, 13: 307–315.
- Gil G.C., Chang I. S., Kim B. H., Kim M., Jang J. K., Park H. S., Kim H. J. 2003. *Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell.* Biosens. Bioelectron., 18: 327–334.
- Gorby Y.A., Yanina S., McLean J.S., Rosso K.M., Moyles D., Beveridge T.J., Chang I.S., Kim B.H., Kim K.S., Culley D.E., Reed S.B., Romine M.F., Saffarin D.A., Hill E.A., Shi L., Elias D.A., Kennedy D.W., Pinchuk G., Watanabe K., Ishii S., Logan B., Nealson K.H., Fredrickson J.K. 2006. *Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* Strain MR-1 and other microorganisms.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 103: 11358–11363.
- Hallenbeck P.C., Benemann J.R. 2002. *Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes.* International Journal of Hydrogen Energy, 27: 1185–1193.
- Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes D.L., Hussy I. 2002. *Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation.* International Journal of Hydrogen Energy, 27: 1339–1347.
- He Z., Angenent L.T. 2006. *Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells.* Electroanalysis, 18: 2009–2015.
- Heijne A.T., Hamelers H.V.M., Buisman C.J.N. 2007. *Microbial fuel cell operation with continuous biological ferrous ironoxidation of the catholyte.* Environ. Sci. Technol., 41: 4130–4034.
- Heijne A.T., Hamelers H.V.M., Wilde V.D., Rozendal R.A., Buisman C.J.N. 2006. *A bipolar membrane combined with ferric iron reduction as an efficient cathode system in microbial fuel cells.* Environ. Sci. Technol., 40: 5200–5205.
- Holmes D.E., Bond D.R., Lovley D.R. 2004. *Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes.* Appl. Environ. Microbiol., 70: 1234–1237.
- Jang J.K., Pham T.H., Chang I.S., Kang K.H., Moon H., Cho K.S., Kim B.H. 2004. *Construction and operation of a novel mediator- and membrane-less microbial fuel cell.* Process Biochem., 39: 1007–1012.
- Jia Y.H., Tran H.-T., Kim D.-H., Oh S.-J., Park D.-H., Zhang R.-H., Ahn D.-H. 2008. *Simultaneous organics removal and bio-electrochemical denitrification using a microbial fuel.* Bio-process Biosyst. Eng., 31: 315–321.

- Kim B.H., Chang I.S., Gil1 G.C., Park H.S., Kim H.J. 2003. *Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell*. Biotechnol. Lett., 25: 541–545.
- Kim B.H., Kim H.J., Hyun M.S., Park D.H. 1999. *Direct electrode reaction of Fe(III) reducing bacterium Shewanella putrefaciens*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 9: 127–131.
- Kim G.T., Hyun M.S., Chang I.S., Kim H.J., Park H.S., Kim B.H., Kim S.D., Wimpenny J.W.T., Weightman A.J. 2005. *Dissimilatory Fe(III) reduction by an electrochemically active lactic acid bacterium phylogenetically related to Enterococcus gallinarum isolated from submerged soil*. J. Appl. Microbiol., 99: 978–987.
- Kim H.J., Park H.S., Hyun M.S., Chang I.S., Kim M.A., Kim B.H. 2002. *A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, Shewanella putrefaciens*. Enzyme Microbiol. Technol., 30: 145–152.
- Kim I.S., Hwang M.H., Jang N.J., Hyun S.H., Lee S.T. 2004. *Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process*. International Journal of Hydrogen Energy, 29: 1133–1140.
- Kim N., Choi Y., Jung S., Kim S. 2000. *Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing Proteus vulgaris*. Biotechnol. Bioeng., 70: 109–114.
- Lieder M., Zgłoszenie patentowe.
- Liu H., Cheng S., Logan B.E. 2005. *Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration*. Environmental Science & Technology, 39: 5488–5493.
- Liu H., Grot S., Logan B.E. 2005. *Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate*. Environ. Sci. Technol., 39: 4317–4020.
- Liu H., Logan B.E. 2004. *Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane*. Environ. Sci. Technol., 38: 4040–4046.
- Liu H., Ramnarayanan R., Logan B.E. 2004. *Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell*. Environ. Sci. Technol., 38: 2281–2285.
- Newman D.K., Kolter R. 2000. *A role for excreted quinones in extracellular electron transfer*. Nature, 405: 94–97.
- Logan B.E., Hamelers B., Rozendal R., Schroeder U., Keller J., Freguia S., Aelterman P., Verstraete W., Rabaey K. 2006. *Microbial fuel cells: methodology and technology*. Environ. Sci. Technol., 40: 5181–5192.
- Lorenzo M.D., Curtis T.P., Head I.M., Scott K. 2009. *A single-chamber microbial fuel cell as a biosensor for wastewaters*. Water Res., 43: 3145–3154.
- Niessen J., Schröder U., Scholz F. 2004. *Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation – a bacterial fuel cell operating on starch*. Electrochemistry Communications, 6: 955–958.
- Oh S., Min B., Logan B.E. 2004. *Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells*. Environ. Sci. Technol., 38: 4900–4904.
- Oh Y.K., Seol E.H., Kim M.S., Park S. 2004. *Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium Rhodopseudomonas palustris P4*. International Journal of Hydrogen Energy, 29: 1115–1121.
- Palmore G.T.R., Kim H.H. 1999. *Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell*. J. Electroanal. Chem., 464: 110–117.
- Park D.H., Zeikus J.G. 2000. *Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore*. Appl. Environ. Microbiol., 66: 1292–1297.
- Park D.H., Zeikus J.G. 2002. *Impact of electrode composition on electricity generation in a single-compartment fuel cell using Shewanella putrefaciens*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 59: 58–61.
- Park H.S., Kim B.H., Kim H.S., Kim H.J., Kim G.T., Kim M., Chang I.S., Park Y.K., Chang H. I. 2001. *A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to Clostridium butyricum isolated from a microbial fuel cell*. Anaerobe, 7: 297–306.

- Pham C.A., Jung S.J., Phung N.T., Lee J., Chang I.S., Kim B.H., Yi H., Chun J. 2003. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. FEMS Microbiology Letters, 223: 129–134.
- Pham T.H., Aelterman P., Verstraete W. 2009. Bioanode performance in bioelectrochemical systems: recent improvements and prospects. Trends in Biotechnology, 27: 168–178.
- Rabaey K., Boon N., Siciliano S.D., Verhaege M., Verstraete W. 2004. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. Appl. Environ. Microbiol., 70: 5373–5382.
- Rabaey K., Clauwaert P., Aelterman P., Verstraete W. 2005. Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation. Environ. Sci. Technol., 39: 8077–8082.
- Rabaey K., Lissens G., Siciliano S.D., Verstraete W. 2003. A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. Biotechnology Letters, 25: 1531–1535.
- Rabaey K., Rodriguez J., Blackall L. L., Keller J., Gross P., Batstone D., Verstraete W., Nealon K.H. 2007. Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. ISME J., 1: 9–18.
- Rabaey K., Verstraete W. 2005. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. Trends in Biotechnology, 23: 291–298.
- Reguera G., McCarthy K.D., Mehta T., Nicoll J.S., Tuominen M.T., Lovley D.R. 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. Nature, 435: 1098–1101.
- Rhoads A., Beyenal H., Lewandowski Z. 2005. A microbial fuel cell using anaerobic respiration as an anodic reaction and biomineralized manganese as a cathodic reactant. Environ. Sci. Technol., 39: 4666–4671.
- Rismani-Yazdi H., Carver S.M., Christy A.D., Tuovinen O.H. 2008. Cathodic limitations in microbial fuel cells: An overview. J. Power Sources, 180: 683–694.
- Rozendal R. A., Hamelers H.V.M., Euverink G.J.W., Metz S.J., Buisman C.J.N. 2006. Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. Int. J. Hydrogen Energy, 31: 1632–1630.
- Schaetzle O., Barriere F., Baronian K. 2008. Bacteria and yeasts as catalysts in microbial fuel cells: electron transfer from micro-organisms to electrodes for green electricity. Energy & Environmental Science, 1: 607–620.
- Schink B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 61: 262–280.
- Schroder U. 2007. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. Physical Chemistry Chemical Physics, 9: 2619–2629.
- Shantaram A., Beyenal H., Veluchamy R.R.A., Lewandowski Z. 2005. Wireless sensors powered by microbial fuel cells. Environ. Sci. Technol., 39: 5037–5042.
- Topcagić S., Minteer S. D. 2006. Development of a membraneless ethanol/oxygen biofuel cell. Electrochimica Acta, 51: 2168–2172.
- Virdis B., Rabaey K., Yuan Z., Rozendal R.A., Keller J. 2009. Electron fluxes in a microbial fuel cell performing carbon and nitrogen removal. Environ. Sci. Technol., 43: 5144–5149.
- Zhao F., Harnisch F., Schroeder U., Scholz F., Bogdanoff P., Herrmann I. 2005. Application of pyrolysed iron(II) phthalocyanine and CoTMPyP based oxygen reduction catalysts as cathode materials in microbial fuel cells. Electrochim. Commun., 7: 1405–1410.
- Zhao F., Harnisch F., Schroeder U., Scholz F., Bogdanoff P., Herrmann I. 2006. Challenges and constraints of using oxygen cathodes in microbial fuel cells. Environ. Sci. Technol., 40: 5193–5199.
- Zhu X., Ni J., 2009. Simultaneous processes of electricity generation and p-nitrophenol degradation in a microbial fuel cell. Electrochim. Commun., 11: 274–277.

10. Termiczne przetwarzanie pozostałości z produkcji bioetanolu z biomasy lignocelulozowej

Dariusz Wiśniewski, Jakub Pulka, Andrzej Białowiec

10.1. Wprowadzenie

Etanol powstający w wyniku fermentacji cukrów stanowi źródło energii odnawialnej. Jest stosowany jako domieszka lub w zastępstwie paliw płynnych. Do tego celu produkowany jest z przemysłowych odmian kukurydzy (Chander i in. 2007), co zresztą budzi wiele kontrowersji i etycznych sporów (Pimentel 2003) z racji wykorzystania dostępnej pod uprawy ziemi na cele nierolnicze, zamiast do produkcji żywności. Z tego względu bierze się pod uwagę inne źródła biomasy do produkcji bioetanolu, np. odpadowe tkanki miękkie roślin uprawnych, odpady z przemysłu spożywczego (Barriga i in. 2013), jak również lignocelulozę (Sun i in. 2002), której źródłem mogą być zrębki z drzew i krzewów o różnej twardości drewna, trociny, słoma, papier, skorupy orzechów, włókna roślinne, tkaniny (Boopathy 1998; Cheung i Anderson 1997; Dewes i Heuunsche 1998; Reshamwala i in. 1995). Przykładowo, biomasa uzyskana z miękkiego drewna (np. wierzby) zawiera 45–50% celulozy, 25–35% hemicelulozy oraz 25–35% ligniny (Sun i in. 2002). Wytwórzanie etanolu z tego rodzaju materiałów wymaga zastosowania wstępnej obróbki mechanicznej (Cadoche i Loope 1989) i fizyczno-chemicznej, a zatem autoklawowania (McMillan 1994), autoklawowania w atmosferze amoniaku – AFEX (Reshamwala i in. 1995), autoklawowania w atmosferze CO₂ (Zheng i in. 1998), ozonolizy (Vidal i Molinier 1988), hydrolizy kwaśnej (Sivers i Zacchi 1995), hydrolizy zasadowej (McMillan 1994), biologicznej (Schurz 1978) lub termicznej (Shafizadeh i Bradbury 1979) przed właściwym procesem fermentacji. W każdym z przypadków po procesie pozyskiwania cukrów prostych do procesu fermentacji pozostaje odpad, który wymaga dalszego przetworzenia.

Jednym z aspektów związanych z wytwarzaniem bioetanolu z biomasy, szczególnie z biomasy lignocelulozowej, który należy uwzględnić przy całosciowej analizie efektywności technologii, jest powstawanie odpadów. Odpady z produkcji bioetanolu powinny być zagospodarowane zgodnie z poniższą hierarchią. W pierwszej kolejności należy unikać produkcji odpadów i minimalizować

ich szkodliwe właściwości, zaś w sytuacji, gdy nie udało się zapobiec wytwarzaniu odpadów, powinny one zostać poddane odzyskowi, w tym recyklingowi, a pozostałe, dla których nie ma zastosowania, należy unieszkodliwić w sposób zapewniający bezpieczeństwo ludziom oraz środowisku. Zasady te dotyczą również odpadów wytwarzanych w trakcie produkcji bioetanolu. Zagospodarowanie powinno wynikać z ich właściwości oraz być nakierowane na odzysk. Organiczny charakter odpadów umożliwia ich termiczną obróbkę w celutworzenia paliw II generacji. Cel ten można osiągnąć dzięki zastosowaniu procesu pirolizy i gazyfikacji, w wyniku których otrzymywane jest paliwo gazowe i stały karbonizat.

Odpad pozostały, np. po hydrolizie biomasy wierzbowej, może być wykorzystany bezpośrednio w procesach termicznych do produkcji energii, może być przetworzony w dobrej jakości paliwo II generacji, jak również możliwe jest uzyskanie biowęglę do zastosowań nawozowych. Dotychczas nie podejmowano prób termicznej obróbki odpadów pozostałych z produkcji bioetanolu do wytwarzania paliw gazowych i stałych. Prace te realizowano z powodzeniem na innych rodzajach odpadów z produkcji rolniczej. Obiecujące są prace związane z termicznym przetworzeniem wysuszonego pofermentu z biogazowni rolniczych w procesie toryfikacji (Wiśniewski i in. 2013a) oraz pirolizy i zgazowania (Wiśniewski i Gołaszewski 2013), jak również pomiotu indyczego (Wiśniewski i in. 2013b).

Nowym kierunkiem prac rozwojowych technologii termicznego przetwarzania odpadów i biomasy, w tym odpadów z produkcji bioetanolu, jest ich piroliza i gazyfikacja. Jednym z produktów pirolizy jest karbonizat, który może znaleźć wiele zastosowań. Oprócz energetycznego przetwarzania odpadów z produkcji bioetanolu, interesujące wydaje się wykorzystanie karbonizatu powstającego w procesie pirolizy. W tym przypadku ważnym aspektem są właściwości uzyskanego produktu – karbonizatu. Kim i in. (2012) badali właściwość żółtej topoli przed i po pirolizie. Materiał przed procesem był wysuszony do 5% wilgotności. Wilgotność materiału po procesie była zawsze mniejsza od 1%, niezależnie od warunków. Wartość opałowa oscylowała między 6–18%, co miało związek głównie ze zwiększeniem procentowej zawartości lignin z 19,05% do maksymalnie 43,18%.

Oprócz kaloryczności, ważnymi parametrami są właściwości mechaniczne karbonizatu wpływające na możliwość jego dalszej obróbki. Przykładowo, Bridgeman i in. (2010) badali wpływ toryfikacji na ścieralność wierzby i miskanta. Wykazali, iż nieprzetworzona i poddana pirolizie biomasa wierzby i miskanta przy niskich temperaturach nie wykazywała dobrej ścieralności. Zwiększenie temperatury powodowało znaczną poprawę ścieralności do poziomu, jakim charakteryzuje się węgiel. Miskantus charakteryzował się lepszą ścieralnością i jego rozkład wielkości cząsteczek był podobny do rozkładu węgla. Phanphanich i Mani (2011) badali wpływ procesu na ścieralność

wiórów sosnowych i pozostałości zrębowych. Określili, że energia potrzebna do zmniejszenia wielkości jest dziesięciokrotnie niższa dla wiórów i sześciokrotnie niższa dla zrębów poddanych obróbce w 300°C w porównaniu do nieprzetworzonej biomasy. Ten parametr jest niezwykle ważny, ponieważ do efektywnego wykorzystania karbonizatu w procesach energetycznych potrzebna jest jego obróbka mechaniczna, np. peletyzacja.

Podczas pirolizy biomasy drzewnej następuje zniszczenie łańcuchów hemicelulozy, co ogranicza zdolność gromadzenia wody. Wiele związków z grupami tlenowymi, takich jak hydroksylowe, karboksylowe i karbonylowe, jest usuwanych ze ścian komórkowych, a na ich miejsce wchodzą związki aromatyczne, np. furan. Dzięki takim reakcjom dochodzi do zamiany związków hydrofilowych na hydrofobowe, a to uniemożliwia gromadzenie wody przez materiał (Verhoeff i in. 2011). Ma to duże znaczenie dla jego przechowywania, ponieważ nie trzeba budować specjalnych miejsc – karbonizat można gromadzić na zewnątrz bez potrzeby zadaszenia.

Przytoczone dane wskazują, iż termiczna obróbka odpadów z produkcji bioetanolu umożliwia podniesienie poziomu odzysku masowego i energetycznego poprzez uzyskanie paliw gazowych i stałych II generacji oraz karbonizatu o potencjale zastosowania w przemyśle lub rolnictwie. Z tego względu przeprowadzono prace, których celem było zbadanie możliwości tworzenia paliw II generacji z pozostałości po produkcji bioetanolu. Do tworzenia paliw II generacji zastosowano metody termiczne: pirolizę i zgazowanie, konwersję paliwa stałego do gazowego.

10.2. Materiały i metody

10.2.1. Materiały

Badaniom poddano dwa rodzaje materiału organicznego:

- lignina – materiał referencyjny (LH);
- odpad procesu fermentacji – odpad pozostały z produkcji bioetanolu (HW).

Materiał referencyjny LH miał postać brykietu i nie wymagał osuszania ani innych prac związanych z przygotowaniem do procesów termicznych. W przypadku badań nad wsadem właściwym (HW) niezbędne było przygotowanie próbek do badań. W wyniku hydrolizy enzymatycznej materiał cechował się dużą zawartością wilgoci powyżej 80%. Do badań nad zgazowaniem w złożu stałym i pirolizą zawartość wilgoci nie powinna przekraczać 20%. Z tego względu HW został osuszony w piecu komorowym do wilgotności ok. 10%. Właściwości fizyczno-chemiczne wykorzystanych materiałów zestawiono w tabeli 1. Jak widać, HW z wierzyby charakteryzował się wyższą

wartością opałową oraz zawartością węgla od ligniny hydrolizowanej, natomiast zawartość popiołu, wilgoci oraz siarki w HW była niższa niż w LH (tab. 1).

Tabela 1

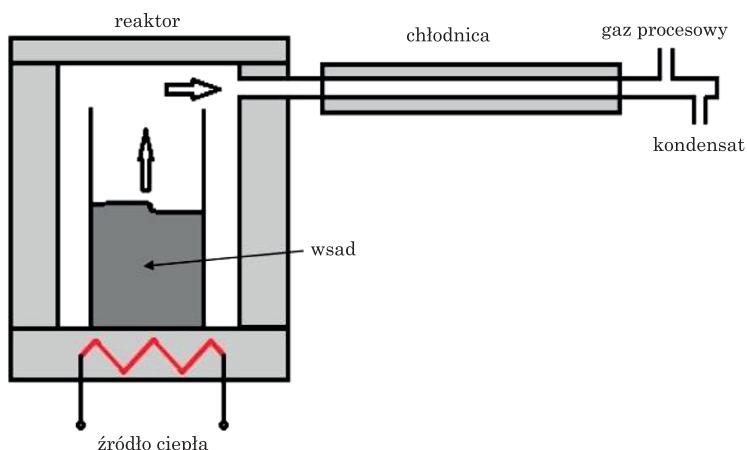
Parametry materiałów wykorzystanych w eksperymencie.

Rodzaj materiału	Wartość opałowa (kJ/kg)	Popiół (%)	Wilgotność całkowita (%)	Siarka całkowita (%)	Węgiel (%)
LH	16 945	11,61	14,33	0,39	41,63
HW	17 478	4,31	9,88	0,04	49,17

10.2.2. Przebieg eksperymentu

Reaktor pirolityczny został najpierw rozgrzany do temperatury 500°C. Próbki przygotowanych materiałów LH i HW o masie odpowiednio 43 i 30 g umieszczone na specjalnym sicie tak, aby umożliwić swobodny przepływ czynnika zgazowującego podczas procesu zgazowania. Proces pirolizy prowadzono w temperaturze 500°C.

Zgazowanie LH i HW przeprowadzono oddzielnie, wprowadzając jako czynnik zgazowujący dwutlenek węgla. Przed umieszczeniem próbek w reaktorze został on rozgrzany do temperatury 850°C. Następnie przygotowano złożo składające się z warstwy rozgarzonego węgla drzewnego, stanowiącego w procesie strefę redukcji, na której umieszczono wsad właściwy LH lub HW, odczekano do momentu rozpoczęcia pirolizy, a następnie podano czynnik zgazowujący w ilości ok. 0,004 m³/h.



Rys. 1. Budowa reaktora do pirolizy i zgazowania odpadów

Badania pirolizy i zgazowania przeprowadzono na specjalnie zaprojektowanym i wykonanym stanowisku badawczym umożliwiającym pirolizę i zgazowanie, którego schemat przedstawiono na rysunku 1.

W trakcie procesu analizowano online temperaturę, skład powstającego gazu w zakresie: CH₄, CO, H₂, CO₂, O₂ oraz jego kaloryczność.

10.2.3. Analizy odpadów po produkcji bioetanolu oraz karbonizatu

Ocena potencjału energetycznego materiałów wsadowych LH i HW wymagała badania właściwości energetycznych przed i po procesie pirolizy. W wyniku pirolizy otrzymano frakcję stałą – karbonizat, którego właściwości energetyczne są istotne z punktu widzenia wytwarzania paliw stałych z pozostałości z produkcji bioetanolu. Frakcja stała przed i po procesie pirolizy została przebadana pod kątem właściwości energetycznych. Zbadano takie parametry jak: wilgotność, ciepło spalania, wartość opałowa, węgiel związany, części lotne, popiół. Przeprowadzono analizę pierwiastkową węgla, wodoru, siarki, azotu, chloru, tlenu.

Wilgotność roboczą wyznaczono metodą suszarkowo-wagową PN-80/G-04512 w temperaturze 105±2°C przy użyciu suszarki z wymuszonym obiegiem firmy BINDER. Po wysuszeniu próbki mielono młynkiem laboratoryjnym IKA MF 10 do otrzymania uziarnienia, frakcji 0,25 mm. Próbki w takiej postaci skierowano do dalszych analiz.

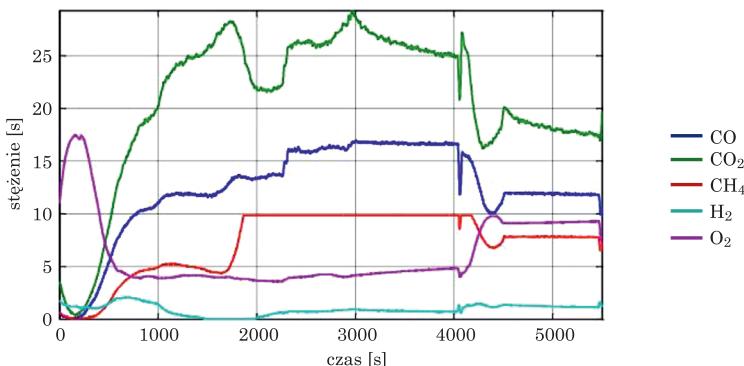
Wilgotność analityczną, zawartość popiołu, zawartość części lotnych wyznaczono metodą termograwimetryczną przy użyciu analizatora TGA ELTRA THERMOSTEP [ASTM: D7582, D-3173, D-3174, D-3175 oraz PN-G-04560:1998, PN-ISO 562] – automatyczny piec termograwimetryczny. Ciepło spalania oznaczono przy użyciu kalorymetru IKA Werke GmbH C2000 [PN-81/G-04513] metodą izoperioboliczną. Wartość opałową wyznaczono po uwzględnieniu oznaczonej wilgotności w próbach: wg normy [PN-81/G-04513]. Oznaczanie zawartości azotu metodą Kjeldahla w oparciu o normę PN-EN ISO 20483 wykonano przy użyciu systemu do mineralizacji K 424 i destylacji B 324 firmy BUCHI oraz elektronicznej biurety cyfrowej firmy SOLARUS. Oznaczanie całkowitej zawartości węgla, wodoru i siarki realizowano analizatorem CHS500 firmy ELTRA [PN-C-04301:1987], [PN-G-04584:2001]. Oznaczanie zawartości chloru wykonano przy użyciu mieszaniny Eschki [PN-ISO 578] i z wykorzystaniem metody Mohra.

Badania wykonano w trzech powtórzeniach.

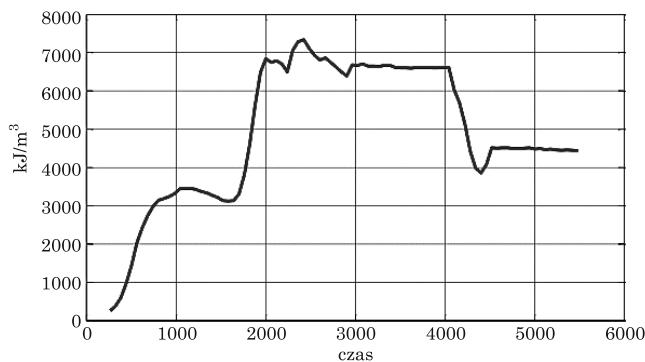
10.3. Wyniki

10.3.1. Piroliza odpadów z produkcji bioetanolu

Pirolizę wsadu referencyjnego LH przeprowadzono w reaktorze badawczym, który wstępnie został rozgrzany do temperatury 500°C.



Rys. 2. Zmiany stężeń analizowanych gazów pirolitycznych powstały z próbki LH

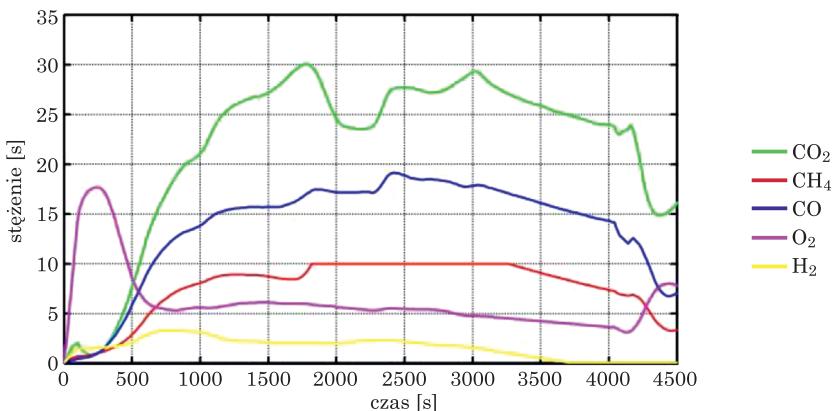


Rys. 3. Zmiany kaloryczności powstającego gazu podczas pirolizy wsadu LH

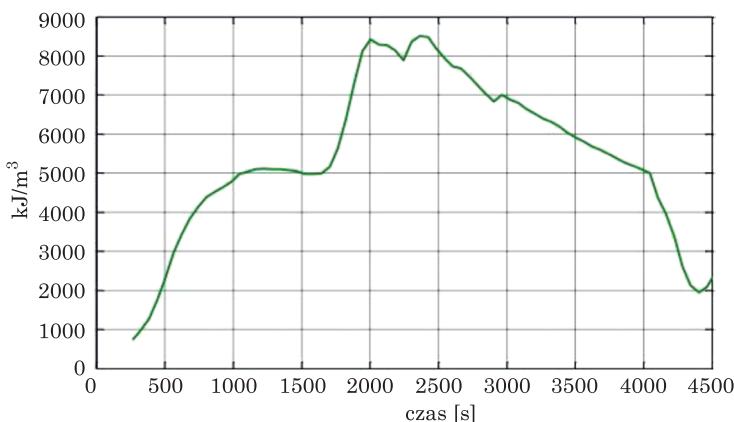
W przypadku LH właściwy proces pirolizy rozpoczął się w chwili czasu $t = 1500$ s, a zakończył w chwili $t = 4200$ s po odgazowaniu części lotnych (rys. 2). W chwili $t = 1500$ s obserwowano znaczny wzrost stężenia gazów palnych CO, H₂, CH₄ (dla metanu zaobserwowano przekroczenie zakresu pomiarowego, który wynosił 10%) oraz znaczny wzrost kaloryczności gazu. Występujący wzrost zawartości CO₂ w gazie pirolitycznym jest wynikiem utleniania się wsadu spowodowanego początkowo dużą zawartością tlenu w reaktorze w stosunku do masy próbki umieszczonej w reaktorze. Silne odgazowanie wsadu kończy się ok. chwili $t = 4200$ s. W okresie od 2000 s do

4000 s od rozpoczęcia pirolizy kaloryczność gazu była najwyższa i utrzymywała się na względnie stałym poziomie $6,8 \text{ MJ/m}_n^3$ (rys. 3).

W przypadku odpadu po procesie fermentacji właściwy proces pirolizy rozpoczął się w chwili $t = 500 \text{ s}$, a zakończył w chwili $t = 4000 \text{ s}$ po odgazowaniu części lotnych (rys. 4). W chwili $t = 2000 \text{ s}$ obserwowano znaczny wzrost stężenia gazów palnych CO , H_2 , CH_4 (podobnie jak w przypadku LH dla metanu zaobserwowano przekroczenie zakresu pomiarowego, który wynosił 10%) oraz znaczny wzrost kaloryczności gazu. Silne odgazowanie kończy się ok. chwili $t = 4000 \text{ s}$. Maksymalną kaloryczność gazu uzyskano w czasie 2000–2500 s, która była na poziomie $8,5 \text{ MJ/m}_n^3$ (rys. 5).



Rys. 4. Zmiany stężeń analizowanych gazów pirolitycznych powstających z próbki HW



Rys. 5. Zmiany kaloryczności powstającego gazu podczas pirolizy wsadu HW

Tabela 2
Właściwości uzyskanych w wyniku pirolizy LH i HW kabonizatów

Źródło nizatu	Wilgotność	Ciepło spalania	Wartość opałowa	Węgiel związany	Części lotne	Popiół	C	H	S	N	Cl	O
	%	MJ/kg	MJ/kg	% s.m.								
LH	3,15	21,648	20,888	48,66	24,57	26,77	57,02	2,05	0,37	0,47	0,01	13,3
HW	5,38	23,617	22,216	39,83	53,90	6,27	58,56	4,15	0,09	1,39	0,09	29,5

Z przedstawionych w tabeli 2 danych wynika iż karbonizat z LH po obróbce termicznej charakteryzuje się bardzo wysoką kalorycznością wynikającą z koncentracji węgla. W wyniku pirolizy LH poprawione zostały parametry paliwowe. Wartość opałowa wzrosła z ok. 17 do blisko 21 MJ/kg (tab. 2 i 1). Wysoka kaloryczność daje nadzieję na uzyskanie dobrej jakości biopaliwa stałego lub może zostać wykorzystana jako dodatek do produkcji biopaliwa, np. dodatek do słomy przy produkcji peletu.

Stwierdzono podniesienie wartości opałowej HW z 17,4 MJ/kg na 22,2 MJ/kg, co jest wynikiem uwęglania. Obróbka termiczna spowodowała również znaczną redukcję części lotnych z ok. 70,37% do ok. 53,90%. Odgazowanie części lotnych jest charakterystyczne dla procesów pirolizy. W porównaniu do badań z wsadem LH zauważono znacznie niższą zawartość popiołu – kształtującą się na poziomie 4,81% przed i 6,27% po procesie pirolizy. Parametry karbonizatu z HW okazały się zdecydowanie lepsze niż z LH ze względu na wyższą wartość opałową, niższą zawartość popiołu i siarki. Jedynie w przypadku chloru i azotu stężenia tych pierwiastków są wyższe, co przekładać się może na większą emisję tych związków.

Wyniki przeprowadzonych badań nad pirolizą osuszonego odpadu po procesie fermentacji wskazują na możliwość energetycznego wykorzystania tego odpadu do produkcji gazowych paliw II generacji oraz produkcji paliwa stałego, ewentualnie wykorzystane do celów przemysłowych i rolniczych.

Zwiększanie wartości opałowej podczas produkcji karbonizatu zwiększa opłacalność wykorzystania substratu do produkcji energii. Dwa procesy, do których jest najczęściej wykorzystywany karbonizat, to zgazowywanie i współspalanie z węglem.

Współspalanie biomasy z węglem polega na jednoczesnym spalaniu dwóch substratów. Zaletą tego procesu jest ustabilizowanie procesu spalania. CO₂, SO₂, NO_x są produkowane w mniejszej ilości aniżeli przy spalaniu samego węgla. Głównymi wadami procesu są niskie wartości opałowe biomasy, wysokie koszty suszenia i przechowywania, duża ilość frakcji lotnych oraz

trudności w rozdrabnianiu biomasy. Problemy te mogą być rozwiązane dzięki uwęgleniu biomasy. Karbonizat ma znaczenie wyższą wartość opałową, jest hydrofobowy, ma mniejszą ilość frakcji lotnych, zaś energia potrzebna do jego mechanicznej obróbki jest kilkakrotnie niższa.

Zdecydowanie częstszym sposobem energetycznego wykorzystania karbonizatu jest zgazowanie. Istnieje możliwość połączenia procesów zgazowywania i pirolizy. Przy zgazowywaniu biomasy powstaje gaz syntezy oraz energia w postaci ciepła – tradycyjnie przetwarzana w energię elektryczną. Alternatywnym rozwiązaniem jest użycie tej energii w formie ciepła do procesu pirolizy. Powstały po procesie karbonizat jest zgazowywany. Zastosowanie takiego systemu rozwiązuje problem dużej wilgotności biomasy i wysokiego stosunku O/C, który jest niekorzystny z termodynamicznego punktu widzenia. Połączenie tych procesów umożliwia wprowadzenie frakcji lotnych po procesie pirolizy do procesu zgazowywania (Prins i in. 2006).

Istnieje także metoda nie związana z produkcją energii. Polega ona na wprowadzeniu karbonizatu do gleby, by polepszyć jej właściwości. Wpływa to na zwiększenie retencji wody, lepszy skład mikroorganizmów glebowych, zmianę kwasowości gleby, zmniejszenie odpływu azotanów do wód podziemnych i zwiększenie kationowej pojemności wymiennej. Stosowanie tej metody umożliwia poprawienie właściwości wyjałowionych gleb w krajach rozwiniętych i rozwijających się (Novotny i in. 2009).

10.4. Podsumowanie

Opisywany eksperyment miał na celu zbadanie możliwości wytworzenia paliw II generacji z pozostałości po produkcji bioetanolu do zasilania w energię cieplną prototypowej instalacji biotechnologicznej wytwarzania bioetanolu. Do wytworzenia paliw II generacji zastosowano metody termiczne konwersji paliwa stałego do gazowego: pirolizę i zgazowanie.

Przeprowadzone badania wykazały bardzo dobre właściwości badanych materiałów w kierunku wytwarzania paliw stałych i gazowych II generacji. Paliwa gazowe uzyskane w procesie pirolizy i zgazowania wykazały znacznie lepsze właściwości dla odpadu z hydrolizy wierzby energetycznej niż ligniny hydrolizowanej. Kaloryczność paliwa gazowego dla procesu zgazowania odpadu hydrolizy wierzby w szczytce procesu wyniosła ok. $4,9 \text{ MJ/m}_n^3$ natomiast dla pirolizy ok. $8,5 \text{ MJ/m}_n^3$. Odpowiednio paliwo gazowe dla procesu zgazowania ligniny w szczytce $4,5 \text{ MJ/m}_n^3$, natomiast dla pirolizy ok. 7 MJ/m_n^3 . Udział procentowy w objętości gazów palnych CH_4 , CO, H_2 był typowy zarówno dla procesu pirolizy, jak i zgazowania.

W przypadku frakcji stałej uzyskano również znacznie lepsze wyniki dla wsadu właściwego po hydrolizie wierzyby energetycznej niż dla wsadu ligniny. Lignina hydrolizowana posiadała wiele zanieczyszczeń mineralnych w procesie pirolizy. Wartość opałowa dla wsadu właściwego jest wyższa (17,478 MJ/kg) niż dla wsadu modelowego – ligniny (16,9 MJ/kg), natomiast po pirolizie wynosi odpowiednio 22,216 MJ/kg dla hydrolizatu i 20,888 MJ/kg dla ligniny.

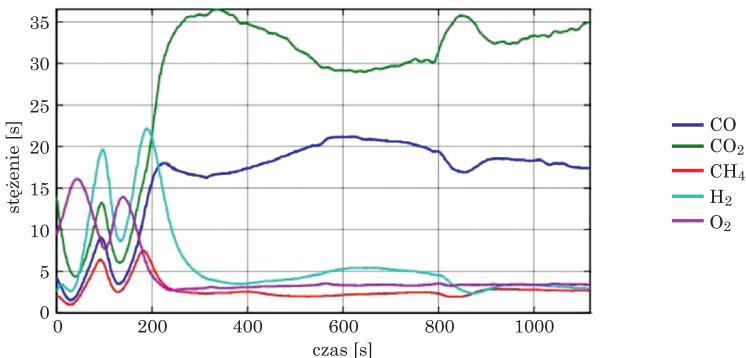
W celu pokrycia zapotrzebowania w energię cieplną procesu biotechnologicznego wytwarzania etanolu proponuje się zastosowanie procesu zgazowania. Proces ten zapewnia wytwarzanie nośnika energii w postaci gazu nisko-kalorycznego. Przy założeniu dziennego przetwarzania biomasy suchej na poziomie 200 kg pozostałość poprocesowa to w przybliżeniu ok. 15%. Wynika to z faktu, że głównym składnikiem pozostałości poprocesowej jest lignina, która dla wierzyby stanowi ok. 13% suchej masy. Uwzględniając obecność innych, nie przetworzonych składników, takich jak celuloza i hemiceluloza, można zaokrąglić suchą masę pozostałości do 15%. Daje to ok. 30 kg biomasy do wykorzystania o wartości opałowej 17,478 MJ/kg. Do dziennej dyspozycji z pozostałości procesowych jest ok. 524,34 MJ (145,65 KWh) energii cieplnej, co umożliwia zasilenie reaktora zgazowania o mocy cieplnej 6 KW. Zakładając średnią sprawność reaktorów zgazowania na poziomie 80%, do dyspozycji pozostaje w sposób ciągły przez całą dobę strumień ciepła o mocy 4,8 KW. Jest to z pewnością zbyt mała wartość w stosunku do zapotrzebowania całego procesu wytwarzania bioetanolu.

W wyniku badań stwierdzono, że pozostałości z produkcji bioetanolu stanowią źródło paliwa stałego o wysokim potencjale energetycznym umożliwiającym produkcję paliw II generacji.

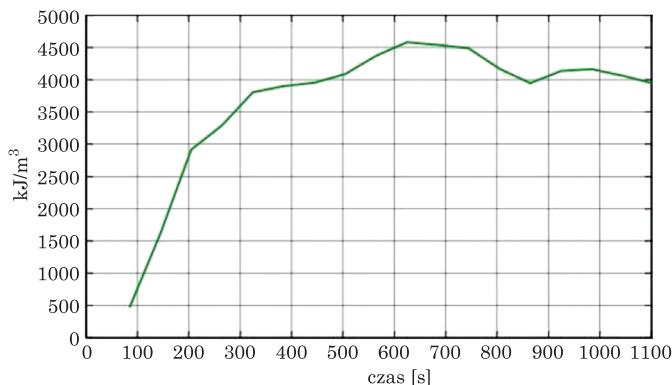
10.4.1. Zgazowanie odpadów z produkcji bioetanolu

Na podstawie analizy przedstawionych wyników obrazujących kinetykę procesu zgazowania stwierdzono, że właściwy proces zaczyna się w przybliżeniu w chwili $t = 600$ s. Rozpoczynają się wtedy właściwe reakcje typowe dla procesu zgazowania, czyli odgazowanie wsadu w strefie pirolizy. Od tego momentu do reaktora podano CO_2 (rys. 6). W momencie rozpoczęcia pirolizy w złożu wyraźnie rośnie stężenie CO, a w mniejszym stopniu H_2 , obniża się natomiast zawartość CO_2 . Dla próbki LH o masie 43 g proces zgazowania kończy się w chwili $t = 800$ s. Utrzymujące się podczas procesu wysokie stężenie CO wynika z dużej zawartości tlenu w komorze reaktora na skutek planowanych czynności: otwarcia reaktora po rozgrzaniu, umieszczenia w złożu żarzącego węgla drzewnego. Otrzymana maksymalna kaloryczność gazu generatorowego (rys. 7) zbiega się z maksymalnym stężeniem wszystkich

gazów palnych CO, H₂, CH₄ dla czasu t = 600 s. Maksymalna kaloryczność zarejestrowanego gazu waha się ok. 4,5 MJ/m³, co jest wartością typową dla zgazowania biomasy w reaktorach atmosferycznych.



Rys. 6. Zmiany stężenia analizowanych gazów powstały ze zgazowania próbki LH

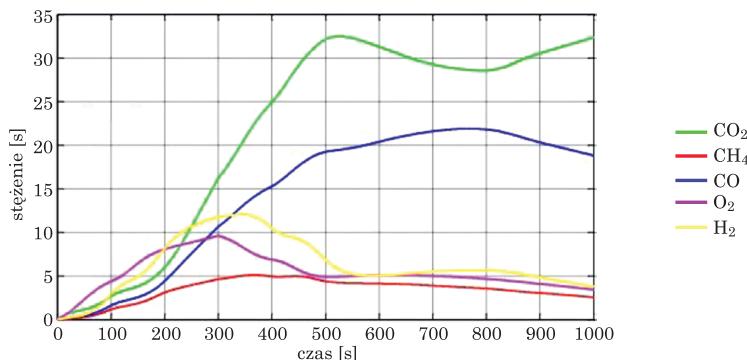


Rys. 7. Zmiany kaloryczności gazów powstały ze zgazowania próbki LH

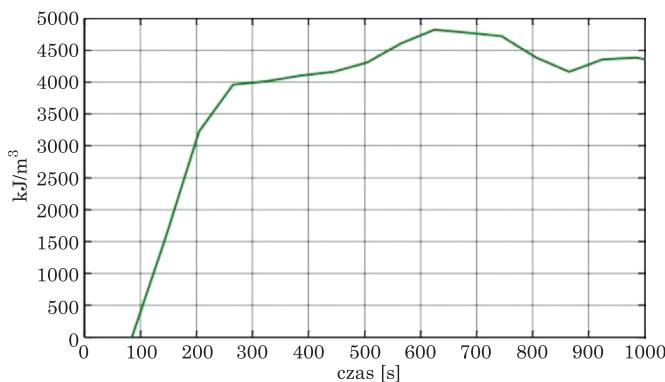
Podobnie jak w przypadku materiału LH, zgazowanie odpadu po procesie fermentacji (HW) przeprowadzono w temperaturze 850°C w reaktorze, w którym wcześniej zostało przygotowane złożo stałe składające się z węgla drzewnego w warstwie utleniania i redukcji. Na warstwę rozgarzonego węgla został ułożony odpad z hydrolizy wierzby energetycznej. Jako czynnik zgazowujący został podany dwutlenek węgla. Przed włożeniem do reaktora substratu reaktor został rozgrzany do temperatury 850°C. Po umieszczeniu próbki odczekano do momentu rozpoczęcia pirolizy, a następnie podano czynnik zgazowujący w ilości ok. 0,004 m³/h.

Eksperyment nad zgazowaniem HW wykazał, iż właściwy proces rozpoczął się w przybliżeniu w chwili t = 200 s (rys. 8). Wtedy zaczęły zachodzić właściwe reakcje typowe dla procesu zgazowania, czyli odgazowanie wsadu

w strefie pirolizy. W momencie rozpoczęcia pirolizy w złożu wyraźnie rośnie stężenie CO, a w mniejszym stopniu H₂, obniża się zawartość O₂. Dla próbki HW o masie 30 g proces zgazowania zakończył się w chwili t = 900 s. Maksymalna kaloryczność zarejestrowanego gazu wahala się na poziomie ok. 4,9 MJ/m³, co jest wartością typową dla zgazowania biomasy w reaktorach atmosferycznych (rys. 9).



Rys. 8. Zmiany stężeń analizowanych gazów powstały ze zgazowania próbki HW



Rys. 9. Zmiany kaloryczności gazów powstały ze zgazowania próbki HW

Hydrolizat z wierzby energetycznej stanowi doskonałe paliwo do procesu zgazowania ze względu na swoją jednorodność i bardzo dobre właściwości fizykochemiczne, takie jak niska zawartość popiołów i wysoka zawartość części lotnych (tab. 1). W przypadku zgazowania w instalacjach przemysłowych ze złożem stałym wymagane jest zwiększenie ciężaru nasypowego rozdrobnionego hydrolizatu poprzez granulację lub poprzez uzyskanie karbonatu we wcześniejszej pirolizie.

Literatura

- Barriga E.J.C., Guamán-Burneo C., Barahona P.P., Salas E., Tufiño C., Bastidas B. 2013. *Second generation ethanol from residual biomass: research and perspectives in Ecuador. Biomass now – sustainable growth and use*, InTech: 265–284.
- Boopathy R. 1998. *Biological treatment of swine waste using anaerobic baffled reactors*. Bioresour. Technol., 64: 1–6.
- Bridgeman T.G., Jones J.M., Williams A., Waldron D.J. 2010. *An investigation of the grindability of two torrefied energy crops*. Fuel, 89: 1–12.
- Cadoche L., Lopez G.D. 1989. *Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes*. Biol. Wastes, 30: 153–157.
- Chandel A.K., Chan E.S., Rudravaram R., Narasu L.M., Rao L.V., Ravindra R. 2007. *Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal*. Biotechnol. Molec. Biol. Rev., 2(1): 14–32.
- Cheung S.W., Anderson B.C. 1997. *Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater*. Bioresour. Technol., 59: 81–96.
- Dewes T., Heuunsche E. 1998. *Composition and microbial degradability in the soil of farmyard manure from ecologically-managed farms*. Biol. Agric. Hortic., 16: 251–268.
- Kim Y.H., Lee S.M., Lee H.W., Lee, J.W. 2012. *Physical and chemical characteristics of products from the torrefaction of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*)*. Bioresour. Technol., 116: 120–125.
- McMillan J.D. 1994. *Pretreatment of lignocellulosic biomass*. W: Himmel M.E., Baker J.O., Overend R.P. (eds.), *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*. American Chemical Society, Washington, DC: 292–324.
- Novotny E.H., Hayes M.H.B., Madari B. E., Bonagamba T.J., Azevedo de E.R., Souza de A.A., Guixue S., Nogueira C.M., Mangrich A.S. 2009. *Lessons from the Terra Preta de Índios of the Amazon region for the utilisation of charcoal for soil amendment*. J. Braz. Chem. Soc., 20: 6.
- Phanphanich M., Mani S. 2011. *Impact of torrefaction on the grindability and fuel characteristics of forest biomass*. Bioresour. Technol., 102: 2.
- Pimentel D. 2003. *Ethanol fuels: energy balance, economics, and environmental impacts are negative*. Nat. Resour. Res., 12(2): 127–134.
- Prins M.J., Ptasiński K.J., Janssen F.J.J.G. 2006. *More efficient biomass gasification via torrefaction*. Energy, 31(15): 3458–3470.
- Reshamwala S., Shawky B.T., Dale B.E. 1995. *Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass*. Appl. Biochem. Biotechnol., 51/52: 43–55.
- Schurz J. 1978. *Bioconversion of cellulosic substances into energy chemicals and microbial protein*. Symposium Proceedings, IIT, New Delhi: 37.
- Shafizadeh F., Lai Y.-Z. 1975. *Thermal degradation of 2-deoxy-D-arabino-hexonic acid and 3-deoxy-D-ribo-hexono-1,4-lactone*. Carbohyd. Res., 42: 39–53.
- Sivers M.V., Zacchi G. 1995. *A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine*. Bioresour. Technol., 51: 43–52.
- Sun Y., Cheng J. 2002. *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Bioresour. Technol., 83: 1–11.
- Verhoeff F., Adell A., Arnuelos I., Boersma A.R., Pels J.R., Lensselink J., Kiel J.H.A., Schukken H. 2011. *Torrefaction technology for the production of solid bioenergy carriers from biomass and waste*. ECN-E-11-039.
- Vidal P.F., Molinier J. 1988. *Ozonolysis of lignin – improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust*. Biomass, 16: 1–17.

- Wiśniewski D., Gołaszewski J., Białywiec A. 2013a. *The pyrolysis and gasification of digestate from agricultural biogas plant.* Archives of Environmental Protection [w druku].
- Wiśniewski D., Gołaszewski J., Białywiec A., Gołaszewski M. 2013b. *Torrefaction of turkey manure and energy value of the product.* Fuel. [w druku].
- Wiśniewski D., Gołaszewski J. 2013. *Thermal treatment of dewatered digestate for energy use.* Mat. Conf. International Anaerobic Digestion Symposium at Biogas World 2013, Berlin, 23–25 April 2013.
- Zheng Y.Z., Lin H.M., Tsao G.T. 1998. *Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion.* Biotechnol. Prog., 14: 890–896.

CZEŚĆ III

FURFURAL

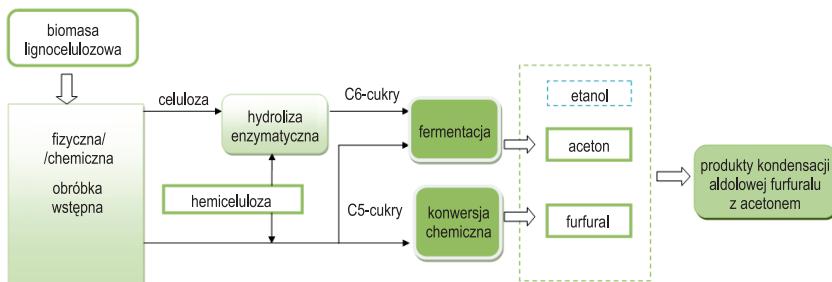
11. Katalityczna konwersja surowca drzewnego do furfuralu i jego waloryzacja do produktów biorafineryjnych

Artur Malinowski

11.1. Wprowadzenie

Źródłem wytwarzania furfuralu są węglowodany C₅ obecne w lignocelulozie (Zeitsch 2000). Furfural ma duży potencjał jako kluczowy związek w waloryzacji hemicelulozy zawartej w biomasie, gdyż biorąc pod uwagę rozwój nowoczesnych biorafinerii, związek ten rzeczywiście można przekształcić przez utlenianie, uwodornienie, redukcyjne aminowanie, dekarbonylację, nitrowanie, kondensację itp. (Kamm 2005). W szczególności ta ostatnia ścieżka waloryzacji furfuralu przez kondensację aldolową acetonem, zaproponowana przez Dumesica i współpracowników, jako etap pośredni do syntezy drugiej generacji biopalów otrzymywanych z biomasy lignocelulozowej jest częstym obiektem badań (Huber i Dumesic 2006; Chheda i Dumesic 2007; Huber i in. 2005). Aldolowa reakcja kondensacji furfuralu przebiega także z wytworzeniem furfurylidenu – związków zawierających grupę ketonową, które mogą mieć zastosowanie jak aromaty w przemyśle spożywczym (Fakhfakh i in. 2008) i jako monomery furanów w pochodnych żywic (Gandini i Belgacem 1997).

Dużym wyzwaniem jest opracowanie katalizatorów w reakcjach kondensacji aldolowej, które są aktywne w środowisku wodnym. Rozwój „zielonej” katalizy i zrównoważonych procesów w biorafineriach wymaga użycia nietoksycznych i tanich rozpuszczalników. Wodne roztwory związków furfuralu są znacznie tańsze, jeśli chodzi o separację, ponieważ nie wymagają destylacji. Na poniższym schemacie przedstawiono uproszczoną ścieżkę furfurylową w schemacie biorafinerii.



Rys. 1. Uproszczona ścieżka furfuralowa w schemacie biorafinerii

W ciągu ostatnich lat rozwijane są technologie pozwalające na pozyskiwanie kluczowych dla przemysłu chemicznego i motoryzacyjnego produktów, wykorzystujące odnawialne źródło, jakim jest biomasa, tzn. ulegającą biodegradacji część produktów, odpadów lub pozostałości z rolnictwa, leśnictwa, a także ulegającą biodegradacji część odpadów przemysłowych i miejskich (Shittu 2010; Tong i in. 2010; Xu i in. 2011). Biomasa roślinna składa się z celulozy (30–45%), hemicelulozy (20–35%) i ligniny (10–20%) (Burczyk 2009; Shittu 2010). Obecnie istotne znaczenie przypisuje się związkom – pochodnym furanów i katalitycznym procesom pozyskiwania ich z cukrów zawartych właśnie w biomasie (Shittu 2010). Furany w najnowszej Technologicznej Mapie Drogowej Biopaliw dla Transportu (*Technology Roadmap, Biofuels for Transport*, 2011), opracowanej przez Międzynarodową Agencję Energii, zostały zaliczone do biopaliw perspektywicznych. Związki takie jak furfural czy 5-hydroksymetylofurfural (HMF) mogą być otrzymywane z dobrą wydajnością poprzez dehydratację monosacharydów, takich jak heksozy (m.in. fruktoza) albo pentozy (np. ksyloza) w obecności różnych katalizatorów (Tong i in. 2010).

Furfural to heterocykliczny aldehyd o wzorze sumarycznym C_5H_4O . Nazwa związku pochodzi od łacińskiej nazwy jednego z surowców, z którego jest otrzymywany (łac. *furfur* – otręby). W temperaturze pokojowej jest oleistą, bezbarwną cieczą o charakterystycznym, drażniącym, migdałowym zapachu. Pozostawiony na powietrzu w wyniku autooksydacji zmienia barwę na czerwonobrązową (Win 2005). Furfural jest znany od dawna, a jego przemysłową produkcję rozpoczęto w USA już w latach 30. XX w. (Shittu 2010). Komercyjny proces produkcji bazuje na technologii Quaker Oast. W procesie tym furfural jest otrzymywany w katalizowanej kwasami mineralnymi (H_2SO_4) reakcji dehydratacji ksylozy. To relatywnie tani aldehyd, rozważany jako jeden z ważniejszych półproduktów do syntezy wartościowych chemikaliów i biopaliw.

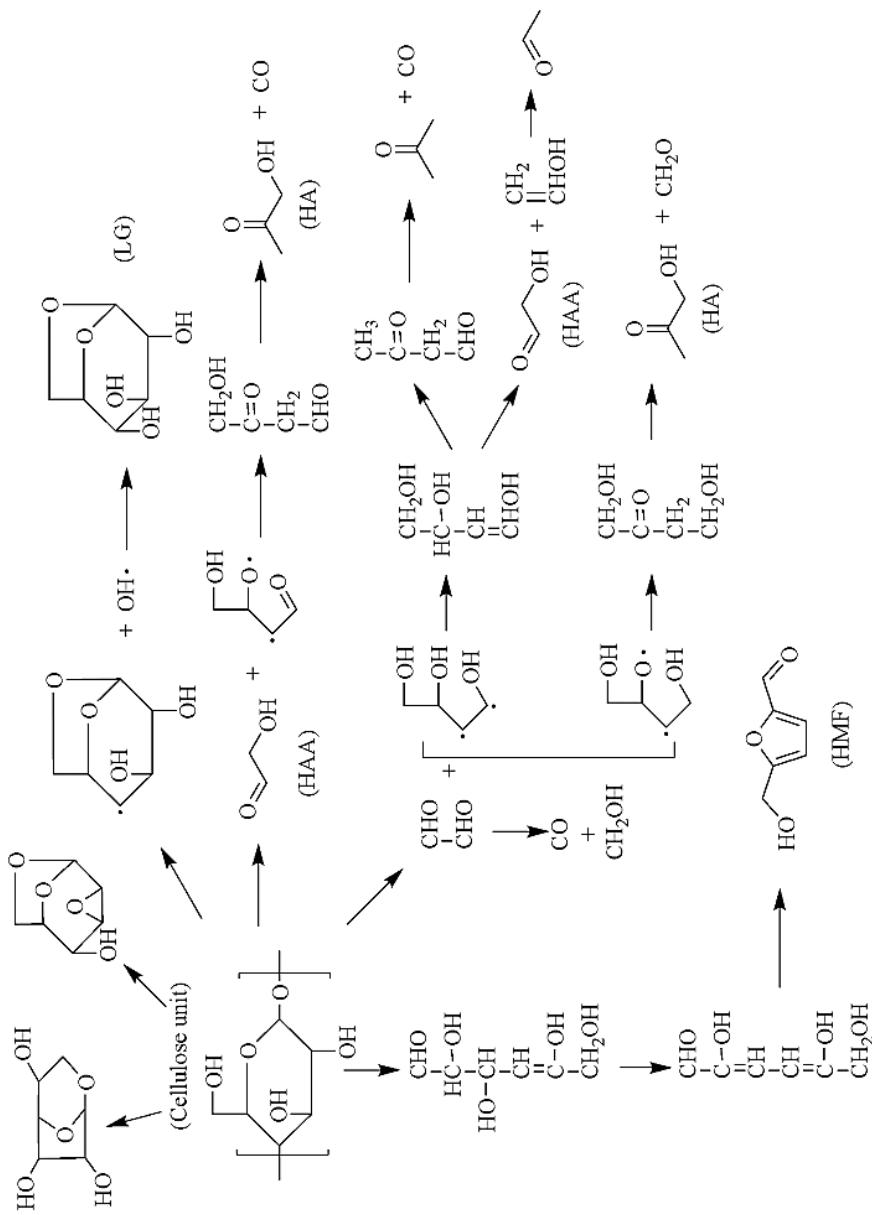
11.1.1. Otrzymywanie furfuralu z surowca drzewnego

Piroliza szybka lub wolna to proces rozkładu termicznego substancji prowadzony poprzez poddawanie jej działaniu wysokiej temperatury, ale bez kontaktu z tlenem i innymi czynnikami utleniającymi. W przypadku biomasy drzewnej, składającej się głównie z celulozy, hemicelulozy i ligniny, proces pirolizy prowadzi do powstania złożonych produktów reakcji. Celuloza jest głównym składnikiem biomasy lignocelulozowej oraz elementem budującym ścianę komórkową roślin.

Na przebieg procesu podczas pirolizy składa się wiele czynników: skład biomasy, właściwości surowca, temperatura pirolizy, szybkość nagrzewania, ciśnienie czy też typ zastosowanego reaktora pirolitycznego. Piroliza celulozy rozpoczyna się w temperaturze 150°C. W temperaturach poniżej 300°C reakcja ta powoduje redukcję stopnia polimeryzacji, powstawanie wolnych rodników, usunięcie wody, formowanie się grup karbonylowych, karboksylowych i wodoronadtlenkowych. Powstaje także tlenek i ditlenek węgla, a pozostałością jest zwęglony osad. W temperaturze powyżej 300°C piroliza celulozy powoduje powstanie dużej ilości (nawet 87% masowych) ciekłych produktów (Piskorz i in. 1989). Pierwszym krokiem reakcji jest rozkład celulozy polegający na jej aktywacji (Boutin i in. 1998). Następnie reakcję możemy podzielić na dwie ścieżki – depolimeryzację oraz fragmentację. Proces depolimeryzacji powoduje powstanie anhydro-oligosacharydów, lewoglukozanu (LG) i innych monomerycznych anhydrocukrów, furanów, cyklopentatonów, piranów. Proces fragmentacji (cięcie pierścieni) powoduje uzysk takich związków jak: hydroksyacetaldehyd (HAA), acetol (HA), inne liniowe karbonyle, liniowe alkohole, estry i inne związki chemiczne (Piskorz i in. 1986; Radlein i in. 1987; Lanza i in. 2009; Lin i in. 2009). Proces przedstawiony jest na rysunku 2.

Hemiceluloza, podobnie jak celuloza, jest składnikiem budulcowym ściany komórkowej roślin i składa się w większości z hekszo (D-glukoza, D-mannoza, D-galaktoza) oraz pentoz (D-ksyloza, D-arabinoza). Hemiceluloza jest mniej stabilna termicznie w porównaniu z celulozą ze względu na brak krystaliczności. Sam mechanizm reakcji pirolizy przebiega jednak analogicznie. Szybka piroliza hemicelulozy powoduje powstawanie podobnych produktów jak w przypadku celulozy. Ten sam proces w odniesieniu do ksylanu (składnika hemicelulozy) prowadzi do powstania innych produktów reakcji (Allen i in. 1996).

Lignina jest materiałem otaczającym i spajającym włókna celulozy. To heterogeniczny polimer uformowany przez polimeryzację 3 monomerów fenylowopropanowych, a jednocześnie najbardziej skomplikowany w budowie i najbardziej stabilny termicznie składnik biomasy. Wstępna piroliza ligniny rozpoczyna się od termicznego „zmiękczenia” w temperaturze 200°C. Jednak główny proces przebiega w wyższych temperaturach, które są większe niż



Rys. 2. Produkty rozkładu celulozy powstające w procesie pirolizy

temperatury potrzebne do szybkiego rozkładu celulozy. Szybka piroliza ligniny powoduje powstanie większej ilości popiołów oraz mniejszej ilości ciekłych związków organicznych. Ciekłe produkty obejmują: oligomery (ligniny pirolytyczne), monomeryczne związki fenolowe i lekkie związki organiczne. Oligomery tworzone są w większych ilościach niż pozostałe 3 grupy związków (13,5–27,7% masowych surowych bioolejów) (Oasmaa i in. 2003; Garcia-Perez i in. 2007; Garcia-Perez i in. 2008). Przeprowadzona analiza oligomerów (piroliza-chromatografia gazowa/ spektrometria masowa) (Scholz i Meier 2001; Scholze i in. 2001; Bayerbach i in. 2006; Garcia-Perez i in. 2008; Bayer i Meier 2009) wykazała, że ich masa waha się w granicach 650–1300 g/mol i składa się głównie z bifenylu, eterów difenyloowych, stylbenu i resinolu.

Bioolej otrzymywany w procesie pirolizy to mieszanina setek związków organicznych, z których wiele może mieć zastosowanie w produkcji chemikaliów, składników paliw itp. Jednak znajdują się w zbyt małych ilościach, by opłacalne było ich odzyskanie ze złożonej mieszaniny w znaczeniu technologicznym i ekonomicznym (Czernik i Bridgwater 2004). Jednym z takich związków jest furfural ($C_5H_4O_2$), w przemyśle chemicznym używany jako rozpuszczalnik, reagent do produkcji leków, żywic, dodatków paliwowych i żywnościowych. Obecnie furfural jest przemysłowo produkowany z pozostałości rolniczych zawierających dużą ilość pentozanu. W reakcji katalizowanej kwasem pentoza jest hydrolizowany do pentozy, zaś ta odwadniana do furfuralu. Wysoką zawartość pentozanu wykazują kolby kukurydziane. Z tego powodu uzysk furfuralu z tego rodzaju biomasy wynosić może (w warunkach przemysłowych) 10–12% (masowych).

Furfural jest jednym z produktów szybkiej pirolizy biomasy zawierającej celulozę oraz hemicelulozę, jednak jego zawartość nie przekracza wówczas 1% masowego (Di Blasi i in. 2010). Wcześniej przeprowadzane badania potwierdziły, że pirolytyczna reakcja tworzenia furfuralu może być katalizowana $ZnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ oraz innymi katalizatorami (Di Blasi i in. 2008; Shimada i in. 2008). Chlorek cynku ($ZnCl_2$) jest skutecznym katalizatorem w wielu procesach pirolytycznych dotyczących biomasy. Można wymienić szereg prac, gdzie był używany w analizach termograwimetrycznych, wolnej pirolizie oraz pirolizie wspomaganej mikrofalowo (Wan i in. 2009; Branca i in. 2010). Obecność tego związku obniża temperaturę rozkładu biomasy oraz znacznie wpływa na mechanizm depolimeryzacji i powstawanie produktów. Ze względu na swoją wysoką aktywność dehydratacyjną katalizator ten znacznie zwiększył produkcję depozytów węglowych oraz wody, jednocześnie obniżając ilość ciekłych organicznych produktów reakcji. Przeprowadzone badania wykazały, że impregnacja biomasy w $ZnCl_2$ opóźniła produkcję lotnych związków organicznych, a promowała produkcję innych, m.in. furfuralu i lewoglukozanu (LGO), nawet przy małej ilości katalizatora (<6% masowych). Badania z różnego rodzaju biomasy np. z drzewa jodłowego lub kolbami kukurydzymi

wskazywały na uzysk 1,5 i 6% furfuralu przy impregnacji 5–6% ZnCl₂. W przypadku surowej biomasy otrzymano 0,3–0,6% masowych furfuralu. Zwiększenie zawartości ZnCl₂ spowodowało spowolnienie produkcji wszystkich związków organicznych (Di Blasi i in. 2008). Analiza opierała się na dwóch metodach maksymalizacji produkcji furfuralu z biomasy. Pierwsza to katalityczna szybka piroliza z wykorzystaniem biomasy impregnowanej ZnCl₂. Druga natomiast to szybka piroliza surowej biomasy z przejściem oparów pirolitycznych przez katalizator ZnCl₂.

W dalszej części opracowania zostaną przedstawione badania dotyczące pozyskiwania furfuralu z surowca drzewnego i jego konwersji w reakcji kondensacji aldolowej do biochemikaliów.

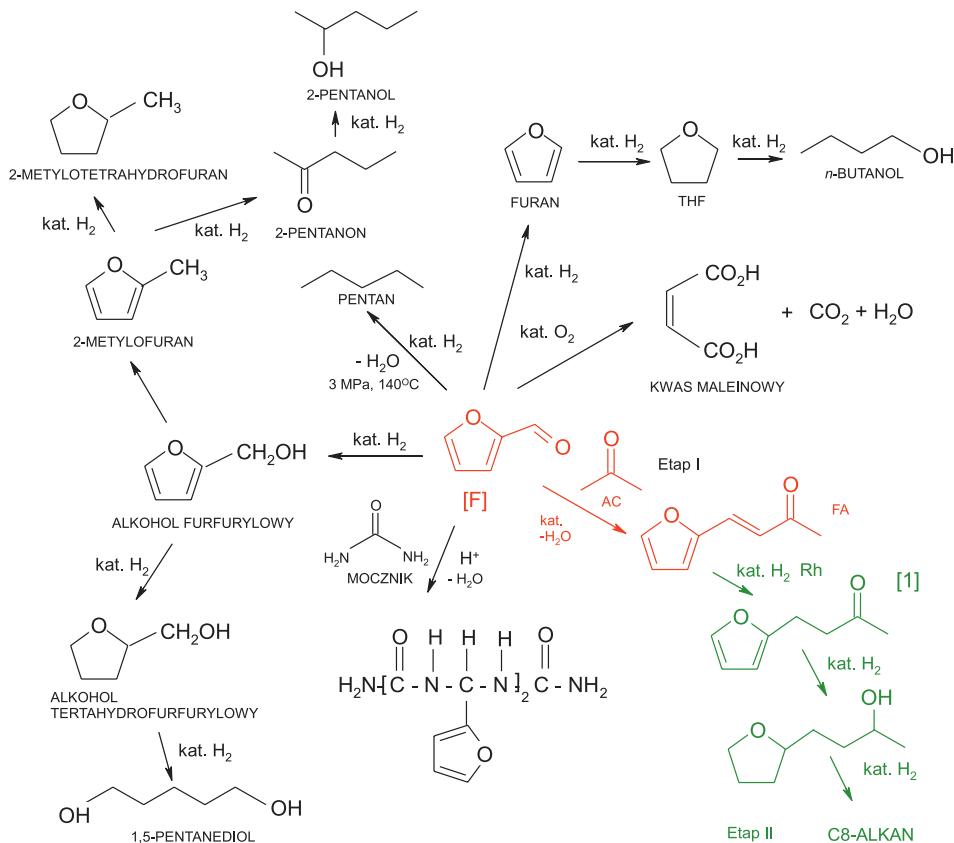
11.1.2. Waloryzacja furfuralu w wyniku kondensacji aldolowej z acetonom

Furfural wykorzystywany jest głównie do produkcji żywic furfurylowych i związków typu *fine-chemicals* (rys. 3). Może być selektywnie uwodorniony do alkoholu furfurylowego (półprodukt w przemyśle polimerowym – Huang 2007), 2-metylofurancu (półprodukt w syntezie pestycydów, w przemyśle perfumeryjnym – Zheng i in. 2006) czy tetrahydrofuranu (THF). Katalityczne uwodornienie furfuralu może prowadzić do produkcji pentanu (Xinghua i in. 2010), zaś w wyniku katalitycznego utlenienia furfuralu otrzymuje się kwas maleinowy (Shi i in. 2011). Furfural może ponadto ulegać reakcjom kondensacji z mocznikiem, a otrzymane produkty służą do syntezy materiałów polimerowych (Martinez-Garcia 2004). Furfural może również tworzyć inne związki o wydłużonym łańcuchu węglowym w wyniku kondensacji aldolowej z ketonami, które odgrywają kluczową rolę w produkcji wyższych alkanów (C₈-C₁₅) (Zapata 2012; Xu i in. 2010; West i in. 2008).

Przedmiotem badań eksperymentalnych była m.in. kondensacja aldolowa furfuralu z acetonom.

Kondensacja aldolowa furfuralu z acetonom zachodzi w środowisku alkalicznym. Polega na otrzymywaniu karboanionu poprzez odszczepienie protunu alfa z cząsteczki acetonu, który w następnym etapie atakuje węgiel karbonylowy furfuralu z utworzeniem 4-(2-furanylo)-4-hydroksy-2-butanonu FA-OH ulegającemu odwodnieniu do FA. Ze względu na symetrię cząsteczki acetonu może nastąpić kolejny atak furfuralu z utworzeniem di-podstawionego produktu, czyli 1,5-difuranylo-1,4-pentadien-3-onu [F₂A].

Oprócz tych dwóch reakcji mogą zachodzić również inne w środowisku reakcji. Furfural może reagować ze sobą (reakcja Cannizaro) z utworzeniem wyższego produktu utleniania kwasu 2-furanokarboksylowego (furo) oraz niższego produktu utleniania, czyli alkoholu furfurylowego (furfu). Reakcja ta



Rys. 3. Ścieżki przekształcania furfuralu
(kolorem czerwonym oznaczono reakcję będącą przedmiotem niniejszego opracowania)

przebiega w środowisku silnie zasadowym. W badaniach zastosowano niekonwencjonalną metodę wprowadzania energii do układu, tj. ultradźwięków, które w dobie implementacji reguł zielonej chemii do praktyki przemysłowej stały się bardzo atrakcyjne ze względu na znaczną redukcję czasu trwania reakcji, wysoką czystość produktów finalnych, jak też niejednokrotnie łagodniejsze warunki prowadzenia procesu poprzez wyeliminowanie wysokich ciśnień.

11.2. Metodyka badań

Badania przeprowadzono z biomasą drzewną w formie zmieionej do frakcji ok. 2-3 mm, otrzymaną z następujących gatunków roślin: topola, robinia akacjowa i wierzba (rys. 4) – przekazaną do badań przez Centrum Badań Energii Odnawialnej (CBEO) w Olsztynie. Badania pirolizy prowadzono

z czystą biomasą i impregnowaną 5% roztworem wodnym chlorku cynku ($ZnCl_2$). Do każdego z tygielków zawierających biomasy (2 g) dodano 14 g roztworu wodnego 5% $ZnCl_2$. Próbki następnie zostały wstawione do myjki ultradźwiękowej na 2 h w celu osiągnięcia pełnego zwilżenia i impregnacji biomasy. Po skończonej kąpieli w myjce ultradźwiękowej próbki wstawiono do suszarki ($40^\circ C$) na 18 h. Po tym okresie temperatura w suszarce została podniesiona do $105^\circ C$. Ten etap dosuszania trwał 3 h. Wszystkie próbki po ostudzeniu w piecu zostały zabezpieczone taśmą Parafilm w celu ograniczenia dostępu wilgoci z zewnątrz.



Rys. 4. Zmielone próbki biomasy

Przeprowadzone badania TG/DSC pozwoliły oznaczyć temperaturę rozkładu biomasy, parametry procesu pirolizy i szacować wartości entalpii w określonych odstępach temperatury rozkładu. Badania wykonano w termoanalizatorze STA 449 F3 Jupiter® firmy Netzsch. Próbki (S i R) umieszczono w komorach pomiarowych (mikrotygiel Al_2O_3 zawierający 7 mg próbki) symetrycznie we wspólnym piecu, którego temperatura jest regulowana według określonego programu niezależnie od zmian właściwości w próbkach. Program ten obejmował temperatury od pokojowej (RT) do $500^\circ C$, szybkość ogrzewania wynosiła 10 K/min w atmosferze strumienia azotu o przepływie 50 ml/min. Termoanalizator mierzył różnicę temperatur między próbками:

$$\Delta T_{SR} = T_S - T_R$$

Wynik pomiaru przedstawiono za pomocą DSC (krzywe zależności zmierzonych różnic przepływu ciepła od czasu / temperatury), TG (krzywa zmiany masy) i DTG (pierwsza pochodna krzywej TG). Następnie w aparaturze przepływowej (rys. 5) przeprowadzono proces pirolizy próbek biomasy surowej i impregnowanej chlorkiem cynku.



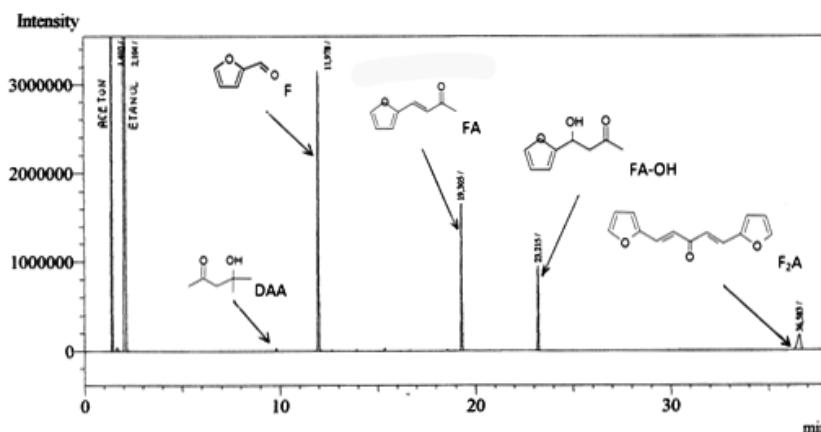
Rys. 5. Aparatura przepływową do katalitycznej konwersji biomasy w procesie pirolizy selektywnej

Kolejnym etapem badawczym było przeprowadzenie reakcji kondensacji aldolowej furfuralu (F) z acetonom (A). Badania z wykorzystaniem reaktora ultradźwiękowego wykonano we współpracy z Instytutem Chemii Przemysłowej (IChP) w Warszawie. Sonifikację mieszaniny reakcyjnej prowadzono przy użyciu łaźni ultradźwiękowych o częstotliwości 20 kHz firmy Ultron oraz 35 Hz firmy InterSonic Polska. Naczynie (z płaskim dnem) o objętości 150 ml zanurzano w łaźni wypełnionej wodą demineralizowaną (1 dm³). Generator ultradźwięków nie miał bezpośredniego kontaktu z mieszaniną reakcyjną. Naczynko sonifikacyjne o objętości 150 ml z reagentami w odpowiednich stosunkach molowych¹: F, A, katalizator metanol (0,6 mola)/ etanol (0,4 mola)/ woda demineralizowana (1 mol) umieszczano w łaźni ultradźwiękowej (20, 35 kHz) o objętości 1 dm³ wypełnionej wodą demineralizowaną. Temperatura procesu wynosiła 40°C. Po zakończeniu reakcji katalizator homofazowy neutralizowano kwasem bornym i zdekantowano, natomiast katalizator heterofazowy wydzielano ze środowiska reakcji przy użyciu filtrów Millipore Corporation MillexR-sv 5μ (niesterylnie), zaś przesącz poddawano analizie z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej sprzążonej ze spektrometrem masowym (GC-MS).

Produkty reakcji kondensacji furfuralu z acetonom w polu ultradźwiękowym zbadano początkowo za pomocą metody GC-MS (analiza jakościowa) celem ich identyfikacji i weryfikacji otrzymanych wyników z doniesieniami literaturowymi w tym zakresie. Jako katalizator reakcji wybrano MgO.

¹ We wszystkich reakcjach bez względu na sposób wprowadzania energii do układu stosowano 0,05 mola F i zmieniano ilość acetonu w zależności od stosunku molowego F:A, przykładowo dla 1:9 stosowano 0,4 mola A, a dla 1:5 0,25 mola A.

Stosunek F:A wynosił 1:9. Jako donor jonów OH⁻ zastosowano etanol. Reakcję prowadzono w łaźni ultradźwiękowej o częstotliwości 35 kHz przez 2 h. W mieszaninie poreakcyjnej zidentyfikowano następujące związki: DAA, FA, FA-OH, F₂A, nieprzereagowane F i A oraz etanol/ metanol (słужący jako donor jonów OH⁻). Po zidentyfikowaniu poszczególnych związków przeprowadzono analizę GC będącą podstawową analizą ilościową fazy organicznej (wody nie oznaczano). W tym celu zbadano czasy retencji dostępnych wzorców (z wyjątkiem FA-OH, i F₂A, których wzorców nie posiadało), a przykładowy wynik analizy GC przedstawiono na rysunku 6.



Rys. 6. Rozdział i identyfikacja produktów w mieszaninie poreakcyjnej (analiza przykładowa)

Badanie chromatograficzne GC mieszaniny reakcyjnej o ustalonym składzie procentowym wykazały zbieżność wyników analizy z rzeczywistym udziałem wagowym składników w surowcu.

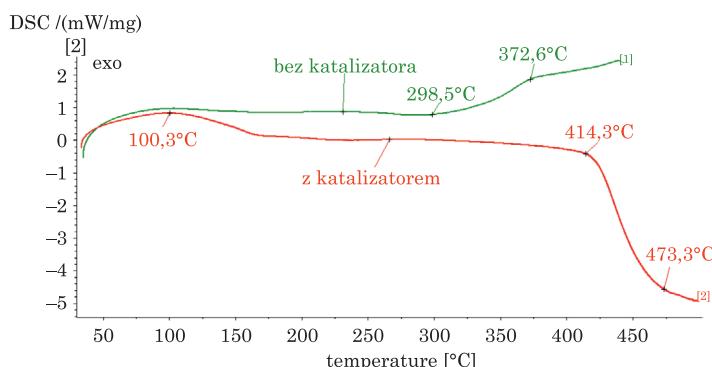
Temperatura reakcji kondensacji furfuralu z acetonem jest ograniczona temperaturą wrzenia acetonu oraz wymogami technicznymi stosowanych urządzeń ultradźwiękowych (max 50°C). Jednocześnie z danych literaturo-wych (Fakhfakh i in. 2008) wynika, że reakcja kondensacji aldolowej F i A w fazie ciekłej jest reakcją równowagową (rys. 9), a konwersja równowagowa FA rośnie ze wzrostem temperatury reakcji (w zakresie temperatur 20–40°C). Można przyjąć, że w 40°C konwersja równowagowa FA (1 mol/l) zostaje osiągnięta w warunkach konwencjonalnych po 3 h (NaOH jako katalizator). Brak jest danych literaturowych dla temperatur wyższych niż 40°C. W badaniach kondensacji aldolowej wykorzystano następujące katalizatory:

- Ba(OH)₂·8H₂O – CHEMPUR, Piekary Śląskie,
- CaO – POCH Gliwice, cz.d.a prażono w 450°C przez 1 h,
- MgO – przygotowano metodą strącania wodorotlenku Mg(OH)₂ z 10% roztworu Mg(NO₃)₂·6H₂O stężonym roztworem (25%) amoniaku; osad pozostawiono

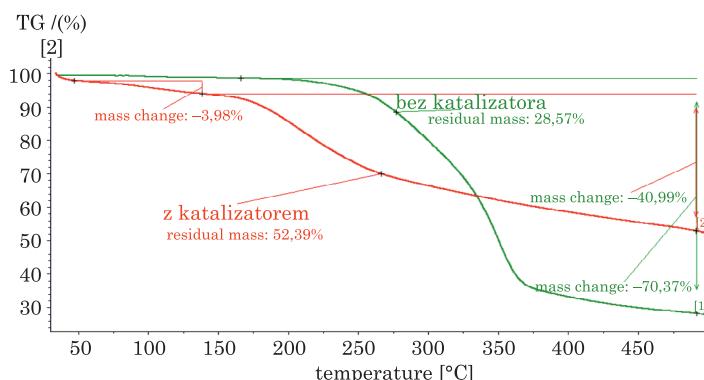
do starzenia przez 14 dni, a następnie przemywano 25-krotnie podwójnie destylowaną demineralizowaną wodą. Po przemyciu osad sączone i suszono kolejno w 40, 80 i 120°C. Otrzymany w ten sposób Mg(OH)₂ frakcjonowano na sitach w celu uzyskania frakcji o średnicy 0,5-1,0 mm. Przed reakcją Mg(OH)₂ kalcynowano w temp. 450°C przez 2 h w celu otrzymania MgO.

11.3. Wyniki i dyskusja

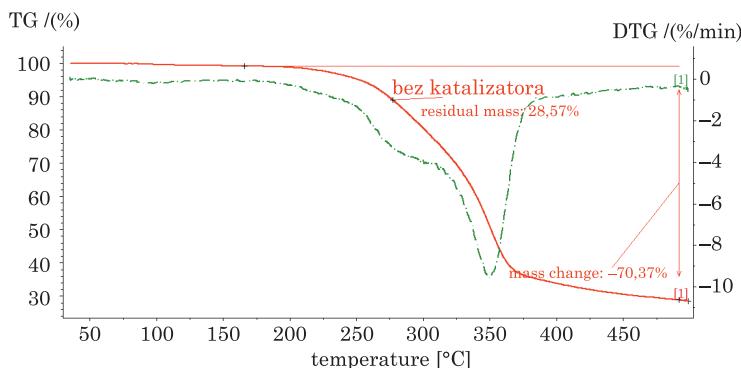
Próbki biomasy drzewnej poddano badaniom termograwimetrycznym. Poniżej na przykładzie topoli przedstawiono krzywe charakterystyki DSC, TG i DTG (rys. 7–10), które jednoznacznie wskazują na znaczne obniżenie temperatury depolimeryzacji w przypadku biomasy impregnowanej wodnym roztworem ZnCl₂. Przebiegi DSC, TG i DTG umożliwiają określenie parametrów prowadzenia procesu pirolizy poszczególnych rodzajów biomasy. Wspomniane przebiegi mogą także być pomocne w przypadku projektowania i prowadzenia procesu w większej skali, np. szybkiej pirolizy katalitycznej w reaktorze fluidalnym.



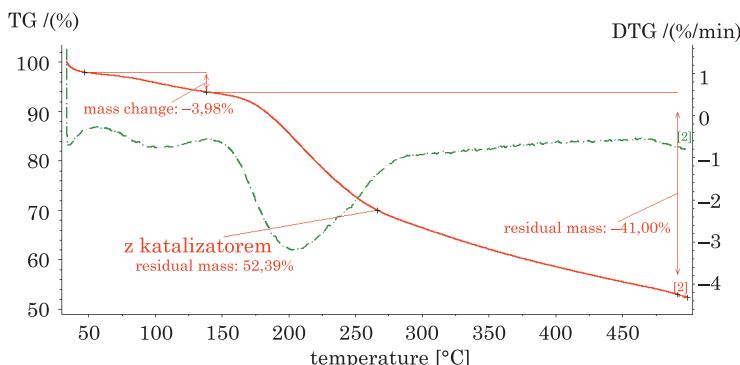
Rys. 7. Przebieg krzywych DSC dla próbek topoli



Rys. 8. Przebieg krzywych TG dla próbek topoli

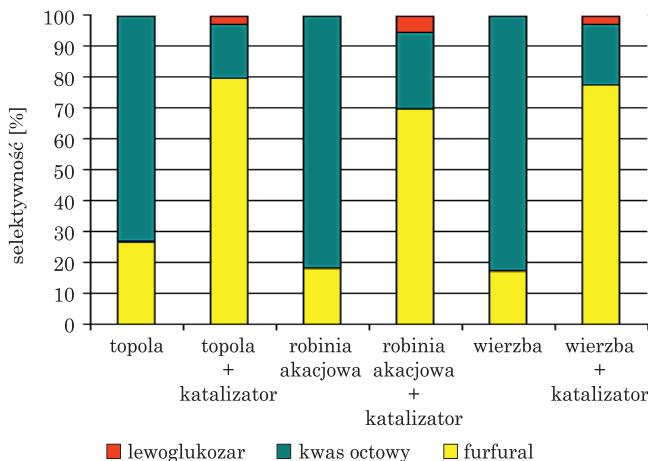


Rys. 9. Przebieg krzywych TG/DTG dla próbek topoli bez katalizatora



Rys. 10. Przebieg krzywych TG/DTG dla próbek topoli z katalizatorem

Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie procesu pirolizy próbek biomasy surowej i impregnowanej chlorkiem cynku. Badania przeprowadzono w aparaturze przepływowej (rys. 5). Próbkę biomasy o wadze ok. 1,6 g umieszczono w reaktorze rurowym i przez 1 h ogrzewano w temperaturze 80°C w przepływie azotu (czystość 99,995 Airproducts) 50 ml/min w celu usunięcie tlenu ze strefy reakcji. Przepływ był regulowany za pomocą masowego przepływowierza firmy Bronkhorst. Następnie próbka była ogrzewana z szybkością 10 K/min do temperatury 600°C. Opary produktów ulegały kondensacji w mieszaninie wodno-lodowej T~0°C. W typowym eksperymencie uzyskiwano 0,8 g produktu ciekłego, 0,5 g węgla (pozostałość po pirolizie biomasy), a pozostałe 0,3 g stanowiły produkty gazowe składające się z chlorometanu, furanów, 2-metylfuranu, wodoru i metanu. Selektywność do produktów ciekłych dla próbek topoli, akacji i wierzby przedstawiono na rysunku 11.



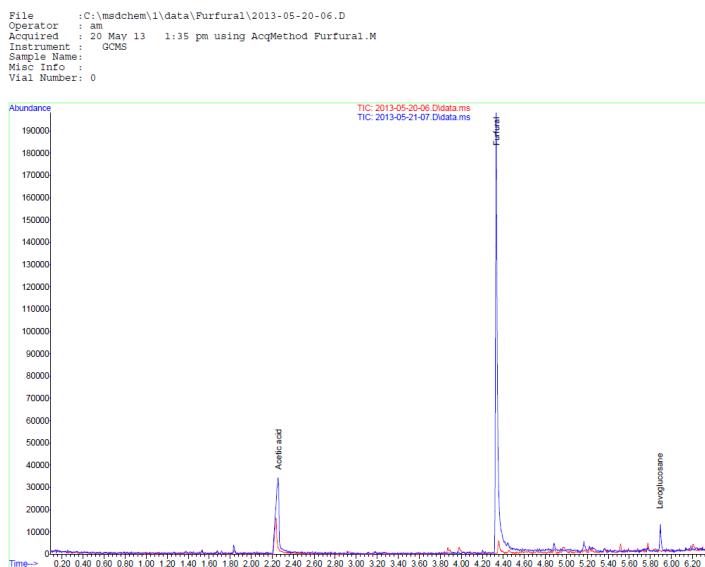
Rys. 11. Selektywność do produktów ciekłych

Stwierdzono, iż próbki traktowane katalizatorem odznaczały się bardzo dużą selektywnością do furfuralu (70-80%) i z mniejszą selektywnością do kwasu octowego i lewoglukozanu. Z próbek bez katalizatora powstawał w większości kwas octowy. Produkt ciekły, stanowiący w większości mieszaninę furfuralu, kwasu octowego i lewoglukozanu, przedstawiono na rysunku 12. Analizę produktów ciekłych prowadzono na aparacie GC-MS (rys. 13).

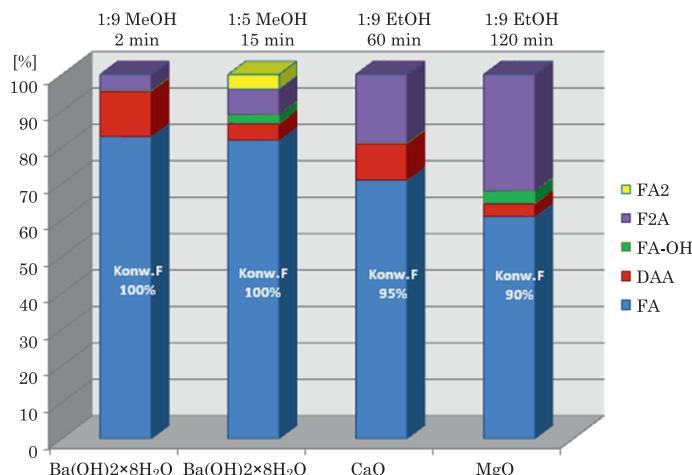


Rys. 12. Produkt ciekły otrzymany w wyniku katalitycznej selektywnej szybkiej pirolizy z biomasy drzewnej

Wyniki badań reakcji kondensacji aldolowej furfuralu z acetonom w polu ultradźwiękowym (35 kHz) okazały się najefektywniejsze dla układów katalitycznych $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8 \text{ H}_2\text{O}$ oraz CaO i MgO . Zależność selektywności otrzymanych produktów dla najefektywniejszych układów katalitycznych dla maksymalnej uzyskanej konwersji furfuralu zestawiono na rysunku 14.



Rys. 13. Analiza GC-MS biooleju pirolitycznego z wierzby (linia czerwona przedstawia analizę produktu bez katalizatora; linia niebieska dotyczy analizy biooleju otrzymanego z wierzby po impregnacji wodnym roztworem $ZnCl_2$)



Rys. 14. Zależność selektywności otrzymanych produktów w zależności od zastosowanego najefektywniejszego układu katalitycznego w czasie w polu ultradźwiękowym o częstotliwości 35 kHz

W przypadku $Ba(OH)_2 \times 8 H_2O$ wpływ działania ultradźwięków okazał się najbardziej spektakularny, a efekt najbardziej widoczny (zmiana barwy). Reakcja zachodziła błyskawicznie już w momencie wprowadzenia ultradźwięków do mieszaniny reakcyjnej (w układach rozpuszczalnikowych), a konwersję

równowagową otrzymywano w kilkanaście sekund. W przypadku katalizatora MgO, oprócz dużej selektywności do FA, uzyskano z selektywnością ok. 30% difurfuralaceton (F2A), który może mieć potencjalne zastosowanie do produkcji frakcji węglowodorowej paliw lotniczych (Xing 2010; Xiao-Ming 2012).

11.4. Podsumowanie

Przeprowadzone eksperymenty laboratoryjne szybkiej pirolizy w obecności katalizatora $ZnCl_2$ pozwoliły na uzyskanie z dużą selektywnością trzech głównych związków: furfuralu, kwasu octowego i lewoglukozanu, ponadto obecność $ZnCl_2$ w biomasie uniemożliwiła powstawanie innych związków organicznych.

W procesie pirolizy selektywnej zostały użyte trzy rodzaje biomasy: topola, wierzba i robinia akacjowa. Selektywność do furfuralu w przypadku tych trzech surowców wyniosła 70–80% w obecności katalizatora. Najwyższa selektywność 80% była obserwowana dla topoli.

Badania termograwimetryczne DSC, TG/DTG potwierdziły, że impregnacja biomasy $ZnCl_2$ przyczyniła się do obniżenia wydatku energetycznego związanego z dekompozycją biomasy pod wpływem temperatury (krzywe DSC [mW/mg] rys. 7–10). Ponadto krzywe przebiegu TG/DTG w przypadku wymienionych surowców wskazują, że impregnacja biomasy wpływa na obniżenie temperatury depolimeryzacji biomasy o ok. 100–150°C.

Nowoczesne metody intensyfikacji reakcji (ultradźwięki) wykorzystano w reakcji kondensacji furfuralu F oraz acetonu A w fazie ciekłej (40°C) i wykazano, że ultradźwięki (zwłaszcza o niższych częstotliwościach) stanowią najefektywniejszy sposób wprowadzania energii do układu. Produktem reakcji kondensacji F i A jest furfurylidenoacetona FA o istotnym znaczeniu praktycznym.

Opracowany proces kondensacji F z A do FA w polu ultradźwiękowym wobec $Ba(OH)_2 \times 8 H_2O$ oraz CaO i MgO jest procesem bezodpadowym, a nieprzereagowany aceton, etanol/metanol oraz zużyty katalizator zwracane są do obiegu. Technologia spełnia zatem wymagania stawiane „zielonej chemii”, wykorzystując jednocześnie produkt uboczny z produkcji fenolu do syntezy wyżej przetworzonych związków chemicznych przedłużających łańcuch produktów wielkiej syntezy chemicznej.

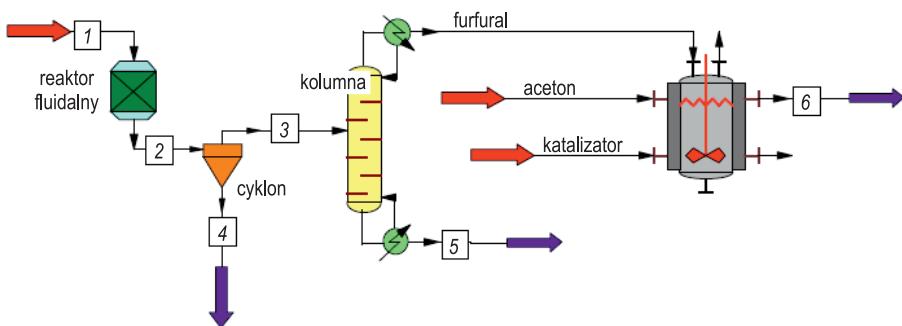
Najwyższą konwersję F (100%) i selektywność do FA (84%) uzyskano dla ultradźwięków o częstotliwości 35 kHz, stosując jako katalizator $Ba(OH)_2 \times 8 H_2O$ oraz metanol w 40°C dla stosunku molowego F:A wynoszącego 1:9.

Reakcja kondensacji F z A w fazie ciekłej jest reakcją równowagową i konwersję równowagową osiągnięto.

W produktach reakcji oprócz FA powstały ponadto DAA, FA-OH, F₂A oraz FA₂ w różnych stosunkach w zależności od sposobu prowadzenia reakcji.

W wyniku uwodornienia FA otrzymano selektywnie 4-(2-furanylo)-2-butanon – produkt stosowany głównie jako aromat w przemyśle spożywczym.

Proces szybkiej pirolizy biomasy bogatej w ksylany i impregnowanej np. ZnCl₂ (kwasem Lewisa) prowadzi do otrzymania furfuralu z dużą wydajnością w łagodnych warunkach, jak wynika z przebiegu krzywych TG/DTG ok. 250–300°C i pod ciśnieniem atmosferycznym. Na rysunku 15 zaproponowano proces otrzymywania furfuralu, który po odzyskaniu w procesie destylacji z mieszaniny biooleju mógłby być przetwarzany w procesie kondensacji aldolowej z acetonom do cennych półproduktów (np. biochemikalia i komponenty biopaliwowe).



Rys. 15. Idea procesu szybkiej pirolizy biomasy impregnowanej katalizatorem w reaktorze fluidalnym: (1) podawanie biomasy po impregnacji; (2) opary z zawiesiną pyłu trafiają do cykluonu w celu separacji cząstek stałych węgla; (3) opary trafiają na kolumnę

Literatura

- Adam J., Blazso M., Meszaros E., Stocker M., Nilsen M.H., Bouzga A., Hustad J.E., Gronli M., Oye G. 2005. *Pyrolysis of biomass in the presence of Al-MCM-41 type catalysts*, Fuel, 84: 1494–1502.
- Alen R., Kuoppala E., Oesch P. 1996. *Formation of the main degradation compound groups from wood and its components during pyrolysis*. J. Anal. Appl. Pyrol., 36: 137–148.
- Barth R., Falcone J.S., Vorce S., McLennan J., Outland B., Arnoth E. 2002. *Cobalt-silica interaction and the dehydrogenation of 2-propanol*. Catal. Commun., 3: 135–139.
- Bayerbach R., Nguyen V.D., Schurr U., Meier D. 2006. *Characterization of the water-insoluble fraction from fast pyrolysis liquids (pyrolytic lignin). Part III. Molar mass characteristics by SEC, MALDI-TOF-MS, LDI-TOF-MS, and Py-FIMS*. J. Anal. Appl. Pyrol., 77: 95–101.
- Bayerbach R., Meier D. 2009. *Characterization of the water-insoluble fraction from fast pyrolysis liquids (pyrolytic lignin). Part IV: Structure elucidation of oligomeric molecules*. J. Anal. Appl. Pyrol., 85: 98–107.
- Boutin O., Ferrer M., Lede J. 1998. *Radiant flash pyrolysis of cellulose – evidence for the formation of short life time intermediate liquid species*. J. Anal. Appl. Pyrol., 47: 13–31.

- Branca C., Di Blasi C., Galgano A. 2010. *Pyrolysis of corncobs catalyzed by zincchloride for furfural production.* Ind. Eng. Chem. Res., 49: 9743–9752.
- Burczyk B. 2009. *Biorafinerie: ile w nich chemii?* Wiadomości Chemiczne, 63: 9–10.
- Chen M.Q., Wang J., Zhang M.X., Chen M.G., Zhu X.F., Min F.F., Tan Z.C. 2008. *Catalytic effects of eight inorganic additives on pyrolysis of pine wood sawdust by microwave heating.* J. Anal. Appl. Pyrol., 82: 145–150.
- Chheda J.N., Dumesic J.A. 2007. *An overview of dehydration, aldol-condensation and hydroge-nation processes for production of liquid alkanes from biomass-derived carbohydrates.* Catalysis Today, 123: 59–70.
- Czernik S., Bridgwater A.V. 2004. *Overview of applications of biomass fast pyrolysis oil,* Energ. Fuel, 18: 590–598.
- Deutschmann R., Dekker R.F.H. 2012. *From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research.* Biotechnology Advances, 30: 1627–1640 (table 2a: 1629).
- Di Blasi C., Branca C., Galgano A. 2010. *Biomass screening for the production of furfural via thermal decomposition.* Ind. Eng. Chem. Res., 49: 2658–2671.
- Di Blasi C., Branca C., Galgano A. 2007. *Effects of diammonium phosphate on the yields and composition of products from wood pyrolysis.* Ind. Eng. Chem. Res., 46: 430–438.
- Di Blasi C., Branca C., Galgano A. 2008. *Products and global weight loss rates of wood decomposition catalyzed by zinc chloride.* Energ. Fuel, 22: 663–670.
- Encinar J.M., Beltran F.J., Ramiro A., Gonzalez J.F. 1997. *Catalyzed pyrolysis of grape and olive bagasse. Influence of catalyst type and chemical treatment.* Ind. Eng. Chem. Res., 36: 4176–4183.
- Fakhfakh N., Cognet P., Cabassud M., Lucchese Y., Días de Los Ríos M. 2008. *Stoichio-kinetic modeling and optimization of chemical synthesis: Application to the aldolic condensation of furfural on acetone.* Chem. Eng. Process, 47: 349–362.
- Frusteri F., Espro C., Arena F., Passalacqua E., Patti A., Parmaliana A. 2000. *Partial oxidation of propane on Nafion supported catalytic membranes.* Catalysis Today, 61: 37–41.
- Garcia-Perez M., Chaala A., Pakdel H., Kretschmer D., Roy C. 2007. *Characterization of bio-oils in chemical families.* Biomass and Bioenergy, 31: 222–242.
- Garcia-Perez M., Wang S., Shen J., Rhodes M., Lee W.J., Li C.Z. 2008. *Effects of temperature on the formation of lignin-derived oligomers during the fast pyrolysis of Mallee woody biomass.* Energ. Fuel, 22: 2022–2032.
- Huang W., Li H., Zhu B., Feng Y., Wang S., Zhang S. 2007. *Selective hydrogenation of furfural to furfuryl alcohol over catalysts prepared via sonochemistry.* Ultrasonic Sonochemistry, 14: 67–74.
- Huber G.W., Chheda J.N., Barrett C.J., Dumesic J.A. 2005. *Production of liquid alkanes by aqueous-phase processing of biomass-derived carbohydrates.* Science, 308: 1446–1450.
- Huber G.W., Dumesic J.A. 2006. *An overview of aqueous-phase catalytic processes for produc-tion of hydrogen and alkanes in a biorefinery.* Catalysis Today, 111: 119–132.
- Kamm B., Gruber P.P., Kamm M. (eds). 2005. *Biorefineries – industrial processes and products status quo and future directions,* Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Lanza, R., Nogare D.D., Canu P. 2009. *Gas phase chemistry in cellulose fast pyrolysis.* Ind. Eng. Chem. Res., 48: 1391–1399.
- Lin Y.C., Cho J., Tompsett G.A., Westmoreland P.R., Huber G.W. 2009. *Kinetics and mech-anism of cellulose pyrolysis.* J. Phys. Chem. C, 113: 20097–20107.
- Lu Q., Li W.Z., Zhang D., Zhu X.F. 2009. *Analytical pyrolysis-gas chromatography/mass spec-trometry (Py-GC/MS) of sawdust with Al/SBA-15 catalysts.* J. Anal. Appl. Pyrol., 84: 131–138.
- Lu Q., Xiong W.M., Li W.Z., Guo Q.X., Zhu X.F. 2009. *Catalytic pyrolysis of cellulose with sulfated metal oxides: apromising method for obtaining high yield of light furan compounds.* Bioresour. Technol., 100: 4871–4876.

- Margulis M.A., Margulis I.M. *Theory of local electrification of cavitation bubbles: new approaches.* 1999. Ultrason. Sonochem., 6: 15–20.
- Martinez-Garcia A., Ortiz M., Martínez R., Ortiz P., Reguera E. 2004. *The condensation of furfural with urea.* Industrial Crops and Products, 19: 99–106.
- Oasmaa A., Kuoppala E., Solantausta Y. 2003. *Fast pyrolysis of forestry residue. 2. Physicochemical composition of product liquid.* Energ. Fuel, 17: 433–443.
- Patwardhan P.R., Satrio J.A., Brown R.C., Shanks B.H. 2010. *Influence of inorganic salts on the primary pyrolysis products of cellulose.* Bioresour. Technol., 101: 4646–4655.
- Piskorz J., Radlein D., Scott D.S. 1986. *On the mechanism of the rapid pyrolysis of cellulose.* J. Anal. Appl. Pyrol., 9: 121–137.
- Piskorz J., Radlein D., Scott D.S., Czernik S. 1989. *Pretreatment of wood and cellulose for production of sugars by fast pyrolysis.* J. Anal. Appl. Pyrol., 16: 127–142.
- Radlein D., Grinshpun A., Piskorz J., Scott D.S. 1987. *On the presence of anhydro-oligosaccharides in the sirups from the fast pyrolysis of cellulose.* J. Anal. Appl. Pyrol., 12: 39–49.
- Schmidt R.J. 2005. *Industrial catalytic processes – phenol production.* Appl. Catal. A: General, 280: 89–103.
- Scholze B., Meier D. 2001. *Characterization of the water-insoluble fraction from pyrolysis oil (pyrolytic lignin). Part I. PY-GC/MS, FTIR, and functional groups.* J. Anal. Appl. Pyrol., 60: 41–54.
- Scholze B., Hanser C., Meier D. 2001. *Characterization of the water-insoluble fraction from fast pyrolysis liquids (pyrolytic lignin) Part II. GPC, carbonyl groups, and C-13-NMR.* J. Anal. Appl. Pyrol., 58: 387–400.
- Shafizadeh F., Lai Y.Z. 1972. *Thermal degradation of 1,6-anhydro- α -D-glucopyranose.* J. Org. Chem., 37: 278–284.
- Shi S., Guo H., Yin G. 2011. *Synthesis of maleic acid from renewable resources: Catalytic oxidation of furfural in liquid media with dioxygen.* Catalysis Communications, 12: 731–733.
- Shimada N., Kawamoto H., Saka S. 2008. *Different action of alkali/alkaline earth metal chlorides on cellulose pyrolysis.* J. Anal. Appl. Pyrol., 81: 80–87.
- Shittu A.A. 2010. *Catalytic conversion of hemicellulosic sugars into furfural in ionic liquid media.* PhD Thesis, The University of Toledo.
- Technology Roadmap. 2011. Biofuels for Transport, OECD/IEA, Paris.
- Tong X., Ma Y., Li Y. 2010. *Biomass into chemicals: Conversion of sugar to furan derivatives by catalytic processes.* Applied Catalysis A: General, 385: 1–13.
- Wan Y.Q., Chen P., Zhang B., Yang C.Y., Liu Y.H., Lin X.Y., Ruan R. 2009. *Microwave-assisted pyrolysis of biomass: catalysts to improve product selectivity.* J. Anal. Appl. Pyrol., 86: 161–167.
- West R.M., Liu Z.Y., Peter M., Gärtner Ch.A., Dumesic J.A. 2008. *Carbon-carbon bond formation for biomass-derived furfurals and ketones by aldol condensation in a biphasic system.* J. Mol. Catal. A: Chemical, 296: 18–27.
- Win D.T. 2005. *Furfural – gold from garbage.* AU Journal of Technology, 8(4): 185–190.
- Xiao-ming H., Zhang Q., Wang T.-J., Liu Q.-Y., Ma L.-L., Zhang Q. 2012. *Production of jet fuel intermediates from furfural and acetone by aldol condensation over MgO/NaY.* J. of Fuel Chem. Techn. 40(8): 973–978.
- Xing R., Subrahmanyam A.V., Olcay H., Qi W., Walsum G. P. van, Pendse H., Huber G.W. 2010. *Production of jet and diesel fuel range alkanes from waste hemicellulose-derived aqueous solutions.* Green Chem., 12: 1933–1946.
- Xinghua Z., Tiejun W., Longlong M., Chuangzhi W. 2010. *Aqueous-phase catalytic process for production of pentane from furfural over nickel-based catalysts.* Fuel, 89: 2697–2702.
- Xu W., Liu X., Ren J., Zhang P., Wang Y., Guo Y., Guo Y., Lu G. 2010. *A novel mesoporous Pd/cobalt aluminate bifunctional catalyst for aldol condensation and following hydrogenation.* Catalysis Communications, 11: 721–726.

- Xu W., Xia Q., Zhang Y., Guo Y., Wang Y., Lu G. 2011. *Effective production of octane from biomass derivatives under mild conditions.* ChemSusChem, 4(12): 1758–1761.
- Zapata P. A., Faria J., Pilar Ruiz M., Resasco D.E. 2012. *Condensation/hydrogenation of biomass-derived oxygenates in water/oil emulsions stabilized by nanohybrid catalysts.* Top Catal, 55: 38–52.
- Zeitsch K.J. 2000. *The chemistry and technology of furfural and its many by-products.* Elsevier Science.
- Zheng H-Y., Zhu Y.-L., Teng B.-T., Bai Z.-Q., Zhang Ch.-H., Xiang H.-W., Li Y.-W. 2006. *Towards understanding the reaction pathway in vapour phase hydrogenation of furfural to 2-methylfuran.* J. Mol. Catal A: Chemical, 246: 18–23.

CZEŚĆ IV

PALIWO Z GLONÓW – BIOOLEJ

12. Możliwość wykorzystania ścieków mleczarskich w procesie hodowli biomasy glonów olejowych

Marcin Dębowski, Marcin Zieliński, Mirosław Krzemieniewski

12.1. Wprowadzenie

Ograniczone zasoby paliw kopalnych oraz sukcesywnie postępujący wzrost cen typowych nośników energii sprawiły, że rośnie zainteresowanie niekonwencjonalnymi technologiami produkcji paliw. Zapotrzebowanie na rozproszone źródła energii odnawialnej wiąże się też z koniecznością zapewnienia bezpieczeństwa jej dostarczania do odbiorców końcowych, jak również ograniczeniem emisji gazów cieplarnianych i związanych z tym zjawiskiem zmian klimatycznych. Najważniejsze międzynarodowe porozumienie dotyczące ograniczania zmian klimatu, a mianowicie Protokołu z Kioto przewiduje, iż kraje Unii Europejskiej do 2020 r. ograniczą emisję gazów cieplarnianych o 20% w porównaniu do roku 1990.

Biorąc pod uwagę fakt, iż transport i komunikacja należą do głównych źródeł zanieczyszczeń powietrza, konieczne są zmiany związane z zastąpieniem paliw kopalnych biopaliwami. W związku z tym 23 kwietnia 2009 r. Parlament Europejski i Rada przyjęły dyrektywę 2009/28/WE, która ma na celu szeroko rozumiane wsparcie wykorzystania biopaliw i innych odnawialnych źródeł energii w sektorze transportu i komunikacji. Przewiduje ona 10% wzrost zużycia biokomponentów brutto do roku 2020. Oprócz wspierania produkcji i wykorzystania biopaliw, Komisja Europejska stymuluje programy badawcze związane z nowymi technologiami produkcji i wykorzystania tego rodzaju nośników energii. Jednym z kluczowych zagadnień jest opracowanie wydajnych i ekonomicznie uzasadnionych metod wytwarzania biodiesla.

Obecnie głównym surowcem wykorzystywany do produkcji biodiesla na terenie Unii Europejskiej jest rzepak. Jednak zwiększenie produkcji i zużycia

biokomponentów wytworzonych na bazie typowych roślin oleistych może prowadzić do wzrostu ilości gazów wprowadzanych do atmosfery oraz negatywnie wpływać na globalną podaż żywności i istotny wzrost jej cen. Zwiększenie obszarów pod uprawę roślin oleistych stanowi również zagrożenie dla środowiska naturalnego i może doprowadzić do zniszczenia cennych przyrodniczo siedlisk flory i fauny oraz zwiększyć ilość zanieczyszczeń wprowadzanych do gleby, wód podziemnych i powierzchniowych.

Istnieje zatem uzasadniona potrzeba poszukiwania alternatywnych źródeł biomasy, której wykorzystanie na cele energetyczne będzie uzasadnione z ekonomicznego i ekologicznego punktu widzenia. Biorąc pod uwagę bardzo wysoką efektywność fotosyntetyczną, szybkie tempo przyrostu biomasy, odporność na różnego rodzaju zanieczyszczenia oraz możliwość zagospodarowania terenów, które nie mogą zostać wykorzystane na inne cele, alternatywą dla typowych roślin energetycznych mogą być glony.

Celem badań było określenie możliwości namnażania i hodowli biomasy glonów o wysokiej zawartości oleju na bazie wybranych substratów odpadowych pochodzących z zakładów przemysłowych branży mleczarskiej, wytypowanie najwydajniejszych spośród testowanych parametrów technologicznych procesu oraz opracowanie koncepcji techniczno-technologicznej układu eksplotowanego w skali technicznej.

12.1.1. Wstęp teoretyczny

12.1.1.1. Wykorzystanie ścieków w procesach hodowli glonów

Rozwiązań technologicznych oparte na wykorzystywaniu glonów stosowane są najczęściej jako trzeci stopień oczyszczania ścieków komunalnych oraz przemysłowych w stawach tlenowych lub fakultatywnych (Oswald 2003). W procesie fotosyntezy organizmy te uwalniają $1,50\text{--}1,92 \text{ kg O}_2/\text{kg}$ wyprodukowanej biomasy, natomiast prędkość utleniania osiągnięta przy degradacji zanieczyszczeń organicznych kształtuje się w zakresie $0,48\text{--}1,85 \text{ kg O}_2/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ (Grobbelaar 2000; Muñoz i in. 2004; Dębowski i Zieliński 2009a). Asymilacja dwutlenku węgla i zwiększona produkcja tlenu przez glony może doprowadzić do dużych wahań odczynu wyrażonego zarówno w systemach otwartych (HRAP – High Rate Algae Pond), jak i fotobioreaktorach zamkniętych. Wzrost odczynu może bezpośrednio wpływać na usunięcie ze ścieków organizmów patogennych (Oswald 1995; Schumacher i in. 2003).

Glony asymilują znaczną ilość substancji biogennych zawartych w ściekach, ponieważ wymagają dużych ilości azotu i fosforu niezbędnych w procesach wewnętrzustrojowej syntezy białek, których koncentracja w suchej mase kształtuje się w granicach 20–60% w zależności od gatunku. Przyswajane

związki biogenne wykorzystywane są również do budowy kwasów nukleinowych i fosfolipidów (OSWALD 2003).

Obecnie układy technologiczne oczyszczania ścieków oparte na wykorzystaniu tych organizmów często integrowane są z systemami produkcji biomasy glonów na cele biopaliwowe i energetyczne (Dębowski i in. 2011a). Uważa się, iż tego rodzaju rozwiązania są bardziej uzasadnione z ekonomicznego i technologicznego punktu widzenia, bowiem zapewniają jednoczesne usunięcie zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych ze ścieków oraz produkcję biomasy do produkcji biopaliv (Benemann 1997; Harmelen i Oonk 2006; Munoz i Guieysse 2006; Dębowski i Zieliński 2009b). Wykorzystanie ścieków jako medium hodowanego wpływa bezpośrednio na ograniczenie kosztów ponoszonych na dostarczenie wody oraz składników pokarmowych, niezbędnych do efektywnego przyrostu biomasy glonów (Wang i in. 2008; Li i in. 2008; Dębowski i Zieliński 2009c). W prowadzonych dotychczas pracach badawczych udowodniono, iż wysoka koncentracja CO₂ w ściekach intensyfikuje tempo wzrostu biomasy glonów, co wpływa bezpośrednio na efektywność degradacji zanieczyszczeń (Lundquist 2008). W systemach opartych na wykorzystaniu wód słonych, dzięki wykorzystaniu ścieków, równoważony jest również molekularny stosunek węgla, azotu i fosforu (C:N:P = 106:16:1), tzw. stosunek Redfielda (Lundquist 2008).

W literaturze przedstawiono wiele aplikacji systemów opartych na mikroglonach w procesach oczyszczania ścieków. Sawayama i in. (1995) wykorzystali jako trzeci stopień oczyszczania ścieków układ zamknięty, w którym dominowały glony z gatunku *Botryococcus braunii*. Zastosowane rozwiązanie technologiczne pozwoliło na skuteczne usunięcie azotu i fosforu ze ścieków komunalnych odpływających z komór osadu czynnego oraz umożliwiło produkcję biomasy glonów o wysokiej koncentracji węglowodanów. Martinez i in. (2000) osiągnęli znaczne obniżenie stężenia fosforu ogólnego i azotu ogólnego w procesie oczyszczania ścieków komunalnych w systemie otwartym, w którym dominowały mikroglony z gatunku *Scenedesmus obliquus*. Gomez Villa i in. (2005) prowadzili eksperymenty w układzie pracującym w skali ułamkowo-technicznej, w którym przeważającym gatunkiem był *Scenedesmus obliquus*. Usunięcie związków azotu w tym przypadku wynosiło średnio 53% w okresie letnim, natomiast w okresie zimowym sprawność ograniczania stężenia tego wskaźnika zanieczyszczeń kształtowała się na poziomie 21%. W trakcie badań stwierdzono, iż proces wiązania fosforu przebiegał jedynie w ciągu dnia, a sprawność usunięcia tego związku zawierała się w przedziale od 45% w okresie zimowym do 73% w okresie letnim (Gomez Villa i in. 2005). Hodaifa i in. (2008) zanotowali 67,4% ograniczenie koncentracji związków organicznych charakteryzowanych wskaźnikiem BZT₅ w procesie oczyszczania ścieków przemysłowych pochodzących z ekstrakcji oliwy z oliwek. Eksploatowany układ technologiczny oparty był na

wykorzystaniu glonów z gatunku *Scenedesmus obliquus*. Yun i in. (1997) wykorzystali glony z gatunku *Chlorella vulgaris* w procesie usuwania amoniaku ze ścieków pochodzących z huty stali. Mùnoz i in. (2009) zastosowali rozwiązanie technologiczne, w którym biomasa glonów z gatunku *Chlorella vulgaris* została unieruchomiona w postaci biofilmu na elementach fotobioreaktora płytowego. W zależności od wariantu eksperymentalnego efektywność usunięcia związków organicznych charakteryzowanych wskaźnikiem BZT₅ była wyższa w zakresie 19–40% w stosunku do typowego fotobioreaktora z zawieszoną biomasą glonów.

Wiele doniesień literackich sygnalizuje możliwość wykorzystania biomasы glonów w procesach biodegradacji zanieczyszczeń trudno rozkładalnych lub toksycznych dla mikroorganizmów wchodzących w skład osadu czynnego (Chojnacka 2005; Mùnoz i Guieysse 2006). W tym przypadku bardzo istotny jest wybór właściwego gatunku, charakteryzującego się względnie wysoką odpornością na związki toksyczne, które mogą być obecne w oczyszczanych ściekach. Udowodniono, iż wymagania tego rodzaju spełniają gatunki z rodzaju *Chlorella sp.* i *Scenedesmus sp.* (Garcia i in. 2000). Glony z rodzaju *Chlorella sp.* są odporne na działanie metali ciężkich, dzięki czemu mogą być wykorzystywane w procesach oczyszczania ścieków przemysłowych (Mùnoz i in. 2003). W literaturze prezentowane są badania nad wykorzystywaniem glonów z rodzaju *Chlorella sp.* do biodegradacji tak uciążliwych ścieków, jak odcieki ze składowisk odpadów (Lin i in. 2007), ścieki z przemysłu drzewnego i papierniczego (Tarlan i in. 2002; Yewalkar i in. 2007), tekstylnego (Acuner i Dilek 2004), fenolowego (Lima i in. 2004; Essam i in. 2007) czy produkcji etanolu i kwasu cytrynowego (Valderramaa i in. 2002). *Chlorella sp.* jest wykorzystywana do oczyszczania ścieków zawierających związki organiczne, np. odcieków z komór fermentacyjnych (Ogbonna i in. 2000) czy mleczarni (Sooknah i Wilkie 2004; Bernal i in. 2008).

12.1.1.2. Wykorzystanie glonów w procesach produkcji biooleju

Dokonując wyboru gatunków glonów do produkcji oleju, należy uwzględnić przede wszystkim tempo wzrostu, ilość i jakość wytwarzanych kwasów tłuszczyowych, konkurencję z innymi mikroglonami i bakteriami oraz wytrzymałość na stres mechaniczny. Do produkcji biopaliw wykorzystuje się m.in. słodkowodne glony: *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.*, *Spirogyra sp.* oraz gatunki morskie z rodzajów *Synechococcus sp.*, *Dunaliella sp.* W tej chwili najlepsze do produkcji biopaliwa – ze względu na zawartość lipidów oraz produktywność – wydają się mikroglony z rodzaju *Chlorella* (Krzemińska i Tys 2013).

Chlorella należy do glonów, które wykorzystują głównie skrobię jako materiał zapasowy. Natomiast zawartość lipidów w komórce, w zależności od gatunku i przy standardowych warunkach hodowli, wynosi 14–30% w suchej

biomasie (Illman i in. 2000; Spolaore i in. 2006). Illman i in. (2000) analizowali wartość opałową pięciu gatunków z rodzaju *Chlorella* (*C. protothecoides*, *C. vulgaris*, *C. emersonii*, *C. sorokiniana*, *C. minutissima*). Badania udowodniły, iż obniżenie zawartości azotu w medium hodowlanym wpływa na wzrost zawartości lipidów w komórkach analizowanych gatunków, przy czym najwyższe wartości zaobserwowano dla *C. emersonii*, *C. minutissima* i *C. vulgaris*. Wartości te wyniosły odpowiednio 63%, 56% i 40% w suchej masie. Natomiast prowadzenie hodowli *C. protothecoides* w warunkach heterotroficznych pozwoliło osiągnąć zawartość tłuszczy w komórce na poziomie 57,9% w suchej masie (Miao i Wu 2004). De Bashan i in. (2002) udowodnili 4-krotny wzrost zawartości lipidów w komórce *C. vulgaris* w warunkach immobilizowania komórek glonów na nośniku alginianowym.

Bioolej może być pozyskiwany w procesie pirolizy. Proces można prowadzić jako rozkład termiczny i termochemiczne skraplanie (Demirbas 2000). Istnieje wiele doniesień literaturowych o możliwości wykorzystania pirolizy do pozyskiwania biooleju z glonów (Peng i in. 2000; Peng i in. 2001; Tsukahara i Sawayama 2005; Demirbas 2006). Miao i Wu (2004) uzyskali bioolej na drodze szybkiej pirolizy z gatunku *Chlorella protothecoides* hodowanego w warunkach heterotroficznych. Zawartość lipidów w komórkach tego gatunku wyniosła 55% s.m.

12.2. Metodyka badań

12.2.1. Pierwszy etap badań

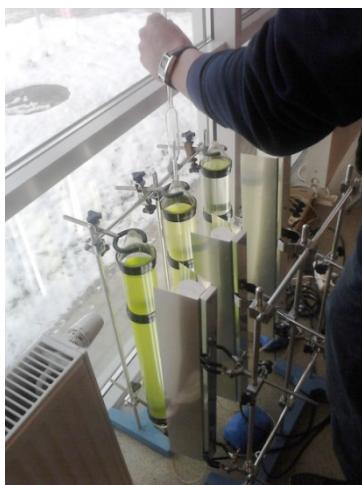
W trakcie realizacji badań założono, iż główne źródło substancji pokarmowych stanowić będą odpady pochodzące z zakładu branży mleczarskiej. W celu analizy jakościowej tego rodzaju substratu dokonywano poboru ścieków z różnych punktów ciągu technologicznego procesu przetwórstwa mleka. Analizowane ścieki pochodziły z następujących punktów ciągu technologicznego: punkt odbioru mleka sekcja mycia urządzeń technologicznych, sekcja produkcji masła, sekcja produkcji twarogu, sekcja produkcji sera żółtego, zbiornik wyrównawczy ścieków mleczarskich. Pobierano i analizowano również serwatkę z produkcji sera żółtego (serwatka słodka) oraz serwatkę z produkcji twarogu (serwatka kwaśna). W trakcie doświadczeń przeprowadzono również analizy fizyczno-chemiczne takich potencjalnych substratów, które mogą stanowić potencjalne źródło substancji pokarmowych dla biomasy mikroglonów, jak: roztwór sproszkowanego permeatu pochodzącego z ultrafiltracji serwatki słodkiej, odciek pochodzący z reaktora beztlenowego oczyszczającego ścieki mleczarskie, typowa pożywka syntetyczna stosowana w procesach namażania i hodowli biomasy glonowej spreparowana na bazie

czystych odczynników chemicznych. Zakres analiz fizyczno-chemicznych ścieków obejmował: BZT_5 , ChZT , N_{og} , N-NH_4 , P-PO_4 , P_{og} , zawiesiny ogólne oraz pH.

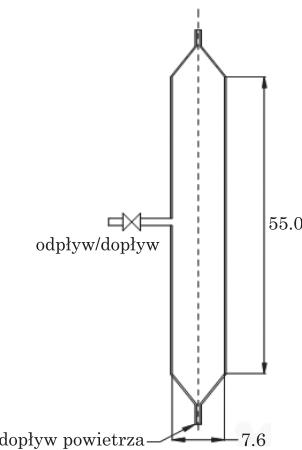
12.2.2. Drugi etap badań

W tej części prowadzono eksperymenty związane z określeniem efektywności procesu produkcji biomasy mikroglonów z wykorzystaniem wybranych substratów pokarmowych. Substraty pokarmowe zostały wytypowane na podstawie analizy wyników uzyskanych w pierwszym etapie prac badawczych.

Do namnażania testowanych mikroglonów wykorzystano fotobioreaktory rurowe o pojemności czynnej $2,5 \text{ dm}^3$. Wykonane zostały one z przezroczystego szkła organicznego o średnicy 7,6 cm i wysokości czynnej 55 cm. Od dołu do reaktorów, w sposób ciągły, doprowadzono sprężone powietrze z wydajnością $250 \text{ dm}^3/\text{h}$. Zabieg ten zapewniał odpowiednie wymieszanie medium hodowlanego, jednorodność warunków w całej objętości reaktora oraz umożliwiał wprowadzanie do hodowli CO_2 zawartego w powietrzu. Reaktory były stale naświetlane światłem białym o natężeniu wynoszącym 700 lux. Temperatura hodowli wynosiła $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Warunki termiczne były stale monitorowane poprzez zainstalowane w eksploatowanych reaktorach czujki temperatury. Eksploatowane w trakcie tej części badań fotobioreaktory zaprezentowano na rysunkach 1 i 2.



Rys. 1. Stanowisko badawcze



Rys. 2. Schemat pojedynczego reaktora

Inokulum zaszczepiającym była mieszana kultura glonów, w której 70% stanowiły glony z rodzaju *Chlorella sp.* i 30% glony z rodzaju *Scenedesmus sp.*. Początkowa zawartość suchej masy glonów w reaktorach wynosiła 540 mg s.m./dm³, w tym koncentracja suchej masy organicznej to 460 mg s.m.o./dm³. Na początku cyklu technologicznego do każdego z eksploatowanych fotobioreaktorów wprowadzono po 200 cm³ testowanych pożywek.

Badania prowadzono dla pięciu wariantów technologicznych. Jako kryterium ich wyodrębnienia przyjęto wykorzystane substancje pokarmowe:

- wariant I – pożywka na bazie odczynników chemicznych,
- wariant II – odciek z reaktora fermentacyjnego oczyszczającego ścieki mleczarskie,
- wariant III – modelowe, surowe ścieki mleczarskie spreparowane na bazie mleka w proszku,
- wariant IV – surowe ścieki mleczarskie pochodzące ze zbiornika wyrównawczego,
- wariant V – odciek z reaktora fermentacyjnego oczyszczającego ścieki mleczarskie poddany wstępnej pasteryzacji.

Charakterystykę substratów pokarmowych stosowanych podczas realizacji drugiego etapu badań zamieszczono w tabeli 1.

W trakcie prowadzonych badań analizowano efektywność przyrostu biomasy glonów, jej skład jakościowy oraz zawartość tłuszcza w pozyskiwanej biomasie (metoda Soxhleta).

Tabela 1
Charakterystyka substratów pokarmowych

Wariant	Wskaźnik								
	BZT ₅ (mg O ₂ /dm ³)	ChZT (mg O ₂ /dm ³)	BZT ₅ / ChZT	pH	zaw. og. (mg/dm ³)	N _{org} (mg/dm ³)	NNH ₄ (mg/dm ³)	P _{org} (mg/dm ³)	PPO ₄ (mg/dm ³)
I	32,11	113,26	0,28	6,19	138,53	51,84	47,43	49,98	42,31
II	319,09	633,47	0,50	7,42	418,2	229,06	207,89	62,61	49,19
III	403,12	937,02	0,43	7,89	971,21	56,07	1,23	27,19	19,54
IV	1713,42	3788,9	0,40	8,21	1026,5	53,13	7,34	40,52	21,22
V	337,19	702,05	0,48	7,39	206,13	274,93	216,86	65,04	52,03

W celu przeprowadzenia analizy ilościowej biomasy glonów próbki po utrwaleniu 4% roztworem formaliny z dodatkiem alkoholu etylowego zagęszczano (metodą sedymentacji) do objętości pozwalającej przy powiększeniu 500x oznaczyć w jednym polu widzenia mikroskopu co najmniej 10 i nie więcej niż 25–30 okazów mikroglonów. Oznaczanymi jednostkami były komórki, cenobia, kolonie i nici lub inne formy glonów – liczzone metodą kropelkową w trzech powtórzeniach. Wynik przeliczano na liczbę organizmów występujących w 1 litrze wody. Biomassę mikroglonów szacowano metodą pomiaru objętości komórek. Biomassę wyliczano z iloczynu liczebności i średniej objętości badanego taksonu oraz masy właściwej glonów równej 1 g/cm³. Koncentrację suchej masy biomasy glonów oznaczano również metodą wagową bezpośrednią wg PN-EN 872:2002. Identyfikację taksonomiczną fitoplanktonu dokonywano na podstawie preparatów nietrwałych lub półtrwałych. Analizę jakościową biomasy glonów prowadzono również przy użyciu BBE Alage OnLine Analyser firmy Moldaenke.

12.2.3. Trzeci etap badań

W tej części eksperymentu przeprowadzono prace badawcze nad namazyaniem biomasy mikroglonów z wykorzystaniem instalacji eksploatowanej w skali ułamkowo-technicznej (rys. 3). Eksperymenty przeprowadzono w fotobioreaktorze o objętości czynnej wynoszącej 3 m³. Reaktor składał się z komory reakcji i szafy sterowniczej. Fotobioreaktor został wyposażony w system mieszania, system oświetleniowy, system grzejny i izolację termiczną, system kontrolno-pomiarowy i sterowania. W eksploatowanym w trakcie eksperymentu fotobioreaktorze do zasilania systemu oświetleniowego wykorzystano zestaw czterech paneli słonecznych, monokrystalicznych Celine CL080-12 o mocy 80 W.



Rys. 3. Elementy fotobioreaktora (a, b, c – reaktor wraz z systemem baterii słonecznych zasilających system oświetleniowy, d – mieszadło łożatkowe napędzane silnikiem z motoreduktorem, e – przegroda centralna oraz mieszadło łożatkowe, f – jedna z grzałek systemu stabilizacji temperatury oraz widoczne oświetlenie diodami LED)

Substrat stosowany jako pożywka do namażania kultury glonów pochodził z reaktorów beztlenowych oczyszczających ścieki mleczarskie (tab. 2). Odciek pozyskano z modelowego systemu oczyszczania ścieków eksploatowanego przez zespół pracowników Katedry Inżynierii Ochrony Środowiska UWM w Olsztynie na terenie Zakładu Mleczarskiego należącym do grupy PHZ SM Lacpol w Łaszczowie. Odcieki stosowane w procesie namażania biomasy glonów przed wprowadzeniem do eksploatowanego fotobioreaktora poddawano pasteryzacji poprzez oddziaływanie temperatury o wartości 90°C przez 30 min.

Tabela 2
Parametry fizykochemiczne odcieku surowego pochodzącego z reaktorów oczyszczających ścieki mleczarskie oraz odcieku po termicznym przetworzeniu

Wariant	Wskaźnik								
	BZT ₅ (mg O ₂ /dm ³)	ChZT (mg O ₂ /dm ³)	BZT ₅ / ChZT	pH	zaw. og. (mg/dm ³)	N _{org} (mg/dm ³)	NNH ₄ (mg/dm ³)	P _{org} (mg/dm ³)	PPO ₄ (mg/dm ³)
Odciek z reaktora beztlenowego oczyszczającego ścieki mleczarskie									
Średnia	380,35	799,85	0,46	7,37	112,70	255,25	194,90	60,20	42,85
Min.	309,40	706,30	0,38	7,11	99,30	191,20	123,40	49,20	29,80
Max.	451,30	893,40	0,53	7,62	126,10	319,30	266,40	71,20	55,90
Odch. stand.	70,95	93,55	0,08	0,25	13,40	64,05	71,50	11,00	13,05
Odciek z reaktora beztlenowego oczyszczającego ścieki mleczarskie po pasteryzacji									
Średnia	491,95	891,15	0,50	7,24	98,15	302,75	221,95	61,74	46,50
Min.	392,60	773,10	0,39	7,03	76,99	203,40	151,30	49,87	33,80
Max.	591,30	1009,20	0,61	7,45	119,30	402,10	292,60	73,60	59,20
Odch. stand.	99,35	118,05	0,11	0,21	21,16	99,35	70,65	11,87	12,70

Podczas prowadzonych badań wstępnych do eksploatowanego reaktora pracującego w skali ułamkowo-technicznej wprowadzano 2 dm³ odcieku/m³ · dobę. Objętość czynna eksploatowanego układu technologicznego wynosiła 3 m³, zatem całkowita ilość przetworzonego termicznie odcieku wprowadzana do systemu to 6 dm³ odcieku/dobę. Zastosowane parametry technologiczne procesu przedstawiały się następująco: temperatura 20°C, prędkość mieszania 30 obr./min, system oświetleniowy pracował przez 24 h. W trakcie prowadzenia eksperymentów wykonywano analizy fizykochemiczne ścieków surowych oraz odpływających z sekwencji reaktorów beztlenowych. W trakcie eksploatacji reaktorów kontrolowano zawartość związków organicznych wyrażonych

wskaźnikami ChZT oraz BZT₅, stężenie fosforu ogólnego, ortofosforanów, azotu ogólnego, azotu amonowego, pH oraz koncentrację zawiesin.

Biomasa glonów wykorzystana do zaszczepienia reaktora eksploatowanego w skali ułamkowo-technicznej pochodziła z hodowli własnej. Analiza jakościowa składu kultur mikroglonów wskazała, iż w skład biomasy wchodziło 3,1% bakterii, 3,3% *Cyanobacteria*, 72,0% *Chlorella sp.*, 21,6% *Scenedesmus sp.*. Zawartość substancji tłuszczowych w suchej masie kształtowała się w zakresie 15,5–19,8% przy wartości średniej na poziomie 17,8%.

Wyprodukowana biomasa glonów była zagęszczana i usuwana poza układ technologiczny z wykorzystaniem bębnowego systemu mikrosit o średnicy oczek 10 µm firmy Hydrotech.

12.3. Wyniki

12.3.1. Pierwszy etap badań

Najwyższe stężenia azotu i fosforu stwierdzono w serwatkach pochodzących z produkcji twarogu i produkcji sera. Wysokie koncentracje azotu amonowego i ortofosforanów w serwacie pozwalają przypuszczać, iż mogą być to potencjalne źródła substancji pożywkowych dla mikroglonów. Czynnikiem, który ogranicza możliwość bezpośredniego zastosowania tego rodzaju substratu, jest jednak zbyt wysoka koncentracja związków organicznych. Obserwowane stężenia wskaźników ChZT, BZT₅, tłuszczy czy koncentracja LKT były wielokrotnie wyższe od innych analizowanych w trakcie badań ścieków. Znaczna zawartość substancji organicznych w pożywkach wprowadzanych do kultur glonowych wpływa negatywnie na ich rozwój i wywołuje przyrost konkurencyjnej biomasy bakteryjnej.

Z uwagi na zawartość substancji organicznych oraz związków biogennych, głównie azotu amonowego i ortofosforanów, a także biorąc pod uwagę stosunek ilościowy tych substancji, stwierdzono, iż substratem o największym potencjale zastosowania w technologii namnażania biomasy glonów jest odciek z reaktora beztlenowego oczyszczającego ścieki mleczarskie. Substrat ten charakteryzuje się niskim stężeniem związków organicznych wyrażonych wskaźnikami ChZT i BZT₅, których wartości kształtowały się na poziomie odpowiednio 633,47 mg O₂/dm³ oraz 319,09 mg O₂/dm³. Były to wartości najniższe z obserwowanych podczas charakterystyki substratów odpadowych pochodzących z przemysłu mleczarskiego. Jednocześnie w odcieku po procesie fermentacji ścieków mleczarskich zauważono bardzo wysoką zawartość azotu amonowego (207,89 mg N-NH₄/dm³) oraz ortofosforanów (49,19 mg P-PO₄/dm³). Parametry fizykochemiczne testowanych w trakcie eksperymentów substratów odpadowych pochodzących z sektora mleczarskiego zaprezentowano w tabeli 3.

Tabela 3
Wartości istotnych z punktu widzenia hodowli biomasy glonów parametrów substratów odpadowych pochodzących z zakładu branży mleczarskiej

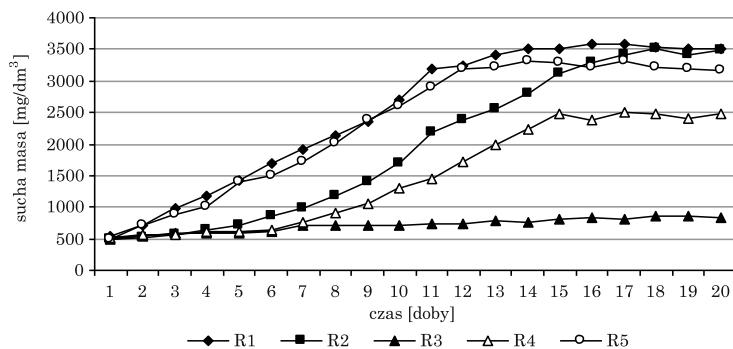
Substrat	Wartość	BZT ₅ (mg O ₂ /dm ³)	ChZT (mg O ₂ /dm ³)	pH	Zawiesiny (mg/dm ³)	N _{org} (mg/dm ³)	N-NH ₄ (mg/dm ³)	P _{org} (mg/dm ³)	PPO ₄ (mg/dm ³)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Punkt odbioru mleka	średnia	941,08	2045,93	7,40	701,50	53,67	3,99	21,48	8,04
	SD	742,78	1414,12	1,90	338,52	40,79	1,57	20,67	8,67
Selekja mycia urządzeń technologicznych	średnia	4092,08	15254,57	10,13	3703,33	273,33	9,42	83,95	51,82
	SD	1801,21	7978,17	2,75	2342,07	197,04	7,07	47,88	31,02
Selekcja produkcji masta	średnia	1945,42	7084,64	11,84	5178,00	210,79	7,35	53,19	16,16
	SD	1029,16	5682,05	1,51	2336,45	252,06	5,31	66,29	17,89
Selekcja produkcji twarogu	średnia	2804,42	15903,20	7,16	3782,58	403,48	26,87	217,68	156,59
	SD	959,38	6448,50	2,64	1763,98	180,32	18,49	105,32	68,26
Selekcja produkcji sera żółtego	średnia	3013,92	13786,17	7,79	854,78	425,04	14,78	119,73	80,15
	SD	1241,18	3926,57	2,43	374,16	137,55	10,53	52,64	25,39
Serwatka pochodząca z produkcji twarogu	średnia	28677,00	56363,67	5,24	8251,67	989,20	61,57	717,65	516,83
	SD	8385,57	7166,37	0,71	2853,31	286,72	33,81	127,57	76,21
Serwatka pochodząca z produkcji sera żółtego	średnia	29002,50	69974,58	5,88	7352,25	1376,01	40,67	515,58	309,81
	SD	8835,39	9540,09	0,84	1678,39	71,68	32,08	46,91	49,51

cd. tabeli 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zbiornik wyrównawczy ścieków mleczarskich	średnia	1713,42	3788,93	8,21	1026,50	53,13	7,34	40,52	21,22	
	SD	942,79	1795,56	2,46	542,07	24,73	3,38	19,17	9,37	
Modelowe ścieki mleczarskie preparowane na bazie mleka w proszku	średnia	403,12	937,02	7,89	971,21	56,07	1,23	27,19	19,54	
	SD	54,26	56,06	0,10	147,08	6,34	0,48	2,29	1,79	
Roztwór sproszkowanego perneatu po ultrafiltracji serwatkii słodkiej (0,1%)	średnia	1030,12	1450,95	6,61	2349,12	48,43	3,14	48,65	4,42	
	SD	24,78	122,64	0,17	698,75	4,57	0,27	3,68	0,20	
Odciek z reaktora beztlenowego oczyszczającego ścieki mleczarskie	średnia	319,09	633,47	7,42	418,2	229,06	207,89	62,61	49,19	
	SD	34,05	45,78	0,18	37,42	20,06	30,34	6,57	6,17	
Odczynniki chemiczne	średnia	32,11	113,26	6,19	138,53	51,84	47,43	49,98	42,31	
	SD	1,95	3,72	0,12	8,13	3,65	3,07	3,03	3,23	

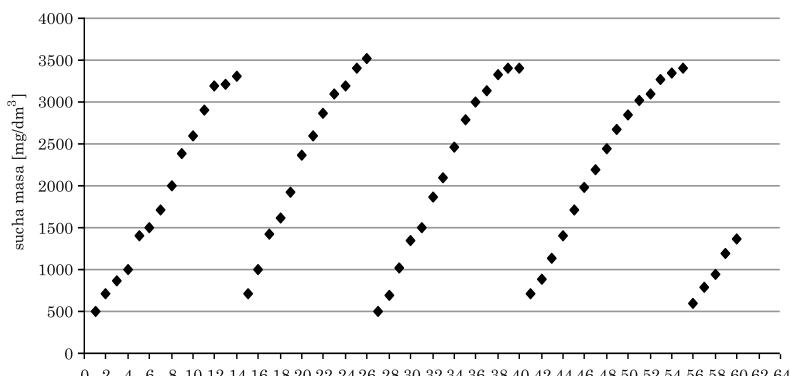
12.3.2. Drugi etap badań

Uzyskana koncentracja oraz szybkość przyrostu biomasy glonów była zależna bezpośrednio od testowanych substratów pokarmowych i kształtowała się w zakresie od 842,9 mg s.m./dm³ w przypadku stosowania modelowych ścieków mleczarskich do 3521,2 mg s.m./dm³ w przypadku wykorzystania typowej pożywki dla hodowli glonów (rys. 4).



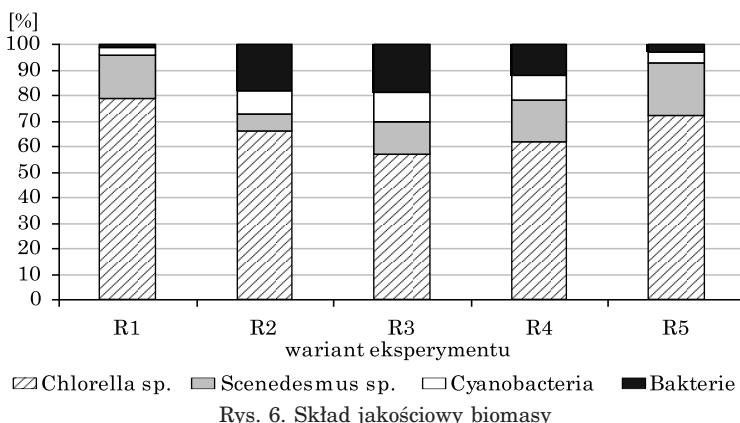
Rys. 4. Zmiany koncentracji biomasy glonów w fotobioreaktorach w zależności od wariantu technologicznego

Najwyższe efekty technologiczne uzyskano w wariantie, w którym jako substrat pożywkowy w procesie namażania biomasy glonów zastosowano odciek z reaktora beztlenowego oczyszczającego ścieki mleczarskie, który poddano procesowi wstępnej pasteryzacji. W tym przypadku uzyskana koncentracja biomasy glonów w fotobioreaktorze wynosiła ok. 3490 mg s.m./dm³, natomiast średnia szybkość przyrostu glonów kształtowała się na poziomie 176 mg s.m./dm³ · d (rys. 5).



Rys. 5. Zmiany koncentracji suchej masy biomasy glonów przy zastosowaniu jako pożywki odcieku z reaktora beztlenowego oczyszczającego ścieki mleczarskie po wstępnej pasteryzacji (20 min/temp. 90°C)

Uzyskane wysokie sprawności namnażania biomasy glonów spowodowane były składem jakościowym testowanego medium, tzn. relatywnie niskim stężeniem związków organicznych oraz wysokimi stężeniami azotu w formie amonowej i fosforu mineralnego. Stwierdzono, iż wprowadzenie do ciągu technologicznego procesu pasteryzacji odcieku po procesie beztlenowego oczyszczania ścieków mleczarskich skutkowało ograniczeniem ilości bakterii w namnażanej biomasie od 18,3% do 3,1%. Zabieg ten wpłynął istotnie na zwiększenie udziału glonów z rodzaju *Chlorella sp.* od poziomu 66,7% w przypadku testowania odcieku surowego do wartości 72% po zastosowaniu procesu pasteryzacji (rys. 6). Średnia zawartość oleju w namnażanej biomasie glonów mieściła się w przedziale od 21,3% w układzie technologicznym, w którym wykorzystywano pożywkę syntetyczną do 9,4% w przypadku testowania modelowych ścieków mleczarskich (tab. 4).



Rys. 6. Skład jakościowy biomasy

Tabela 4
Procentowa zawartość oleju w biomasie pozyskiwanej z fotobioreaktorów
w zależności od wariantu eksperymentu

Wartość	Wariant eksperymentu				
	I	II	III	IV	V
Średnia	21,3	12,9	9,4	11,2	17,8
Minimum	18,1	11,2	6,3	9,4	19,8
Maximum	23,7	15,1	10,6	13,1	15,3
Odchylenie std.	2,8	2,0	2,2	1,9	2,3

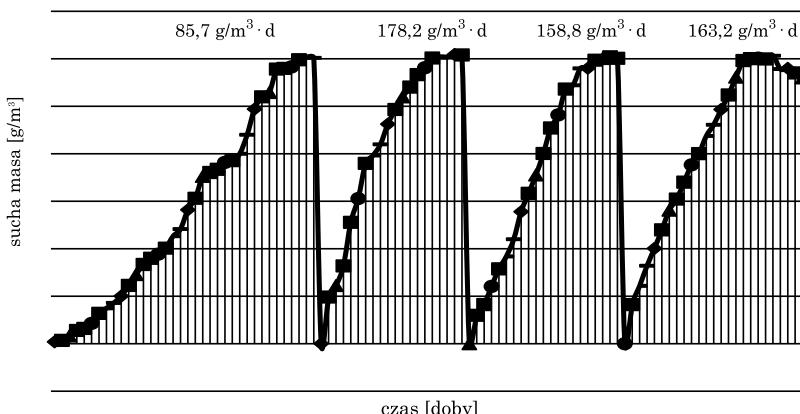
12.3.3. Trzeci etap badań

Początkowa koncentracja biomasy w eksploatowanym fotobioreaktorze wynosiła 19,6 mg s.m./dm³. Po 26 dniach zatrzymania w układzie technologicznym uzyskano koncentrację biomasy na poziomie 1999,6 mg s.m./dm³. Stwierdzono, iż średnia prędkość przyrostu biomasy przy zastosowanych parametrach technologicznych prowadzenia procesu to 76,1 mg s.m./m³·d.

Zawartość substancji tłuszczowych w suchej masie oznaczanych metodą ekstrakcji oscylowała się w zakresie 14,3–21,3%. Wartość średnia kształtowała się na poziomie 18,05%. W trakcie prowadzenia badań wstępnych i rozruchu technologicznego instalacji pracującej w skali ułamkowo-technicznej analizowano tempo wykorzystywania dozowanych do układu technologicznego substancji pożywkowych oraz wartości monitorowanych wskaźników na odpływie z reaktora. Przeprowadzone badania udowodniły, iż substancje biogenne były praktycznie całkowicie eliminowane z układu technologicznego i wykorzystywane na przyrost biomasy glonów. Sprawność usunięcia związków azotu i fosforu we wszystkich przypadkach przekraczała 97%. Koncentracja związków organicznych charakteryzowanych wskaźnikami ChZT i BZT₅ była ograniczana z efektywnością oscylującą blisko 90%.

Wartości uzyskiwanych efektów technologicznych związanych z wykorzystywaniem substancji pokarmowych, przyrostem biomasy mikroglonów oraz zawartością oleju w biomasie w okresie wpracowania fotobioreaktora eksploatowanego w skali ułamkowo-technicznej zaprezentowano w tabelach 5 i 6.

Poniżej w tabeli 7 oraz na rysunku 7 przedstawiono wyniki uzyskane w dalszym okresie eksploatacji reaktora pracującego w skali ułamkowo-technicznej, związane ze sprawnością eliminacji zanieczyszczeń z odcieku, przyrostem biomasy glonów oraz składem taksonomicznym uzyskanej biomasy.



Rys. 7. Zmiany koncentracji suchej masy biomasy glonów w trakcie eksploatacji reaktora pracującego w skali ułamkowo-technicznej

Tabela 5

Zestawienie wyników badań związanych z przyrostem biomasy glonów oraz zawartością oleju uzyskanych podczas eksploatacji reaktora w skali ułamkowo-technicznej (okres wpracowania)

Dzień	Koncen- tracja biomasy (mg/dm ³)	Zawar- tość oleju (%)	Dawka odcieku (dm ³ /d)	Tempera- tura w reak- torze (°C)	Parametry pożywki (mg/dm ³)					
					ChZT	BZT ₅	N _{og}	N-NH ₄	P _{og}	P-PO ₄
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	19,6	14,3	6,0	20,0	799,3	404,5	181,3	144,9	47,8	31,6
2	34,8	14,3	6,0	20,0	799,3	404,5	181,3	144,9	47,8	31,6
3	81,3	15,1	6,0	20,0	799,3	404,5	181,3	144,9	47,8	31,6
4	139,6	15,3	6,0	20,0	799,3	404,5	181,3	144,9	47,8	31,6
5	161,3	15,9	6,0	20,0	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5
6	213,9	14,6	6,0	20,0	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5
7	319,7	15,7	6,0	20,0	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5
8	372,6	17,2	6,0	20,0	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5
9	429,4	18,1	6,0	20,0	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5
10	501,3	21,3	6,0	20,0	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5
11	613,8	19,6	6,0	20,0	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1
12	728,1	19,2	6,0	20,0	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1
13	834,6	20,1	6,0	20,0	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1
14	899,4	21,3	6,0	20,0	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1
15	943,1	19,8	6,0	20,0	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1
16	106,2	19,6	6,0	20,0	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1
17	1131,6	18,2	6,0	20,0	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1
18	1207,1	18,7	6,0	20,0	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4
19	1409,6	18,3	6,0	20,0	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4
20	1531,1	18,0	6,0	20,0	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4
21	1762,3	18,6	6,0	20,0	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4
22	1802,5	18,9	6,0	20,0	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4
23	1836,7	17,4	6,0	20,0	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4
24	1908,9	18,9	6,0	20,0	813,6	431,7	201,1	155,1	62,8	38,9
25	1927,4	18,3	6,0	20,0	813,6	431,7	201,1	155,1	62,8	38,9
26	1999,6	18,7	6,0	20,0	813,6	431,7	201,1	155,1	62,8	38,9

Tabela 6

Zestawienie wyników badań związanych ze wskaźnikami usuwanych zanieczyszczeń z testowanego odcinka uzyskanych podczas eksploatacji reaktora w skali utamkowo-technicznej (okres wpracowania)

Dzień	Parametry pożywki (mg/dm ³)						Parametry odpływu z reaktora (mg/dm ³)					
	ChZT	BZT5	N _{org}	N-NH ₄	P _{org}	P-PO ₄	ChZT	BZT5	N _{org}	N-NH ₄	P _{org}	P-PO ₄
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	799,3	404,5	181,3	144,9	47,8	31,6	81,3	29,5	3,7	1,3	1,1	0,4
2	799,3	404,5	181,3	144,9	47,8	31,6	82,5	33,7	4,9	1,7	0,9	0,6
3	799,3	404,5	181,3	144,9	47,8	31,6	79,1	38,2	3,9	2,1	1,2	0,3
4	799,3	404,5	181,3	144,9	47,8	31,6	88,2	34,8	3,1	2,3	1,1	0,3
5	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5	73,7	37,1	5,7	2,0	1,0	0,4
6	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5	79,0	30,7	6,0	1,9	0,9	0,2
7	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5	81,3	33,9	5,9	2,4	0,9	0,3
8	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5	84,6	29,6	5,2	1,7	1,4	0,4
9	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5	73,5	28,1	7,1	1,7	1,5	0,4
10	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5	69,9	38,2	6,8	1,9	1,4	0,5
11	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1	70,3	41,0	6,3	2,0	1,6	0,7
12	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1	73,3	37,2	6,1	2,3	1,2	0,5
13	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1	76,1	33,9	6,9	2,2	1,1	0,4
14	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1	80,2	35,5	7,4	2,1	1,4	0,3
15	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1	77,3	30,0	7,2	2,7	1,6	0,7

cd. tabeli 6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
16	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1	83,1	29,1	7,8	3,0	2,1	0,6	
17	809,7	399,8	181,9	139,7	59,9	40,1	73,1	31,6	8,2	3,1	1,3	0,8	
18	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4	79,6	29,1	6,9	2,7	1,7	0,8	
19	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4	77,8	30,4	7,6	2,3	1,6	1,0	
20	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4	80,8	34,7	8,0	2,8	1,4	0,9	
21	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4	86,2	39,8	7,9	3,2	1,4	0,9	
22	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4	81,7	36,2	8,1	3,1	1,7	0,8	
23	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4	84,3	40,9	8,3	3,3	1,3	0,6	
24	813,6	431,7	201,1	155,1	62,8	38,9	80,1	37,1	9,4	3,0	1,2	0,5	
25	813,6	431,7	201,1	155,1	62,8	38,9	76,3	33,9	10,2	2,7	1,1	0,6	
26	813,6	431,7	201,1	155,1	62,8	38,9	74,9	35,6	9,8	2,4	1,6	0,7	

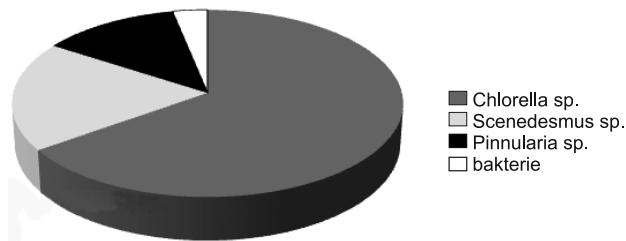
Tabela 7
 Wartości wskaźników związków biogennych i organicznych w stosowanej pozywie
 i w odpływie z reaktora przez cały okres eksploatacji

Dzień	Parametry pożywki (mg/dm ³)					Parametry odpływu z reaktora (mg/dm ³)						
	ChZT	BZT5	N _{og}	N-NH ₄	P _{og}	P-PO ₄	ChZT	BZT5	N _{og}	N-NH ₄	P _{og}	P-PO ₄
1	799,3	404,5	281,3	244,9	68,8	51,6	81,3	19,5	3,7	1,3	1,1	0,4
10	824,3	419,3	163,4	137,1	64,2	43,5	69,9	38,2	6,8	1,9	1,4	0,5
20	789,6	406,3	203,6	152,2	64,2	47,4	80,8	34,7	8,0	2,8	1,4	0,9
30	789,6	406,3	303,6	252,2	74,2	57,4	79,6	19,1	3,9	2,7	1,7	0,8
40	813,6	431,7	301,1	255,1	72,8	58,9	80,1	27,1	3,4	3,0	1,2	0,5
50	806,1	400,7	296,2	271,2	69,1	56,3	84,6	19,6	2,2	1,7	1,4	0,4
60	813,9	411,8	301,2	269,4	72,3	49,9	73,5	18,1	2,1	1,7	1,5	0,4
70	802,2	399,2	288,9	243,5	70,9	58,2	69,9	18,2	2,8	1,9	1,4	0,5
80	793,4	417,3	295,7	260,6	68,3	44,4	79,6	19,1	2,9	2,7	1,7	0,8
90	799,1	397,7	299,9	277,2	69,9	50,8	73,3	17,2	3,1	2,3	1,2	0,5
100	804,5	399,8	281,9	239,7	59,9	40,1	76,1	13,9	3,4	2,2	1,1	0,4
Uzyskana sprawność usunięcia zanieczyszczeń (%)					91,8	97,1	98,8	99,3	98,7	99,2		

Na rysunkach 8 i 9 zaprezentowano również dokumentację fotograficzną przedstawiającą eksploatację reaktora oraz skład taksonomiczny biomasy.



Rys. 8. Reaktor w trakcie eksploatacji



Rys. 9. Skład taksonomiczny biomasy

12.4. Dyskusja

Biomasa glonów może być potencjalnym źródłem wielu rodzajów biopaliw. Zaliczyć do nich można biogaz powstający w procesach beztlenowego rozkładu biomasy, biodiesel produkowany z lipidów kumulowanych w komórkach glonów, wodór pochodzący z przemian fotobiologicznych, ewentualnie pozykiwana biomasa może być przeznaczona do bezpośredniego spalania (Patil i in. 2008; Li i in. 2008; Pienkos i Drzins 2009).

W przeprowadzonych dotychczas badaniach stwierdzono, iż wiele szczećów mikroalg posiada zdolności do kumulowania znacznej ilości lipidów w komórkach – nawet do 20–50% suchej masy. Istnieją również doniesienia, które dokumentują technologie pozwalające na stymulowanie i intensyfikowanie procesu magazynowania związków tłuszczowych poprzez kontrolę stężenia związków azotu w medium hodowlanym, optymalizację sposobu dostarczania energii świetlnej, sterowania warunkami temperaturowymi oraz koncentracją CO₂ (Qin 2005; De Moraes 2007; Hu i in. 2008; Chiu i in. 2009).

Dotychczasowe badania udowodniły, iż skutecznym sposobem wpływającym nie tylko na zwiększenie poziomu kumulacji lipidów w komórkach mikroglonów, lecz również na ich skład jakościowy (głównie pod kątem zawartości trójglicerydów) jest limitowanie koncentracji azotu w medium hodowlanym (Widjaja i in. 2009; Meng i in. 2009). Kumulacja trójglicerydów ma istotne znaczenie w przypadku konwersji oleju pozyskanego z biomasy glonów do biodiesla (Meng i in. 2009).

W badaniach przeprowadzonych w ramach realizacji projektu strategicznego w celu namnożenia biomasy glonów o wysokiej koncentracji oleju wykorzystano odciek pochodzący z komór fermentacyjnych. Zastosowanie tego rodzaju odpadu ograniczało możliwość stymulowania procesu kumulowania biooleju w komórkach glonów poprzez limitowanie dostępu do związków azotu. Związki azotu, głównie w formie amonowej, występowały w wysokich stężeniach w tego rodzaju substracie pożywkowym. Zbyt wysoka koncentracja azotu w pożywce była prawdopodobnie przyczyną osiągniętego poziomu zawartości biooleju w biomasie na poziomie bliskim 20%.

Wu i Hsieh (2008) analizowali wpływ zasolenia, stężenia azotu i intensywności światła na wydajność produkcji lipidów. Udowodniono, iż w wariantach optymalnych koncentracja związków tłuszczowych w komórkach mikroglonów była wyższa o ponad 76% w stosunku do hodowli prowadzonej w warunkach konwencjonalnych. Weldy i Huesemann (2007) stwierdzili, iż limitowanie ilości związków azotu w medium hodowlanym wpływa bezpośrednio na wzrost procentowej zawartości lipidów w komórkach mikroglonów, a jednocześnie obniża tempo przyrostu biomasy. Udowodniono, iż w przypadku testowania pełnowartościowej pożywki ilość produkowanych lipidów kształtała się na poziomie $0,46 \text{ g/dm}^3 \cdot \text{d}$, natomiast w wariantie ograniczonego dostępu do związków azotu wynosiła $0,12 \text{ g/dm}^3 \cdot \text{d}$. Chiu i in. (2009) udowodnili, iż utrzymanie koncentracji CO_2 na poziomie 2% było wariantem optymalnym pod kątem kumulowania lipidów przez glony z gatunku *Nannochloropsis oculata*. Wydajność przyrostu biomasy glonów kształtała się w granicach $0,46 \text{ g/dm}^3 \cdot \text{d}$, natomiast produktywność lipidów wynosiła od $0,14 \text{ g/dm}^3 \cdot \text{d}$ do $0,46 \text{ g/dm}^3 \cdot \text{d}$.

Istotnym elementem warunkującym opłacalność produkcji biopaliva jest opracowanie ekonomicznie uzasadnionych technologii separacji i zagęszczania biomasy glonów oraz metod pozyskiwania oleju (Li i in. 2008). Ważnym czynnikiem, który bezpośrednio wpływa na jakość oraz ilość pozyskiwanego oleju, jest temperatura procesu ekstrakcji (Widjaja i in. 2009). Prowadzenie procesu w temperaturze do 60°C pozwala na zachowanie wysokiej koncentracji trójglicerydów w oleju oraz ogranicza straty oleju. W pracach realizowanych w ramach projektu strategicznego proces separacji biomasy glonów skutecznie prowadzono metodami koagulacji, mikrofiltracji oraz z wykorzystaniem technik membranowych.

12.5. Podsumowanie i wnioski

Biorąc pod uwagę charakterystykę i skład produktów odpadowych pochodzących z zakładów branży mleczarskiej analizowanych podczas realizacji projektu, stwierdzono, iż najlepszymi właściwościami pod kątem wykorzystania w procesach produkcji biomasy glonów charakteryzują się odcieki pochodzące z reaktora beztlenowego oczyszczającego ścieki mleczarskie. Zastosowanie tego rodzaju substratu pozywkowego pozwoliło na uzyskanie koncentracji biomasy glonów na poziomie 3490 mg s.m./dm³ przy średniej szybkości przyrostu glonów wynoszącej 176 mg s.m./dm³·d w fotobioreaktorze eksploatowanym w warunkach laboratoryjnych. Średnia zawartość oleju w namażanej biomasie glonów była bliska wartości 20%.

Na podstawie eksperymentów prowadzonych w skali laboratoryjnej oraz badań wstępnych realizowanych w skali ułamkowo-technicznej opracowano wytyczne do budowy oraz skonstruowano instalację pilotową. W prototypowym reaktorze uzyskana koncentracja biomasy glonów wyniosła ok. 3000 mg s.m./dm³. Stwierdzono, iż średnia prędkość przyrostu biomasy przy zastosowanych parametrach technologicznych prowadzenia procesu to 160 mg s.m./dm³ d. Zawartość oleju w pozyskiwanej biomasie to ok. 19%.

Literatura

- Acuner E., Dilek F.B. 2004. *Treatment of tectilon yellow 2G by Chlorella vulgaris*. Process Biochemistry, 39: 623–631.
- Benneman J.R. 1997. *CO₂ mitigation with microalgae systems*. Energy Convers. Mgmt., 38: 475–479.
- Bernal C.B., Vasquez G., Quintal I.B., Bussy A.L. 2008. *Microalgal dynamics in batch reactors for municipal wastewater treatment containing dairy sewage water*. Water Air Soil Pollut., 190: 259–270.
- Chisti Y. 2007. *Biodiesel from microalgae*. Biotechnol. Adv., 25: 294–306.
- Chiu S.-Y., Kao C.-Y., Tsai M.-T., Ong S.-C., Chen C.-H., Lin C.-S. 2009. *Lipid accumulation and CO₂ utilization of Nanochloropsis oculata in response to CO₂ aeration*. Bioresource Technology, 100(2): 833–841.
- Chojnacka K., Chojnacki A., Gorecka H., 2005. *Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae Spirulina sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process*. Chemosphere, 59: 75–84.
- De Morais M.G., Costa J.A.V. 2007. *Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide*. Energy Conversion and Management, 48(7): 2169–2173.
- De-Bashan L.E., Bashan Y., Moreno M., Lebsky V.K., Bustillos J.J. 2002. *Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae Chlorella spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium Azospirillum brasiliense*. Can. J. Micro., 48: 514–521.
- Dębowski M., Krzemieniewski M., Zieliński M. 2011. *Energetyka alternatywna*. Wydawnictwo Dolnośląskiej Wyższej Szkoły Przedsiębiorczości i Techniki, Polkowice. 15-25: *Alg perspektywicznym źródłem biopaliw o różnej charakterystyce i właściwościach. Metody hodowli, ekonomika procesu*.

- Dębowski M., Zieliński M., Krzemieniewski M. 2009a. Wpływ składu jakościowego substratów oraz obciążenia komory ładunkiem związków organicznych na skład i ilość uzyskiwanego biogazu. Roczniki Ochrony Środowiska, 11: 1179–1190.
- Dębowski M., Krzemieniewski M., Zieliński M., 2009b, *The effect of microwave radiation on methane fermentation in mesophilic conditions*. Pol. J. Env. Stud., 18, 3A: 65–69.
- Dębowski M., Zieliński M. 2009c. Systemy technologiczne oczyszczania ścieków z wykorzystaniem biomasy glonowej. Woda i Ścieki – Prawny Serwis Informacyjno-Doradczy, 10: 7–10.
- Demirbas A. 2000. *Mechanisms of liquefaction and pyrolysis reactions of biomass*. Energy Conversion and Management, 41: 633–646.
- Demirbas A., 2006. *Oily products from mosses and algae via pyrolysis*. Energy Sources Part A-Recovery Utilization and Environmental Effects, 28: 933–940.
- Essam T., Magdy A.A., El Tayeb O., Mattiasson B., Guieyse B. 2007. *Solar-based detoxification of phenol and p-nitrophenol by sequential TiO₂ photocatalysis and photosynthetically aerated biological treatment*. Water Res., 41: 1697–1704.
- Garcia J., Mujeriego R., Hernandez-Marine M. 2000. *High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal*. J. Appl. Phycol., 12: 331–339.
- Gomez Villa H., Voltolina D., Nieves M., Pina P. 2005. *Biomass production and nutrient budget in outdoor cultures of Scenedesmus obliquus (chlorophyceae) in artificial wastewater, under the winter and summer conditions of Mazatlán, Sinaloa, Mexico*. Vie et milie, 55(2): 121–126.
- Grobelaar J.U. 2000. *Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures*. J. Appl. Phycol., 12: 201–206.
- Harmelen van T., Oonk H. 2006. *Microalgae biofixation processes: applications and potential contributions to greenhouse gas mitigation options*. Apeldoorn, The Netherlands: International Network on Biofixation of CO₂ and Greenhouse Gas Abatement with Microalgae.
- Hodaifa G., Martinez M.E., Sanchez S. 2008. *Use of industrial wastewater from oliveoil extraction for biomass production of Scenedesmus obliquus*. Bioresource Technology, 99(5): 1111–1117.
- Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M.L., Posewitz M.C., Seibert M. 2008. *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production*. The Plant Journal, 54: 621–639.
- Illman A., Scragg A., Shales S. 2000. *Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium*. Enzyme Microb. Technol., 27: 631–635.
- Krzemińska I., Tys J. 2013. *Pozytyczny stres glonów*. Akademia, 1(33): 30–31.
- Li Y., Horsman M., Wu N., Lan C., Dubois-Calero N. 2008. *Biofuels from microalgae*. Biotechnology Progress, 24(4): 815–820.
- Lima S.A.C., Raposo M.F.J., Castro P.M.L., Morais R.M. 2004. *Biodegradation of p-chlorophenol by a microalgae consortium*. Water Res., 38: 97–102.
- Lin L., Chan G.Y.S., Jiang B.L., Lan C.Y. 2007. *Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment*. Waste Management, 27: 1376–1382.
- Lundquist T.J. 2008. *Production of algae in conjunction with wastewater treatment*. In: NREL-AFOSR workshop on algal oil for jet fuel production.
- Martinez M.E., Sa'ñchez S., Jiménez J.M., El Yousfi F., Muñoz L. 2000. *Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga Scenedesmus obliquus*. Bioresource Technology, 73(3): 263–272.
- Meng X., Yang J., Xu X., Zhang L., Nie Q., Xian M. 2009. *Biodiesel production from oleaginous microorganisms*. Renewable Energy, 34(1): 1–5.
- Miao X.L., Wu Q.Y. 2004. *High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of Chlorella protothecoides*. J. Biotechnol., 110: 85–93.
- Muñoz R., Guieyse B. 2006. *Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review*. Water Research, 40(15): 2799–2815.
- Muñoz R., Köllner C., Guieyse B. 2009. *Biofilm photobioreactors for the treatment of industrial wastewaters*. Journal of Hazardous Materials, 161(1): 29–34.
- Muñoz R., Köllner C., Guieyse B., Mattiasson B. 2003. *Salicylate biodegradation by various algal-bacterial consortia under photosynthetic oxygenation*. Biotechnol. Lett., 25: 1905–1911.

- Múnoz R., Köllner C., Guiyesse B., Mattiasson B. 2004. *Photosynthetically oxygenated salicylate biodegradation in a continuous stirred tank photobioreactor*. Biotechnol. Bioeng., 87(6): 797–803.
- Ogbonna J.C., Tanaka H. 2000. *Light requirement and photosynthetic cell cultivation – development of processes for efficient light utilization in photobioreactors*. J. Appl. Phycol., 12: 207–218.
- Oswald W.J. 1995. *Ponds in the twenty-first century*. Water Sci. Technol., 31: 1–8.
- Oswald W.J. 2003. *My sixty years in applied algology*. J. Appl. Phycol., 15: 99–106.
- Patil V., Tran K.-Q., Giselrad H.R. 2008. *Towards sustainable production of biofuels from microalgae*. International Journal of Molecular Sciences, 9(7): 1188–1195.
- Peng W.M., Wu Q.Y., Tu P.G. 2000. *Effects of temperature and holding time on production of renewable fuels from pyrolysis of Chlorella protothecoides*. Journal of Applied Phycology, 12: 147–152.
- Peng W.M., Wu Q.Y., Tu P.G. 2001. *Pyrolytic characteristics of heterotrophic Chlorella protothecoides for renewable bio-fuel production*. Journal of Applied Phycology, 13: 5–12.
- Pienkos P., Darzins A. 2009. *The promise and challenges of microalgal-derived biofuels*. Biofuels Bioprod. Biorefin., 3(4): 431–440.
- Qin J. 2005. *Bio-hydrocarbons from algae—impacts of temperature, light and salinity on algae growth*. Barton, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation.
- Sawayama S., Inoue S., Dote Y., Yokoyama S.-Y. 1995. *CO₂ fixation and oil production through microalgae*. Energy Conversion and Management, 36(69): 729–731.
- Sooknah R.D., Wilkie A.C. 2004. *Nutrient removal by floating aquatic macrophytes cultured in anaerobically digested flushed dairy manure wastewater*. Ecological Engineering, 22: 27–42.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. 2006. *Commercial applications of microalgae*. J. Biosci. Bioeng., 101: 87–96.
- Tarlan E., Dilek F.B., Yetis U. 2002. *Effectiveness of algae in the treatment of a wood-based pulp and paper industry wastewater*. Biores. Technol., 84: 1–5.
- Tsukahara K., Sawayama S. 2005. *Liquid fuel production using microalgae*. Journal of the Japan Petroleum Institute, 48: 251–259.
- Valderrama L.T., Del Campoa C.M., Rodrigueza C.M., De-Bashan L.E., Bashan Y. 2002. *Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga Chlorella vulgaris and the macrophyte Lemna minuscula*. Water Res., 36: 4185–4192.
- Wang B., Li Y., Wu N., Lan C. 2008. *CO₂ bio-mitigation using microalgae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 79(5): 707–718.
- Weldy C.S., Huesemann M. 2007. *Lipid production by Dunaliella salina in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity*. US Department of Energy Journal of Undergraduate Research, 7(1): 115–122.
- Widjaja A., Chien C.-C., Ju Y.-H. 2009. *Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 40(1): 13–20.
- Wu W.-T., Hsieh C.-H. 2008. *Cultivation of microalgae for optimal oil production*. Journal of Biotechnology, 136(1): 521–1521.
- Yewalkar S.N., Dhumal K.N., Sainis J.K. 2007. *Chromium (VI)-reducing Chlorella spp. isolated from disposal sites of paper-pulp and electroplating industry*. J. Appl. Phycol., 19: 459–465.
- Yun Y.-S., Lee S.B., Park J.M., Lee C.-I., Yang J.-W. 1997. *Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 69(4): 451–455.

13. Wytwarzanie i badanie właściwości biodiesla otrzymanego z oleju glonowego

Ryszard Michalski, Jarosław Gonera, Michał Janulin

13.1. Wprowadzenie

Do produkcji biodiesla zwykle wykorzystywane są wodne jednokomórkowe glony zielone, które charakteryzują się wysokimi wskaźnikami wzrostu i wysoką populacją – w dobrych warunkach ulegają podwojeniu w ciągu 24 h i mogą zawierać ponad 50% tłuszczów. Wysoka wydajność i gęstość biomasy jest korzystna dla produkcji biodiesla (Spolaore i in. 2006). Ponadto roczna wydajność oleju z alg jest dużo większa niż roślin nasiennych. Sposób jego wytwarzania wymaga światła, dwutlenku węgla, wody i nieorganicznych składników odżywcznych, głównie azotanów, fosforanów, żelaza i pierwiastków śladowych. Około połowę suchej masy mikroalg stanowi biomasa węgla, który zwykle pochodzi z dwutlenku węgla (Sanchez Miron i in. 2003). Optymalna temperatura do uprawy wielu mikroalg to 293–303 K.

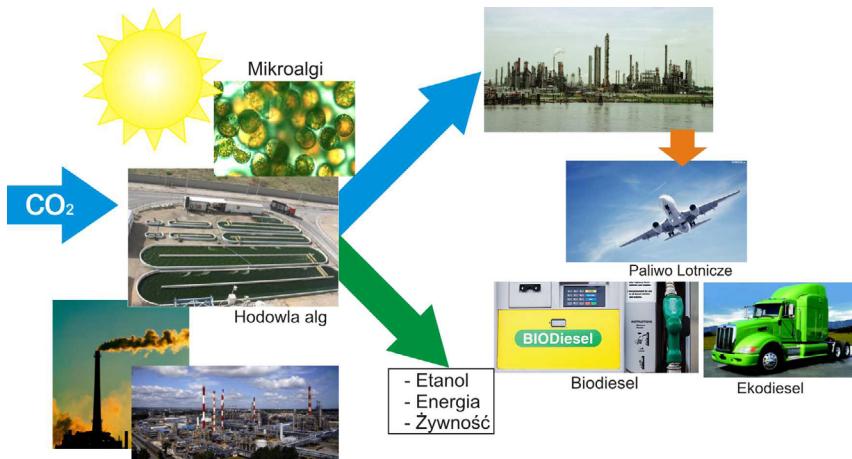
W aspekcie paliw alternatywnych mikroalgi są miniaturowymi biologicznymi fabrykami, które w procesie fotosyntezy przekształcają dwutlenek węgla i światło słoneczne w bogatą w składniki mineralne biomasę (Banerjee i in. 2002; Melis 2002; Lorenz i Cysewski 2003; Spolaore i in. 2006). Dodatkowo te fotosyntetyzujące mikroorganizmy są użyteczne w bioremediacji środowisk zanieczyszczonych (Kalin i in. 2005; Munoz i Guieyses 2006) i odgrywają ważną rolę jako „bionawozy” poprzez wiązanie azotu atmosferycznego (Vaishampayan i in. 2001). Mikroalgi mogą być wykorzystywane do produkcji różnych typów nośników energii. Należą do nich:

- biometan produkowany przez beztlenowe trawienie biomasy glonów (Spolaore i in. 2006);
- biodiesel powstający z oleju pozyskanego z alg (Banerjee i in. 2002; Gavrilescu i Chisti 2005; Roessler i in. 1994);
- biowodór produkowany fotobiologicznie (Fedorov i in. 2005; Ghirardi i in. 2000; Kapdan i Kargi 2006; Melis 2002).

Pomysł użycia mikroalg jako źródła paliwa nie jest nowy (Chisti 1980; Nagle i Lemke 1990), ale współcześnie – w erze paliw alternatywnych – biopaliwa cieszą się coraz większym zainteresowaniem. Hodowla alg na

cele energetyczne zmniejsza zagrożenie globalnego ocieplenia, wpływając na mniejsze zużycie paliw kopalnianych oraz wykorzystując znaczne ilości CO₂ (Gavrilescu i Chisti 2005).

Obecnie podstawowym paliwem dla silników o zapłonie samoczynnym jest olej napędowy otrzymywany z ropy naftowej. Prognozy stosunkowo szybkiego wyczerpania się zasobów paliw kopalnianych, zagrożenie środowiska naturalnego oraz rosnące ceny ropy naftowej spowodowały wzrost zainteresowania odnawialnymi źródłami energii. W Polsce zyskuje na znaczeniu paliwo odnawialne – bioester Fatty Acid Methyl Ester (FAME) pozyskiwany w procesie transestryfikacji oleju rzepakowego. Może być on również uzyskiwany z odpowiedniego gatunku glonów bogatych w olej i powszechnie dostępnych w zbiornikach wodnych. Istotnymi walorami tego paliwa są jego proekologiczne właściwości, takie jak: wysoki stopień biodegradowalności, mniejsza emisja składników spalin do środowiska, masowa dostępność oraz łatwość pozyskiwania. W Unii Europejskiej podjęto praktyczne działania w oparciu o Dyrektywę 2009/28/WE określającą obowiązek wprowadzenia przez kraje członkowskie biopaliw w transporcie samochodowym w ilości 10% do 2020 r.



Rys. 1. Produkcja biomasy glonów

Istnieją trzy podstawowe metody otrzymywania oleju z alg:

- wytlaczanie na prasie,
- ekstrakcja heksanem,
- ekstrakcja w cieczy nadkrytycznej.

Celem badań było opracowanie technologii otrzymywania biopaliwa z oleju wytworzzonego przez glony oraz zbadanie jego właściwości na potrzeby zasilania silnika z zapłonem samoczynnym. Zakres opracowania obejmuje zatem:

- opracowanie metody produkcji biopaliwa pozyskanego z oleju wytwarzanego przez glony;
- właściwości biopaliwa pozyskanego z oleju glonowego oraz badanie parametrów silnika z zapłonem samoczynnym (ZS) zasilanego tym biopaliwem.

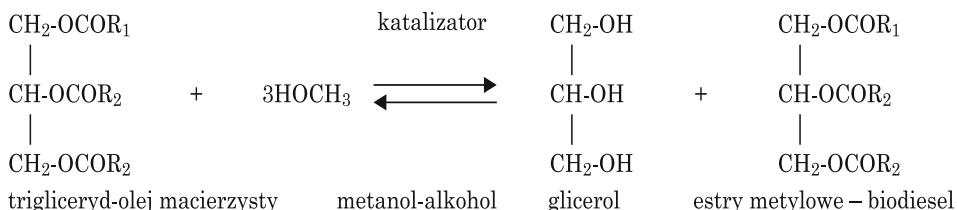
13.2. Metody produkcji biopaliwa pozyskanego z oleju wytwarzanego przez glony

W procesie tłoczenia przy użyciu prasy można uzyskać dużą ilość oleju z alg (70–75%). Olej z glonów może być uzyskiwany przy użyciu środków chemicznych. Najpopularniejszy do ekstrakcji jest heksan, który jest stosunkowo tani. Ekstrakcja w cieczy nadkrytycznej jest znacznie bardziej wydajna niż tradycyjne rozpuszczalniki do separacji. Cieczne nadkrytyczne są selektywne, a tym samym zapewniają wysoką czystość i koncentrację produktu (Chisti 2007). Tym sposobem można uzyskać prawie 100% olejów z alg. W płynie nadkrytycznym do ekstrakcji jest używany dwutlenek węgla (CO_2) skroplony pod ciśnieniem i ogrzewany do tego stopnia, że ma właściwości zarówno cieczy, jak i gazu. Wówczas ten płyn działa jako rozpuszczalnik w ekstrakcji oleju (Chisti 2007). Zawartość tłuszczów w mikroalgach jest różna w zależności od warunków hodowlanych i rodzajów glonów. Wysoka zawartość nasyconych i jednonienasyconych kwasów tłuszczywych, w tym glonów, jest uważana za optymalną z punktu widzenia jakości paliwa bazowego (Fukuda i in. 2001). Po ekstrakcji oleju z alg pozostałe frakcje biomasy mogą być używane jako pasza dla zwierząt. W ten sposób uzyskujemy dodatkową wartość produktów użytkowych i zmniejszenie ilości odpadów.

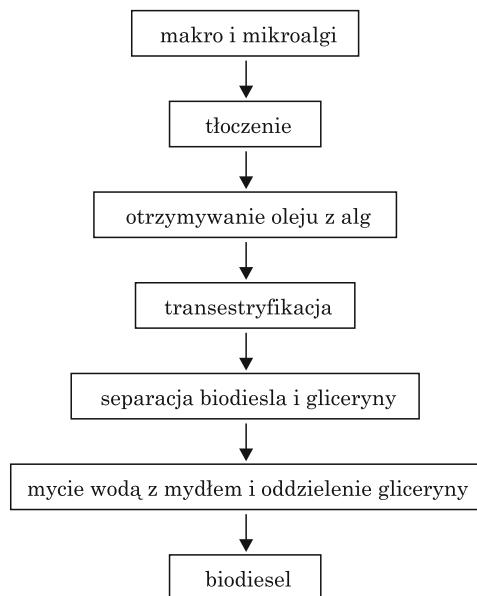
Produkcja biodiesla, jak dotąd, oparta jest głównie na tłuszczach pochodzących z roślin oraz zwierząt. Produkcja oleju z alg na skalę przemysłową wydaje się sprawą niedalekiej przyszłości (Chisti 2007). Biodiesel to paliwo sprawdzone, a technologia jego produkcji i użycia jest znana od ponad 50 lat (Barnwal i Sharma 2005; Felizardo i in. 2006; Knothe i in. 1997; Meher i in. 2006). Obecnie biodiesel jest produkowany głównie z soi, rzepaku i oleju palmowego, czyli roślin przeznaczonych do konsumpcji (Felizardo i in. 2006).

Typowy proces komercyjnej produkcji biodiesla przebiega w kilku etapach (rys. 2). Olej macierzysty składa się z triglicerydów, w których 3 cząsteczki kwasu tłuszczywego są zestryfikowane przez cząsteczki glicerolu. W produkcji biodiesla triglicerydy wchodzą w reakcję z metanolem. W wyniku tej transestryfikacji powstają estry metylowe kwasów tłuszczywych, czyli biodiesel i glicerol jako produkt odpadowy. Reakcja przebiega etapowo: triglicerydy są najpierw przekształcane do dwuglicerydów, później do monoglicerydów, a następnie do glicerolu. Zgodnie z zapisem stochiometrycznym reakcji, podając metanolizie 1 mol triacyloglicerolu, zużywa się 3 mole alkoholu metylowego

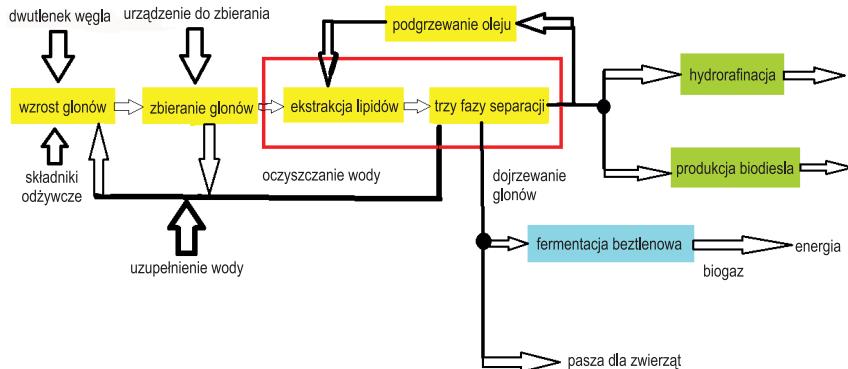
i otrzymuje się 3 mole estrów metylowych kwasów tłuszczywych i 1 mol glicerolu. Ponieważ reakcja metanolizy jest reakcją równowagową, należy zastosować nadmiar jednego z substratów (zwykle alkoholu) lub przeprowadzać reakcję etapami, odbierając po każdym etapie produkt uboczny (glicerol) (Chisti 2007). W procesie przemysłowym używa się 6 moli metanolu dla każdego mola triglicerydu (Fukuda i in. 2001). Tak duży nadmiar metanolu gwarantuje, że reakcja przesunie się w kierunku estrów metylowych, tzn. w stronę biodiesla. Ilość estrów metylowych przekracza w tych warunkach 98% wagi bazowej (Fukuda i in. 2001).



Rys. 2. Transestryfikacja oleju do biodiesla R1-R3 – grupy wodorowęglowe



Rys. 3. Otrzymywanie biodiesla z alg



Rys. 4. Produkcja biodiesla

Dotychczas wykonano wiele prac badawczych w różnych ośrodkach naukowych krajowych i zagranicznych, jednak ciągle istnieją wątpliwości dotyczące kompleksowej oceny efektów użytkowych silników ZS zasilanych estrami metylowymi olejów roślinnych.

Problemy związane ze stosowaniem estrów metylowych kwasów tłuszczywych oleju (FAME) jako paliwa lub komponentów oleju napędowego (ON) pokazują, że pomimo wielu przeprowadzonych badań w ciągu ostatnich kilkunastu lat w takich krajach jak: Austria, Niemcy, Francja, Włochy, Czechy, Szwecja, nie wszystkie zjawiska i procesy zachodzące w tych surowcach energetycznych zostały należycie poznane. Z doświadczeń tych państw wynika, że FAME pochodząca z różnych agrorafinerii wykazuje znaczne odchylenia w stosunku do właściwości określonych w normie EN 14214.

Specyfika określonego rynku paliwowego, użytkowanych na nim pojazdów samochodowych, samojezdnych maszyn rolniczych, leśnych i budowlanych, jak również sposoby i warunki ich eksploatacji wymagają każdorazowo szczegółowego poznania zagrożeń stwarzanych przez FAME. Pomimo wieloletnich badań, istnieje wiele obszarów wątpliwych, wymagających pełniejszego poznania, szczególnie w zakresie:

- wzajemnego oddziaływanie estrów metylowych kwasów tłuszczywych z ON,
- oddziaływanie FAME na elementy konstrukcyjne silnika,
- zanieczyszczenia i trwałości elementów układu wtryskowego silnika,
- zanieczyszczenia komory spalania i układu wydechowego,
- właściwości użytkowych proekologicznych biopaliw.

Niska odporność na utlenianie FAME sprzyja tworzeniu osadów w silniku. Z kolei wysoka liczba jodowa biopaliwa przyśpiesza zakoksowanie końcówek wtryskiwaczy.

Jednym z istotnych kryteriów oceny jakości biopaliwa jest określenie całkowitej zawartości gliceryny i wolnej gliceryny oraz mono-, di- i trójglicerydów. Wysoka zawartość wolnej gliceryny w FAME może stwarzać trudności

podczas magazynowania biopaliwa w zbiornikach ze względu na tendencje do wytrącania się gliceryny. Wysoka zawartość gliceryny w biopaliwie może powodować zanieczyszczenie końcówek wtryskiwaczy, tworzenie się osadów na denkach tłoków i w komorach spalania silnika (Bocheński i Jakóbiec 2005).

Zastosowanie FAME jako paliwa do napędu pojazdów stwarza wiele problemów badawczych z uwagi na brak określonych wymagań jakościowych w odniesieniu do paliw węglowodorowych podanych w normie EN590, która ogranicza maksymalną zawartość FAME obecnie do 5%, a po jej nowelizacji dopuszcza się ilość FAME do 10% w ON.

Istotnym zagadnieniem dotyczącym oceny właściwości użytkowych estrów metylowych kwasów tłuszczyowych oleju z glonów są procesy ich starzenia. Odmienny przebieg procesów starzenia FAME powoduje, że wykorzystywane obecnie klasyczne metody oceny skłonności paliw do utleniania nie odzwierciedlają tych procesów w biopaliwach. Procesy starzenia FAME przebiegają zdecydowanie szybciej w stosunku do zmian zachodzących w ON.

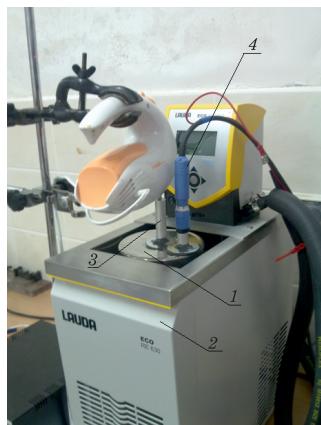
Jednym z istotnych problemów eksploatacyjnych pojazdów zasilanych FAME jest zapewnienie właściwego rozruchu silników w temperaturze poniżej 5°C. Bezpośredni wpływ na właściwości niskotemperaturowe biopaliwa ma jakość surowca, jego skład chemiczny, zawartość poszczególnych estrów kwasów tłuszczyowych itp. Przykładowo, im wyższy udział estrów o wyższej liczbie atomów węgla w cząsteczce, tym mniejsza podatność rozruchowa w niskiej temperaturze, zaś większy udział nienasyconych wiązań poprawia tę właściwość.

Poniżej przedstawiono etapy produkcji na małą skalę biopaliwa pochodzącego z oleju wytworzonego przez glony. Do doświadczenia wybrano bezciśnieńową metodę wytwarzania estrów metylowych kwasów tłuszczyowych wykorzystującą nadmiar metanolu. W przypadku katalizatora eksperymentowano z jego ilością.

Proces transestryfikacji przeprowadzono w specjalnie skonstruowanym reaktorze o pojemności 1,5 dm³ zaopatrzonym w mieszadło mechaniczne i łaźnię wodną pozwalającą utrzymać stałą temperaturę. Aparatura doświadczalna została przedstawiona na rysunku 5.

Reakcji z metanolem poddano olej wyłaczony z alg *Chlorella protothecoides*. Procedurę produkcji paliwa z alg przedstawiono w tabeli 1.

Do doświadczenia użyto stałych wartości oleju bazowego – 1 dm³ oraz metanolu w ilości 0,15 dm³. Jako katalizatora użyto wodorotlenku potasu o czystości analitycznej w ilości 14 g.



Rys. 5. Aparatura doświadczalna do produkcji bioestru

1 – reaktor, 2 – łaźnia wodna LAUDA ECO RE630, 3 – mieszadło mechaniczne, 4 – pH-metr Liquisys M CPM233+CPS11

Tabela 1
Etapy produkcji paliwa z alg

Lp.	Nazwa operacji	Aparatura	Parametry i właściwości
1	2	3	4
1	oczyszczanie, filtrowanie, odwadnianie oleju surowego	konwerter 234 Plus lub filtr PP do biodiesla firmy Filtrakon	gęstość ~ 0,92g/cm ³ brak zanieczyszczeń zaw. H ₂ O < 0,15% lepkość 75 mm ² s ⁻¹ zaw. wolnych kwasów tłuszczowych < 1,5% zaw. fosforu < 200ppm pH ~ 7
2	przygotowanie mieszaniny estryfikacyjnej (katalitycznej) WARIANT I metanolan sodu (CH ₃ OK)KOH+CH ₃ OH KAT=0,0167*OR (dm ³) MET=0,146*OR (dm ³) obliczenie ilości katalizatora metodą miareczkowania WARIANT II mieszanka wodorotlenku sodu (KOH) i metanolu	mieszalnik, zbiornik pomocniczy	metanol <0,2% wody KOH ZAPEWNIEŃIE JEDNORODNOŚCI MIESZANINY

cd. tabeli 1

1	2	3	4
3	transestryfikacja jednoetapowa WARIANT I intensywne mieszanie w temp. 30–50°C przez 0,5 h, pozostawić na 2,5 h WARIANT II intensywnie mieszać przez 1,5 h w temp. ~60°C	reaktor laboratoryjny, łaźnia wodna, mieszadło łożyskowe	ocenić stopień przebiegu reakcji transestryfikacji chromatograf TLC > 96%
4	sendymentacja	wirówka	n obr = 2000 obr/min
5	spuszczenie wydzielonej frakcji glicerynowej	zawór elektromagnetyczny lub kulowy	14–17% wsadu
6	oczyszczanie surowego B100: – bezwodna ekstrakcja kwasu fosforowego H_3PO_4 – przemywanie wodą destylowaną – przemywanie roztworem kwasu cytrynowego	układ oczyszczania 	pH = 7 dla B100 10% wody w stosunku do masy estru 2% roztwór kwasu cytrynowego
7	spuszczenie B100	zawór elektromagnetyczny lub kulowy	przepuszczalność wkładu filtra 5–10 mm
8	osuszanie B100	przedmuch powietrzem lub żel krzemowy	temperatura ok. 90°C bezwodny siarczan sodu (Na_2SO_4)
9	ocena jakości B100	analiza fizykochemiczna: – piknometr, areometr – lepkościomierz – aparat Marcussona	gęstość 0,86–0,9 g/cm ³ lepkość 3,5–5 mm ² /s pH = 7 zawartość wody = 500 mg/kg

Przyjęto do badań 1000 ml oleju z alg + 146 ml metanolu + 17,1 g KOH (czas mieszania 45 min w temperaturze 60°C) i otrzymano:

- ester metylowy oleju z alg – 800 ml, co stanowi 0,75,
- glicerynę – 270 ml, co stanowi 0,25.



Rys. 6. Oddzielony ester metylowy z glonów i gliceryna

13.3. Metody badań właściwości biopaliwa pochodzącego z oleju glonowego

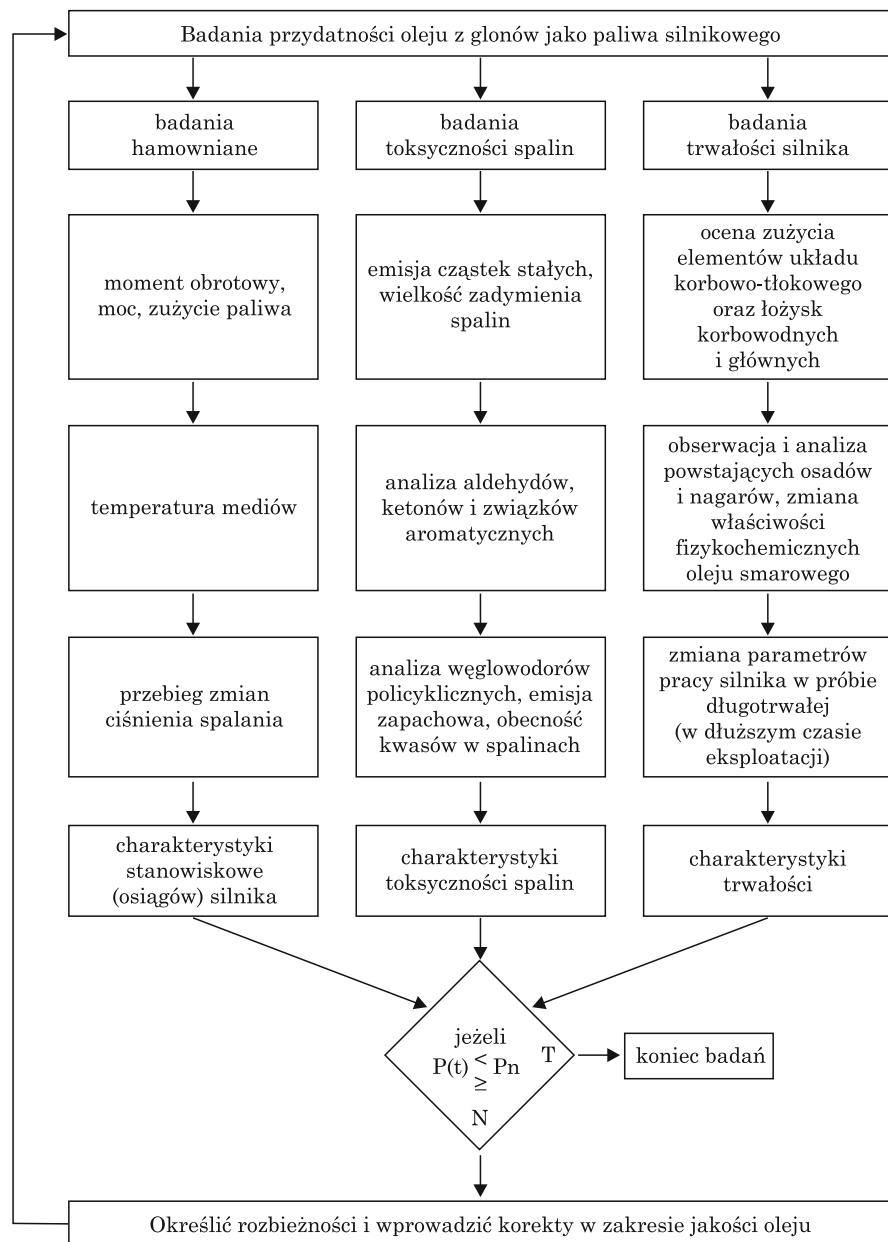
Właściwości fizykochemiczne i użytkowe FAME zależą od jakości wytworzonych glonów, ich oczyszczania wstępnego, procesu transestryfikacji oraz sedimentacji i oczyszczania produktu końcowego (biodiesla). Odmienna budowa chemiczna FAME, najczęściej od kilku do 24 atomów węgla w cząstecze, nasycone bądź nienasycone o jednym lub większej liczbie wiązań podwójnych decydują o różnicy pomiędzy FAME i ON.

Programowane badania eksperymentalne biopaliw mają na celu określenie właściwości fizykochemicznych estru metylowego olejów otrzymanych z glonów i przeznaczonego do zasilania silników ZS oraz ocenę stanu technicznego badanego silnika zasilanego tym biopaliwem.

Program badań eksperymentalnych obejmuje dwa etapy :

- 1) badanie właściwości fizykochemicznych oleju rzepakowego i olejów odpadowych oraz pozyskanych estrów metylowych z tych olejów;
- 2) badanie stanu technicznego silnika wysokoprężnego zasilanego biopaliwem.

Przebieg programowanych badań eksperymentalnych biopaliwa przedstawiono na rysunku 7.



Rys. 7. Schemat programowalnych badań biopaliwa do zasilania silnika ZS

Plan badań programowanych zakładał następujący układ pomiarowy badań eksperymentalnych typu [C, W, P, T], gdzie: C – cykl eksperymentu, W – pomiary właściwości fizykochemicznych oleju i estru metylowego, P – pomiary parametrów pracy silnika, T – czas badań.

Zakres badań doświadczalnych olejów roślinnych i estrów metylowych, pozyskiwanych z oleju rzepakowego, do zasilania silnika ZS obejmował :

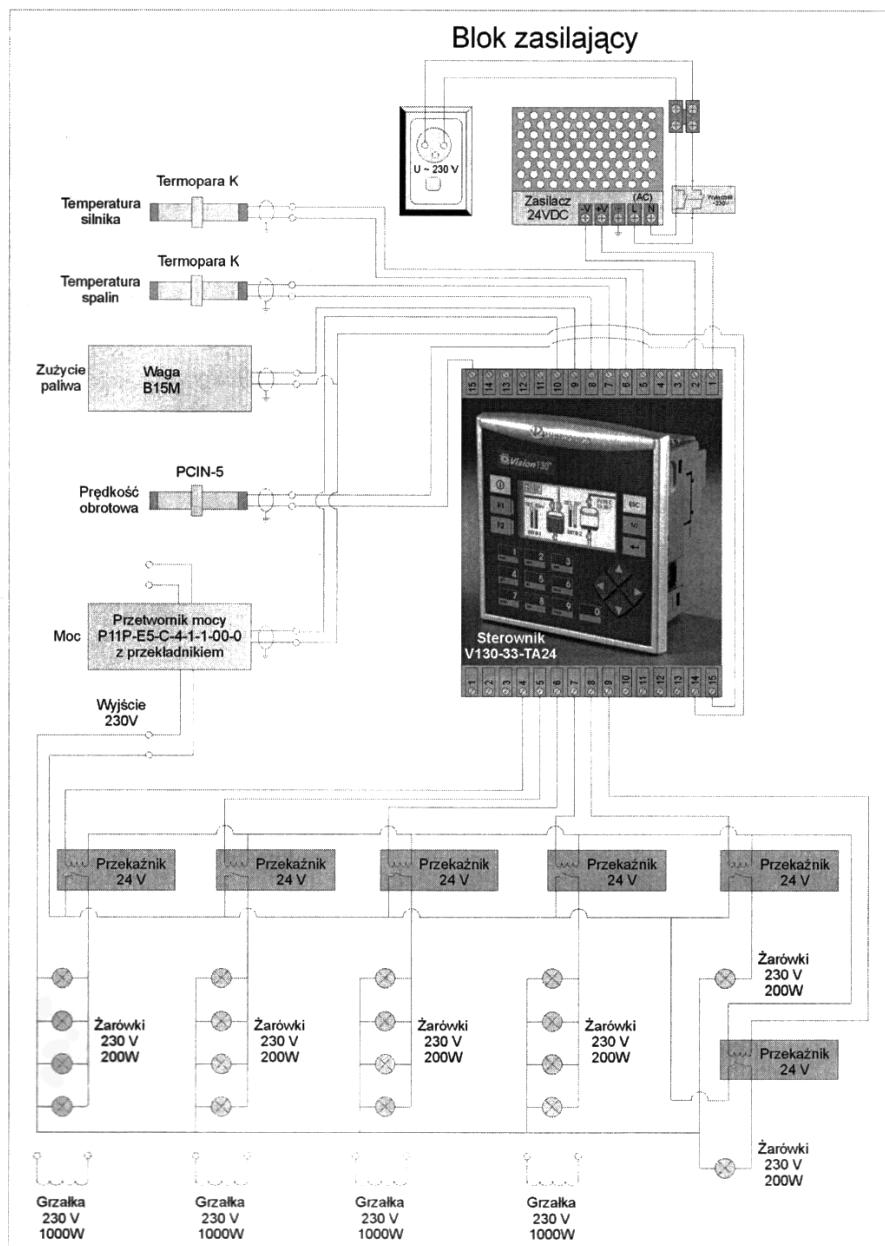
- C – trzy cykle eksperymentów;
- Won – pomiary właściwości oleju roślinnego (gęstość, lepkość, zawartość wody, pH, temperatura zapłonu);
- Wem – pomiary m = 12 właściwości estru metylowego kwasów tłuszczo-wych do zasilania silników ZS wg PN-EN 14214;
- Pk – dobór k= 6 parametrów procesu transestryfikacji zgodnie z opracowaną procedurą.

Badanie stanu technicznego silnika ZS obejmowało cykle pomiarów: prędkości obrotowej (n), temperatury spalin (T), temperatury silnika (t), zużycia paliwa (q), obciążenia silnika (P), składu spalin (CO, CO₂, HC, NO_x) i zadymienia spalin. Przyjęto czas trwania eksperymentu t₁ = 50 h, gdy będą rejestrowane parametry pracy silnika, skład spalin i zadymienie oraz stan techniczny podstawowych zespołów silnika (cylinder, tłok, głowica, zawory, układ wydechowy, pompa paliwowa, przewody paliwowe). W tabeli 2 podano wykaz parametrów silnika ZS mierzonych określonymi przetwornikami.

Tabela 2
Wykaz parametrów silnika ZS

Rodzaj parametru	Typ przetwornika
n – prędkość obrotowa	Sels PCIN-5
T – temperatura spalin	termopara K
t – temperatura silnika	termopara K
Q – zużycie biopaliwa	waga B15M
P – obciążenie (kW)	przetwornik mocy P11P-E5-C-411-00-0 z przekładniem

Badane parametry silnika ZS są rejestrowane przez układ pomiarowy ze sterownikiem PLC firmy Unitronics V130-33-TA24 na komputerze przenośnym (rys. 8).



Rys. 8. Schemat układu pomiarowego parametrów pracy silnika ZS

Oznaczenia gęstości biopaliwa przeprowadzono aerometrem w temperaturze 25°C w łaźni wodnej DP Petrotest.

Oznaczenie zawartości wody w paliwie dokonano przy pomocy analizatora Cou-Lo Aquamax KF (rys. 9). Miareczkowanie metodą Karla Fischera służy do pomiaru zawartości wody w próbkach. Analizator Aquamax używa zasad analizy kolorymetrycznej. Połączenie techniki kolorymetrycznej z miareczkowaniem Karla Fischera na aparacie Aquamax pozwoliło wyznaczyć zawartość wody poprzez pomiar ilości elektrolitu potrzebnego do wyprodukowania żądanej ilości jodu. Jest to technika, która nie wymaga kalibracji. Aquamax KF automatycznie wybiera odpowiednią prędkość miareczkowania w zależności od ilości wody w próbce.



Rys. 9. Oznaczenie zawartości wody w paliwie przy pomocy analizatora Cou-Lo Aquamax KF

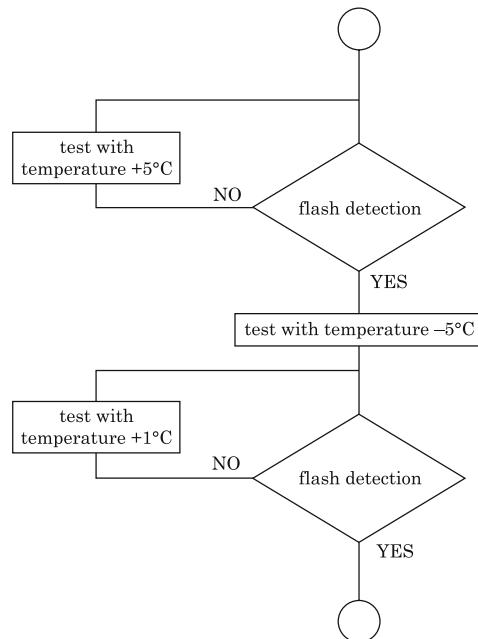
Lepkość kinematyczna jest miarą wewnętrznego oporu płynu przy przepływie pod działaniem grawitacji, przy wysokości ciśnienia proporcjonalnej do gęstości płynu. Dla każdego wiskozymetru czas przepływu stałej objętości płynu jest wprost proporcjonalny do lepkości kinematycznej. Przyjętą jednostką lepkości kinematycznej jest centymetr kwadratowy na sekundę. Oznaczenia lepkości kinematycznej dokonano przy pomocy wiskozymetru miniAV®-X (rys. 10).

Automatyczny wiskozymetr miniAV®-X skonstruowany jest tak, aby zautomatyzować czasochłonne operacje badania próbek i czyszczenia, konieczne przy oznaczaniu lepkości kinematycznej zgodnie ze specyfikacją ASTM D 445. Można dzięki temu badać wiele substancji, takich jak oleje przepracowane, paliwa żeglugowe, paliwa pozostałościowe i ropy naftowe. Precyza oznaczania lepkości kinematycznej przy użyciu miniAV®-X jest równa wymaganej w specyfikacji ASTM D 445 lub lepsza. Ta metoda jest wymagana do Klasyfikacji Lepkościowej Olejów Silnikowych SAE J300 (SAE – Society of Automotive Engineers).



Rys. 10. Oznaczenie lepkości kinematycznej przy pomocy wiskozymetru miniAV®-X

Zasada oznaczania temperatury zapłonu polega na ogrzewaniu badanego produktu w warunkach ustalonych, zbliżaniu płomienia do tygla zawierającego badany produkt w różnych ustalonych odstępach czasu aż do zapalenia się par produktu. Najniższą temperaturę, w której nastąpi zapalenie par badanego produktu, przyjmuje się jako temperaturę zapłonu. W aparacie FLASH POINT Model NPV 220 proces ten odbywa się automatycznie – zgodnie z algorytmem przedstawionym na rysunku 11.



Rys. 11. Algorytm oznaczania temperatury zapłonu w aparacie FLASH POINT Model NPV 220

Fosfor oznaczano metodą kolorymetryczną (Mattsson i Swartling 1954). Mineralizacja na mokro. Natężenie barwy roztworu mierzono przy użyciu spektrofotometru przy długości fali $\lambda = 610$ nm wobec wody redestylowanej. Zawartość fosforu obliczano, porównując absorbancję próby badanej z absorbancją próby wzorcowej o znanym stężeniu. Oznaczenia wykonywano w trzech równoległych powtórzeniach.

Analizę składu kwasów tłuszczyowych wg PN-EN 14103 dokonano metodą chromatografii gazowej, stosując chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID).

Warunki rozdziału chromatograficznego:

- chromatograf 7890A AGILENT TECHNOLOGIES,
- detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID),
- kolumna kapilarna o długości 30 m,
- średnica wewnętrzna 0,32 mm,
- faza ciekła Supelcowax 10 grubość filmu 0,25 μm ,
- temperatury:
 - detektor 250°C,
 - dozownik 230°C,
- kolumna 195°C (1 min),
- gaz nośny hel przepływ 1,5 ml/min,
- dozownik z podziałem 50:1.

Oznaczenia wykonywano w dwóch równoległych powtórzeniach.

13.4. Wyniki badań właściwości paliwa pozyskanego z oleju glonowego

Właściwości fizyczne oleju wytworzzonego przez glony:

wygląd	przezroczysty
kolor	żółty / zielony
liczba nadtlenkowa	0,5 (max)
gęstość	912 kg/m ³
lepkość	33,2 cSt
ogółem zanieczyszczenia	2,0 mg/kg
węgiel resztkowy	0,1% (m/m)
woda	40 mg/kg
siarka	2,0 mg/kg
jod	67 mg jodu/100 g
liczba kwasowa	0,2 mg KOH/g
fosfor mg/kg	0,0008%

Wyniki pomiarów właściwości paliwa z glonów zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3

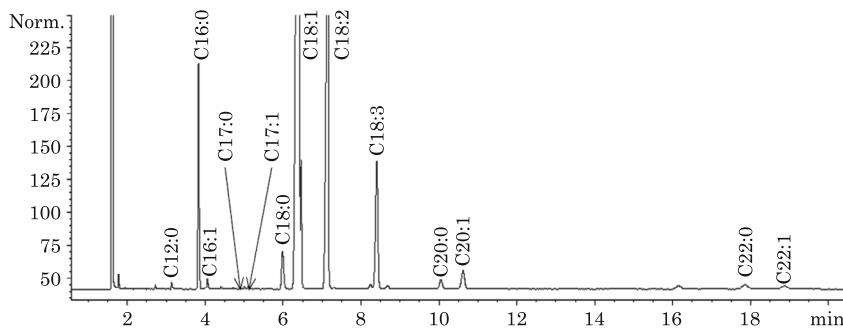
Wyniki pomiarów właściwości biopaliwa z oleju wytworzzonego przez glony

Właściwość	Jednostka	Zakres wg PN-EN 14214		Olej z glonów	Biodiesel
		minimum	maksimum		
Gęstość w temp. 15°C	kg/m ³	860	900	912	880
Lepkość w temp. 40°C	cSt	3,50	5,00	33,2	4,59
Temperatura zapłonu	°C	120	–	–	200°C
Zawartość wody	mg/kg	–	500	140	–
Liczba kwasowa	mg KOH/g	–	0,5	0,40	0,35
Liczba jodowa	g jodu/100g	–	120	75	77
Zawartość fosforu	mg/kg	–	10,0	4,9	1,2

Tabela 4

Porównanie właściwości paliw

Kwas tłuszczywy	Olej z glonów (%)	Biodiesel (%)
C12:0 kwas laurynowy	0,06	0,06
C16:0 kwas palmitynowy	5,27	5,18
C16:1 kwas oleopalmitynowy	0,28	0,24
C17:1 kwas heptadecenoic	0,04	0,06
C18:0 kwas stearynowy	1,68	1,65
C18:1 kwas oleinowy	63,15	63,88
C18:2 kwas linolowy	20,57	20,55
C18:3 kwas linolenowy	6,20	6,08
C20:0 kwas arachidowy	0,56	0,55
C20:1 kwas arachidonowy	1,25	1,24
C22:0 kwas behenowy	0,51	0,19
C22:1 kwas cerwonowy	0,38	0,27



Rys. 12. Estry metylowe kwasów tłuszczywych

W badanym biopaliwie z oleju glonowego nie stwierdzono dużego udziału estrów o wyższej liczbie atomów węgla w cząsteczce, zatem posiadało ono dobre właściwości niskotemperaturowe. W niskich temperaturach następuje pogorszenie dopływu paliwa w silniku, co prowadzi do zablokowania filtrów oraz układu paliwowego.

Oznaczania liczby kwasowej wg PN-EN 14104 wykonano w trzech równoległych powtórzeniach (tab. 5).

Tabela 5
Oznaczanie liczby kwasowej PN-EN 14104

	Liczba kwasowa (mg KOH/g)	Średnia
Olej z glonów	0,36	0,4
	0,42	
	0,42	
Biodiesel	0,35	0,35
	0,35	
	0,33	

Oznaczanie liczby jodowej wg PN-EN 1411 przebiegło w trzech równoległych powtórzeniach (tab. 6).

Tabela 6

Oznaczanie liczby jodowej wg PN-EN 14111

	LI (g jodu/100g)	Średnia
Olej z glonów	74,43	74,60
	75,15	
	74,20	
Biodiesel	76,64	76,72
	76,64	
	76,87	

Jak wynika z powyższych danych, liczba kwasowa oraz liczba jodowa są znacznie poniżej wartości maksymalnej właściwości estru metylowego kwasów tłuszczywych podanych w PN-EN-14214, które wynoszą dla liczby kwasowej 0,50 mg KOH/g, a liczby jodowej 120 g jodu/100 g. Nieduża liczba kwasowa paliw jest korzystna dla silników spalinowych. Również mała liczba jodowa paliwa jest zaletą, ponieważ związki nienasycone w produktach naftowych są reaktywne i mogą ulegać polimeryzacji oraz reakcjom z tlenem i innymi związkami chemicznymi, których produkty są szkodliwe w płynach eksploatacyjnych.

Program badań zakładał monitorowanie parametrów pracy silnika zasilanego różnymi paliwami (rys. 13) przy założonym programie obciążień. Zróżnicowane wartości obciążzeń realizowane były przy pomocy sześciu żarówek o mocy ok. 500 W każda (rys. 14).

Podczas badań wykonano próby porównawcze spalania w silniku oleju napędowego, bioestru pochodzącego z oleju rzepakowego oraz bioestru pochodzącego z oleju wyłoczonego z glonów. Program obciążzeń dla każdego z paliw był identyczny.



Rys. 13. Silnik zasilany B-100 na bazie oleju z glonów



Rys. 14. Obciążenie silnika ZS podczas próby

Wyniki pomiarów rejestrowane były z wykorzystaniem programowalnego sterownika Unitronics V570-57-T40B (rys. 15).



Rys. 15. Sterownik stanowiska pomiarowego

W tabeli 7 zestawiono wyniki zużycia paliwa oraz średniej temperatury spalin uzyskane podczas prób trwających 52 min.

Tabela 7
Porównanie wyników badań paliw stosowanych do zasilania silników ZS

Rodzaj paliwa	Olej napędowy	B100 (na bazie oleju rzepakowego)	B100 (na bazie oleju z głonów)
Średnia temperatura spalin podczas próby	192,75°C	174,03°C	188,41°C
Zużycie paliwa podczas próby	524 g	605 g	587 g

Najmniejsze zużycie paliwa przez silnik ZS nastąpiło podczas zasilania go olejem napędowym. Przy zasilaniu paliwem B100 wytworzonym na bazie oleju z glonów zużycie było mniejsze niż podczas stosowania paliwa B100 na bazie oleju rzepakowego. Średnia temperatura spalin podczas próby z paliwem B100 na bazie oleju z glonów była zbliżona do oleju napędowego.

Zauważono agresywne oddziaływanie zarówno biodiesla na bazie oleju rzepakowego, jak i biodiesla na bazie oleju z glonów na wszelkie uszczelnienia gumowe, przewody paliwowe i tworzywa sztuczne. Zjawisko to nie występowało w przypadku stosowania zwykłego oleju napędowego.

Zastosowanie biopaliwa z glonów do zasilania silników ZS wymaga opracowania:

- technologii oczyszczania estru metylowego oleju pozyskanego z glonów;
- przystosowania niektórych elementów silnika (przewodów paliwowych, uszczelnień) do warunków zasilania estrem metylowym pozyskanym z glonów

13.5. Podsumowanie

Problemy związane z produkcją biopaliwa dotyczą doboru parametrów procesu hodowli glonów na skalę przemysłową w zbiornikach i fotobioreaktorach oraz zastosowania odpowiedniego gatunku mikroalg o dużej zawartości węgla w suchej masie. Kolejnym ograniczeniem jest otrzymywanie oleju z glonów poprzez wytłaczanie i ekstrakcję heksanem lub w cieczy nadkrytycznej.

Przy obecnym stanie wiedzy i technologii biodiesel z alg jest paliwem przeszłości. Jednakże trudno precyzyjnie określić, kiedy stanie się on realnym produktem wykorzystywanym w transporcie. Zależeć to będzie przede wszystkim od tego, jak szybko uda się dokonać znaczącego postępu w tej dziedzinie. Obecne badania wskazują wyraźnie, że w tej czy innej postaci produkcja biomasy alg na potrzeby energetyki i transportu będzie strategicznym sektorem gospodarki, którego rozwoju obecnie nie można zaniedbać.

Badane biopaliwo pochodzące z oleju glonowego nie posiadało dużego udziału estrów o wyższej liczbie atomów węgla w cząsteczce, dzięki temu miało dobre właściwości niskotemperaturowe. W niskich temperaturach następuje pogorszenie dopływu paliwa w silniku, co prowadzi do zablokowania filtrów oraz układu paliwowego.

Liczba kwasowa oraz liczba jodowa są znacznie poniżej wartości maksymalnych podanych w PN-EN-14214, które wynoszą odpowiednio: 0,50 mg KOH/g, oraz 120 g jodu/100 g.

Średnia temperatura spalin podczas próby przy stosowaniu paliwa B100 na bazie oleju z glonów była zbliżona do oleju napędowego. Najniższe wartości

zużycia paliwa zanotowano podczas zasilania badanego silnika zwykłym ON. Najwyższe zużycie paliwa wystąpiło przy zasilaniu silnika bioestrem na bazie oleju rzepakowego – zużycie biopaliwa na bazie oleju wytworzonego z masy glonowej było nieco większe od zużycia ON, jednak nie osiągnęło wartości zużycia bioestru na bazie oleju rzepakowego. Zastosowanie biopaliwa z glonów do zasilania silników ZS zwiększa zużycie paliwa o ok. 12% w porównaniu z ON oraz wymaga opracowania:

- technologii oczyszczania glonów z przeznaczeniem na olej;
- technologii oczyszczania estru metylowego oleju pozyskanego z glonów;
- przystosowania niektórych elementów silnika (przewodów paliwowych, uszczelnień) do warunków zasilania estrem metylowym pozyskanym z glonów.

Literatura

- Bellarbi E.H., Molina Grima E., Chisti Y. 2000. *A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil*. Enzyme Microb. Technol., 26: 516–529.
- Bocheński C., Jakóbiec J. 2005. *Badania wpływu parametrów wtrysku i właściwości paliwa na proces spalania w silniku z zapłonem samoczynnym przy zastosowaniu zasobnikowego układu paliwowego (Common Rail)*. Projekt badawczy nr 5T12D01723. SGGW, Warszawa.
- Bocheński C. 2003. *Biodiesel paliwo rolnicze*. SGGW, Warszawa.
- Camacho Rubio F., Acien Fernandez F.G., Garcia Camacho F., Sanchez Perez J.A., Molina Grima E. 1999. *Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactor for microalgal culture*. Biotechnol. Bioeng., 62: 71–86.
- Chinnasamy S., Bhatnagar A., Hunt R.W., Das K.C. 2010. *Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications*. Bioresour. Technol., 101: 3097–3105.
- Chisti Y. 1980. *An unusual hydrocarbon*. J. Remsay. Soc., 81: 27–28.
- Chisti Y. 1999. *Shear sensitivity*. W: Flickinger M.C., Drew S.W. (eds.) *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*. Wiley, 5: 2379–2406.
- Chisti Y. 2007. *Biodiesel from microalgae*. Biotechnol. Adv., 25: 294–306.
- Craggs R.J., Shilton A.N. 2011. *Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production*. Bioresour. Technol., 102: 35–42.
- Eisentraut A. 2010. *Sustainable production of second-generation biofuels: Potential and perspectives in major economies and developing countries*. OECD/IEA.
- Fedorov A.S., Kosourov S., Ghirardi M.L., Seibert M. 2005. *Continuous H₂ photoproduction by Chlamydomonas reinhardtii using a novel two-stage, sulfate-limited chemostat system*. Appl. Biochem. Biotechnol., 121: 403–412.
- Felizardo P., Correia M.J.N., Raposo I., Mendes J.F., Berkemeier R., Bordado J.M. 2006. *Production of biodiesel from waste frying oil*. Waste Manag., 26: 487–494.
- Fukuda H., Kondo A., Noda H. 2001. *Biodiesel fuel production by transesterification of oils*. J. Biosci. Bioeng., 92: 405–416.
- Gavrilescu M., Chisti Y. 2005. *Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry*. Biotechnol. Adv., 23: 477–499.
- Grobbleaar J.U. 2004. *Algal nutrition*. W: Richmond A. (eds). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Blackwell: 97–115.

- Kalin M., Wheeler W.N., Meinrath G. 2005. *The removal of uranium from mining waste water using algal/microalgal biomass*. J. Environ. Radioact., 78: 151–177.
- Kapdan I.K., Kargi F. 2006. *Bio-hydrogen production from waste materials*. Enzym. Microb. Technol., 38: 569–582.
- Lorenz R.T., Cysewski G.R. 2003. *Commercial potential for Haematococcus microalga as a natural source of astaxanthin*. Trends Biotechnol., 18: 160–167.
- Meher L.C., Vidya Sagar D., Naik S.N. 2006. *Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review*. Renew. Sustain. Energy Rev., 10: 248–268.
- Melis A. 2002. *Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects*. Int. J. Hydrogen Energy, 27: 1217–1228.
- Molina Grima E., Belarbi E.H., Acien Fernandez F.G., Robles Medina A., Chisti Y. 2003. *Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics*. Biotechnol. Adv., 20: 491–515.
- Muñoz R., Guiysses B. 2006. *Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review*. Water Res., 40: 2799–2815.
- Petrou E.C., Pappas C.P. 2009. *Biofuels: a survey on pros and cons*. Energy Fuels, 23: 1055–1066.
- Prather M. i in. 2001. *Atmospheric chemistry and greenhouse gases in climate change: The scientific basis*. Cambridge University Press: 239–287.
- Roessler P.G., Brown L.M., Dunahay T.G., Heacock D.A., Jarvis E.E., Schneider J.C. 1994. *Genetic – engineering approaches for enhanced production of biodiesel fuel from microalgae*. ACS Symp. Ser., 566: 255–270.
- Sanchez Miron A., Ceron Garcia M.C., Contreras Gomez A., Garcia Camacho F., Molina Grima E., Chisti Y. 2003. *Shear stress tolerance and biochemical characterization of Phaeodactylum tricornutum in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors*. Biochem. Eng. J., 16: 287–297.
- Scott S.A., Davey M.P., Dennis J.S., Horst I., Howe C.J., Lea-Smith D.J., Smith A.G. 2010. *Biodiesel from algae: challenges and prospects*. Curr. Opin. Biotechnol., 21: 277–286.
- Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. 2001. *Production, purification, characterization and applications of lipases*. Biotechnol. Adv., 19: 627–662.
- Singh A., Nigam P.S., Murphy J.D. 2011. *Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels*. Bioresour. Technol., 102: 10–16.
- Singh A., Nigam P.S., Murphy J.D. 2011. *Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels*. Bioresour. Technol., 102: 26–34.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. 2006. *Commercial applications of micro-algae*. J. Biosci. Bioeng., 101: 87–96.
- Wilham T. 2002. *Qualitätskriterien für Biodiesel*. 9. Centrales Agrar-Rochstoff-Marketing und Entwicklungs Netzwerk Forum, Straubing.