

Afvalwater als alternatief voor ruwe aardolie: feit of fictie?

Bert Biesemans
Universiteit Gent
Bert.Biesemans@UGent.be

Christophe Naessens
Universiteit Gent
Christophe.Naessens@UGent.be

Laura De Saedeleer
Universiteit Gent
Laura.DeSaedeleer@UGent.be

Laura Truyens
Universiteit Gent
Laura.Truyens@UGent.be

ABSTRACT

In rioolwaterzuiveringsinstallaties kan met een fijnzeef cellulose van de afvalstroom worden afgescheiden. Het is mogelijk om vertrekend van deze cellulose bio-ethanol te produceren. In dit project werd een methode voor de productie van bio-ethanol uit afgezeefde cellulosevezels ontworpen en uitgebreid getest. Deze methode verloopt in twee stappen: een enzymatische hydrolysestap met het enzym Celluclast[®] en een fermentatie met de gist *Saccharomyces cerevisiae*. Beide stappen zijn experimenteel onderzocht en kunnen middels een Michaelis-Menten kinetiek beschreven worden. Een industriële simulatie van het volledige proces bracht ook twee knelpunten aan het licht: het grote waterverbruik en het verlies van enzymen in de productstroom.

TREFWOORDEN

Bio-ethanol, cellulose, afvalwater, enzymatische hydrolyse, fermentatie

INTRODUCTIE

Aquafin, de exploitant van rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) in Vlaanderen, is in staat om met een fijnzeef met een maaswijdte van 350 μm cellulose uit rioolwater te filteren. Het materiaal dat op deze manier verkregen wordt, bevat ongeveer 80 % cellulose. Deze goedkope reststroom aan cellulose kan dan gebruikt worden als grondstof voor de productie van waardevolle chemicaliën zoals ethyleen, of na verdere opzuivering toegepast worden als brandstof in voertuigen.

VAN CELLULOSE UIT AFVALSTROMEN NAAR PLATFORMMOLECULEN

Door de stijgende vraag naar (fossiele) brandstoffen en de zware druk op het klimaat door de uitstoot van broeikasgassen heerst er een grote belangstelling voor

'Permission to make digital or hard copies of all or part of this work for personal or classroom use is granted under the conditions of the Creative Commons Attribution-Share Alike (CC BY-SA) license and that copies bear this notice and the full citation on the first page''

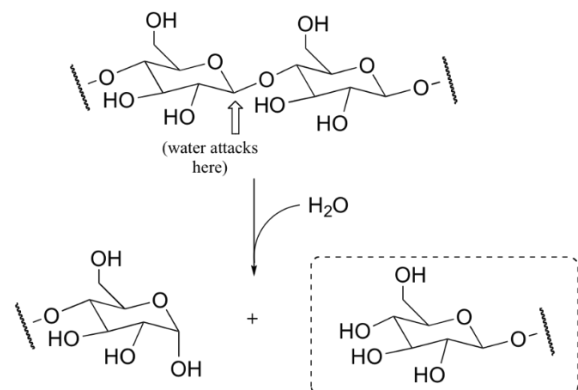
alternatieve of duurzame energiebronnen ¹. Uit cellulose kan bio-ethanol gemaakt worden, wat een interessant product is zowel als grondstof in de chemische industrie alsook als biobrandstof. Bio-ethanol is een milieuvriendelijk alternatief voor ruwe aardolie, aangezien het een gesloten koolstofcyclus doorloopt. Dit staat in scherp contrast met aardolie, die een grote hoeveelheid extra CO₂ in de atmosfeer vrijstelt.

Gebruik van cellulose voor de productie van bio-ethanol

Cellulose is een onvertakt polysaccharide opgebouwd uit glucose-eenheden die onderling verbonden zijn met β -1,4-bindingen. Men vindt cellulose in de natuur onder de vorm van lignocellulose, als structurele component in de celwand van plantencellen ². Deze vorm van cellulose vereist nog eerst een voorbehandelingsstap om de kristalstructuur te breken. Echter, cellulose in afvalwater is afkomstig van toiletpapier dat quasi volledig bestaat uit zuivere cellulose. Dit vereist dus geen voorbehandelingsstap.

Omzetting van cellulose tot glucose

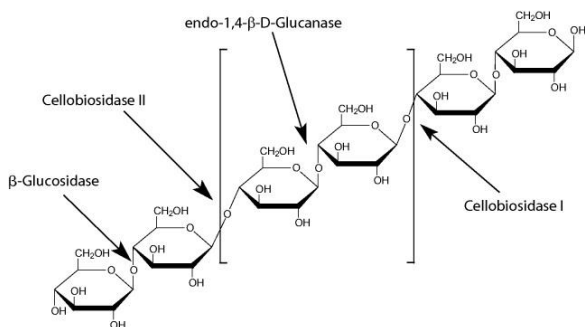
De omzetting van cellulose naar glucose gebeurt door het breken van de bindingen tussen afzonderlijke glucose-eenheden, zoals afgebeeld in Figuur 1. Dit gebeurt door de aanval van water en heet daarom hydrolyse. Om deze omzetting te doen is een katalysator nodig. Hiervoor zijn twee mogelijkheden beschikbaar: het gebruik van sterke zuren of het gebruik van enzymen.



Figuur 1: Hydrolyse van twee glucose-eenheden in cellulose

Enzymatische hydrolyse door cellulase

De enzymatische hydrolyse heeft een relatief lage gebruiks- en energiekost vergeleken met chemische hydrolyse³, maar is trager en vereist heel specifieke procescondities⁴. Bij de enzymatische hydrolyse wordt een mengsel van cellulase enzymen gebruikt om de cellulose volledig af te breken in zijn afzonderlijke glucosemoleculen. Dit is nodig aangezien elk enzym heel selectief bepaalde eenheden uit cellulose kan vrijstellen, zoals afgebeeld in Figuur 2. De gebruikte katalysator, Celluclast[®], is een mengsel dat al de nodige enzymen bevat om cellulose volledig om te zetten naar glucose.



Figuur 2: Aanduiding van de verschillende enzymen die nodig zijn voor de omzetting van een lange cellulose keten naar glucose-eenheden⁵.

Chemische hydrolyse

Cellulose kan ook gehydrolyseerd worden met geconcentreerd zwavelzuur of verdund zwavelzuur op hoge temperaturen³. Het zuur kan alle bindingen op een snelle, doch niet selectieve manier breken. Dit impliceert wel dat er gewerkt moet worden met corrosiebestendige materialen voor de reactie en scheidingsstap.

Fermentatie van glucose naar ethanol

De gevormde glucose wordt omgezet tot ethanol en CO₂ met behulp van micro-organismen onder anaerobe condities⁶.

Doel van het project

Het doel van het project is het inschatten van de ecologische en economische haalbaarheid van de omzetting van cellulose afkomstig van afvalstromen tot bio-ethanol via een kinetische studie van het omzettingsproces.

EXPERIMENTELE PROCEDURES

Voor de kinetische studie wordt experimentele data verzameld van de hydrolyse (Figuur 3) en de fermentatie (Figuur 4) om het verloop van de reacties in de tijd te bepalen.

UV-VIS spectroscopie

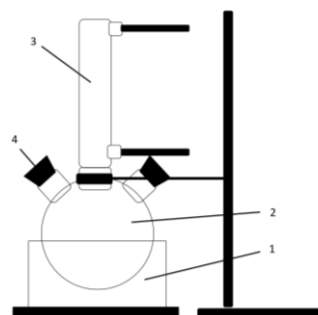
Opmeten van glucoseconcentraties gebeurt met UV-VIS spectroscopie. De glucose wordt omgezet tot het gekleurde 5-hydroxymethylfurfural door reactie met zwavelzuur⁷. Uit de absorptie van licht op 273 nm kan de concentratie glucose bepaald worden via de wet van Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Hierin is I_0/I de relatieve absorptie van het staal, ϵ de molaire extinctiecoëfficiënt ($l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c de concentratie (mol l^{-1}) en d de cuvet breedte (cm).

Enzymatische hydrolyse

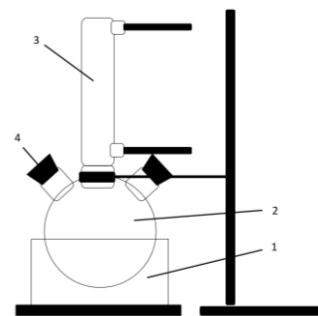
De hydrolyse reactie van zuivere cellulose wordt uitgevoerd in de opstelling weergegeven in Figuur 3. Hierin is (1) het oliebad dat op een isotherme temperatuur gehouden wordt, (2) het reactor vat met roervlo, (3) de reflux koeler en (4) het septum voor staalname. Als katalysator wordt het enzym mengsel Celluclast[®] gebruikt. Dit enzym mengsel werkt optimaal op een temperatuur van 40 °C en bij een pH van 6. Om deze pH te verkrijgen wordt een azijnzuur-natriumacetaat buffermengsel gebruikt. Er worden experimenten uitgevoerd met een variërend gehalte aan enzym (40 tot 120 μl) en variërende temperatuur (tussen 30 °C en 50 °C). Ook is er een experiment uitgevoerd met de afvalstroom van Aquafin, die voor 80 % uit cellulose bestaat. Elk uur wordt er een staal afgenomen om de conversie als functie van de tijd uit te zetten.



Figuur 3: Opstelling enzymatische hydrolyse, met (1) het isotherme oliebad, (2) het reactor vat met roervlo, (3) de reflux koeler en (4) het septum voor staal name.

Fermentatie

De fermentatie wordt uitgevoerd met behulp van *Saccharomyces cerevisiae*, bekend als bakkergist, in dezelfde opstelling. Echter, om anaerobe condities te garanderen, wordt gewerkt onder een argon atmosfeer. De optimale condities voor deze gist zijn een temperatuur van 30 °C en een pH van 6. Er wordt gewerkt met dezelfde azijnzuur-natriumacetaatbuffer en met een argonslot, waarbij er argon in de kolf wordt geblazen telkens als er een staal wordt afgenomen.



Figuur 4: Opstelling fermentatie, met (1) het isotherme oliebad, (2) het reactor vat met roervlo, (3) de reflux koeler en (4) het septum voor staal name en toevoer van argon.

MODELLEREN VAN DE KINETIEK

Voor het modelleren van de kinetiek van zowel de hydrolyse als de fermentatie, wordt het Michaelis-Menten model vooropgesteld ⁸.



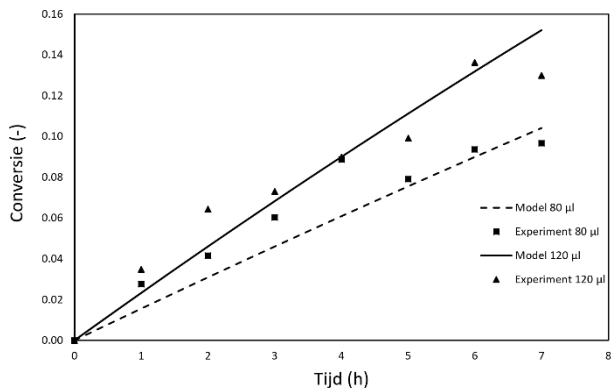
Hierbij vormt het enzym (E) en substraat (S), in dit geval cellulose, eerst een overgangscaplex ES om daarna te reageren naar product (P) met de recuperatie van het enzym. Het netto verbruik van cellulose kan dan beschreven worden met de volgende vergelijking ⁹.

$$\frac{dC_S}{dt} = -k_2 C_{E,tot} \frac{C_S}{K_S + C_S}$$

De opgemeten experimentele data wordt dan gebruikt voor het schatten van de parameters in dit model (k_2 en K_S), door minimalisatie van de kwadratensom, met het programma Athena Visual Studio[®].

Enzymatische hydrolyse

De hydrolyse reactie uitgevoerd met twee verschillende concentraties aan enzym wordt goed beschreven door het Michaelis-Menten model (Figuur 5), in een tijdsinterval van 7 uur. De experimenten en het model beschrijven correct een hogere omzettingssnelheid met een hogere concentratie aan enzym.



Figuur 5: Conversie van cellulose naar glucose (T = 40 °C, pH = 6) experimenteel versus Michaelis-Menten model met parameters uit Tabel 1

De parameters zijn geschat door niet-lineaire regressie aan al de experimentele data en zijn weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1: Optimale parameters bepaald voor het Michaelis-Menten model dat de hydrolyse van cellulose naar glucose beschrijft.

Parameter	Optimale schatting	95% betrouwbaarheidsinterval
k_2 (1/s)	$3,08 \cdot 10^4$	-
K_S (mol/l)	$2,67 \cdot 10^1$	$[2,53 \cdot 10^1 ; 2,81 \cdot 10^1]$

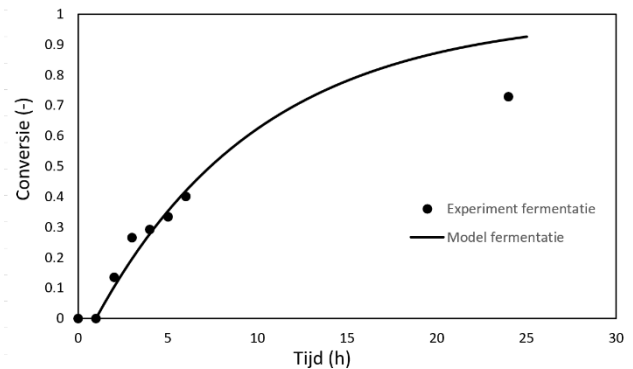
Fermentatie

De fermentatie wordt goed beschreven door het Michaelis-Menten model (Figuur 6), waarvoor de geschatte parameters gegeven worden in Tabel 2. Bij hoge conversie

wijken model en experiment echter af omdat de gistcellen afsterven bij een hoge ethanolconcentratie. Dit komt neer op een deactivering van de katalysator, en is niet opgenomen in het model.

Tabel 2: Optimale parameters bepaald voor het Michaelis-Menten model dat de fermentatie van glucose naar ethanol beschrijft.

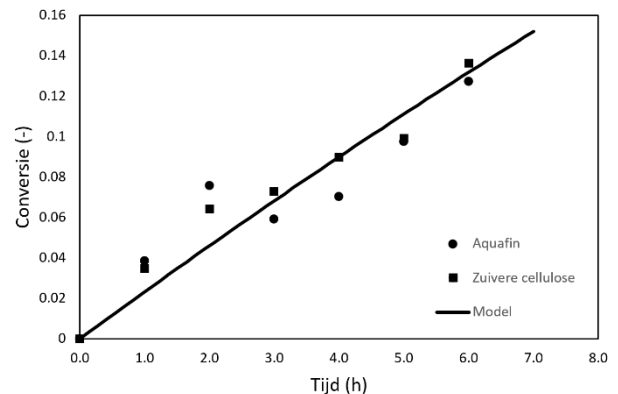
Parameter	Optimale schatting	95% betrouwbaarheidsinterval
k_2 (1/s)	$8,71 \cdot 10^3$	$[7,30 \cdot 10^3 ; 1,01 \cdot 10^4]$
K_S (mol/l)	$6.84 \cdot 10^3$	-



Figuur 6: Conversie van glucose naar ethanol (T = 30 °C, pH = 6) experimenteel versus Michaelis-Menten model met parameters uit Tabel 2

Hydrolyse met cellulose van Aquafin

Het experiment van de hydrolyse is herhaald met de werkelijke afvalstroom verkregen van Aquafin, en vergeleken met de waarden voor zuivere cellulose. Zoals zichtbaar in Figuur 7, kan hetzelfde model de omzetting van beide grondstoffen correct simuleren.



Figuur 7: Vergelijking hydrolyse (T = 40 °C, pH = 6, $V_{enzym} = 120 \mu l$) van zuivere cellulose versus cellulose Aquafin en Michaelis-Menten model met parameters uit Tabel 1

INDUSTRIËLE SIMULATIE

De conversie van cellulose naar ethanol verloopt in twee reactiestappen, opdat beide onder optimale reactiecondities kunnen doorgaan. Daarna is nog een zuiveringsstap nodig om de gevormde ethanol van de waterige oplossing af te scheiden.

Processimulatie in Aspen Plus®

Het proces startend van cellulose tot de eerste destillatie van ethanol wordt gemodelleerd in Aspen Plus®. Teruggerekend van de typische dagelijkse productie van een kleine ethanol plant, verkrijgt men de hoeveelheid cellulose die elke dag verwerkt zou moeten worden. Dit komt uit op twee batches per dag van 29 m³ met een reactorinhoud van 377 m³¹⁰. Deze simulaties tonen aan dat het oplossen van cellulose een grote hoeveelheid water vereist, wat implicaties heeft op de economische haalbaarheid van het proces. Een bijkomend probleem is verlies van het enzym, dat wateroplosbaar is en dus mee stroomt met de afval producten in de bodemstroom van de destillatie.

CONCLUSIE

De enzymatische omzetting van cellulose naar ethanol werd in dit project met succes experimenteel uitgevoerd. Daarbij werd gebruik gemaakt van een accurate en innovatieve analysemethode om de concentratie van glucose te bepalen. De opgemeten kinetiek van de hydrolyse alsook van de fermentatie werd adequaat beschreven met het Michaelis-Menten model. Door een industriële simulatie van het volledige proces in Aspen Plus® zijn er nog een aantal uitdagingen voor de industriële toepasbaarheid gevonden. Onder meer de hoge kost door de onmogelijkheid het gebruikte enzym terug te winnen, en het excessieve gebruik van water, ten gevolge van de slechte oplosbaarheid van cellulose, maken dat dit proces vooralsnog economisch en ecologisch weinig haalbaar is.

ROL VAN DE STUDENTEN

Dit verslag kadert binnen het Vakoverschrijdend Project in de derde bachelor in de ingenieurswetenschappen Chemische Technologie en Materiaalkunde aan de

Universiteit van Gent. Het onderwerp is gekozen door promotor prof. dr. ir. Joris W. Thybaut, in samenwerking met Aquafin. Het onderzoek werd begeleid door ir. Anton De Vylder. Het uitvoeren van de experimenten, verwerken van de resultaten en verkrijgen van degelijke conclusies werd op een evenwichtige manier verdeeld tussen de vier studenten.

REFERENTIES

- (1) Dale, B. E. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2003**, 78 [10], 1093–1103.
- (2) Pauly, M.; Keegstra, K. *Plant J.* **2008**, 54 [4], 559–568.
- (3) Badger, P. *Trends new Crop. new uses* **2002**, 17–21.
- (4) Sun, Y.; Cheng, J. *Bioresour. Technol.* **2002**, 83 [1], 1–11.
- (5) Sigma-Aldrich. Information sheet Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC 26921 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2730?lang=en®ion=BE>.
- (6) Lin, Y.; Tanaka, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 69 [6], 627–642.
- (7) Albalasmeh, A. A.; Berhe, A. A.; Ghezzehei, T. A. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 97 [2], 253–261.
- (8) Vavilin, V. A.; Fernandez, B.; Palatsi, J.; Flotats, X. *Waste Manag.* **2008**, 28 [6], 939–951.
- (9) Bansal, P.; Hall, M.; Realf, M. J.; Lee, J. H.; Bommarius, A. S. *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27 [6], 833–848.
- (10) Humbird, D.; R. Davis; Tao, L.; Kinchin, C.; Hsu, D.; Aden, A. *Nrel* **2011**, No. May.