

**Институт по инженерна химия**  
**Българска академия на науките**

## **ДИ С Е Р Т А Ц И Я**

за присъждане на образователна и научна степен  
“ДОКТОР”

на тема

## **ПОЛУЧАВАНЕ НА БИОГАЗ ОТ ОТПАДЪЧЕН ГЛИЦЕРОЛ**

Шифър 4.2 Химически науки (Процеси и апарати в химичната и  
биохимичната технология)

**инж. Иван Константинов Ангелов**

**Научен ръководител:  
проф. д-р Венко Бешков**

**София, 2016 г.**

## Съдържание

1 Увод.....	3
2 Литературен обзор.....	5
2.1 Биодизел.....	6
2.2 Приложения на биогаза.....	23
2.3 Производство на биогаз чрез анаеробна ферментация.....	26
2.4 Изводи от литературния обзор.....	35
3 Цел.....	36
4 Задачи.....	36
5 Експериментална част.....	37
5.1 Материали и методи.....	37
5.2 Анализи.....	41
5.3 Охарактеризиране на микроорганизмите.....	42
6 Математично моделиране.....	43
7 Резултати и обсъждане.....	46
7.1 Опити в 8 – стъпален биореактор с корекция на рН.....	46
7.2 Резултати от микробиологичната идентификация на развитие на бактерии в реактора.....	57
7.3 Профили на междинните продукти.....	58
7.4 Резултати от математичното моделиране.....	64
8 Изводи.....	68
9 Означения .....	70
10 Литература.....	72
11 Трудове, доклади, включени в дисертацията, забелязани цитати.....	82

## 1. Увод

От края на XIX в., нефтът играе ключова роля за развитието на човечеството, както в социален, така и в икономически и технологичен аспект.

Нефтът бързо се превръща в един от основните и най – важни енергийни източници на света. Това води и до последвалата широкомащабна употреба на нефта в транспортния и енергиен сектор. През 2016 год. населението на Земята наброява около 7.5 млрд., като това води до повишаване на енергийните нужди. Това предполага огромно потребление на горива и води до силно замърсяване на околната среда. В резултат се оказва неблагоприятно влияние чрез парниковия ефект. Друг резултат от прекомерната употреба на нефта, е замърсяването на въздуха в градовете, основно в големите, в които е концентрирано все по – голяма част от населението на Земята чрез обществения и частен транспорт.

Биогоривата се определят като алтернатива на конвенционалните горива, но в контекста на опазването на околната среда от замърсяване, биха могли да се превърнат в горива на бъдещето. Биогоривата се получават при преработката на биомаса, която е възобновяем източник на енергия. Под “биогорива” се разбират етанолът, произведен от биомаса по ферментационен път, биодизелът, произведен от растителни и животински мазнини и биогазът, добиван при анаеробната ферментация на органични отпадъци.

България има отлични условия за развитието на такива производства. Обработваемата земя е 4,9 млн. ха или 44 % от територията на страната. Подходящият климат, позволяващ отглеждане на различни култури, обработваемите земи и традициите допринасят за производството на биогорива. Необработваемата земя е 461,142 ха или 8 % от цялата земеделска земя. Неизползваната земя (необработваемата и некултивираната) през 2005 година е била 19 % от цялата агроземеделска земя. Тези данни представят добра възможност за развитието на индустриално производство на биогорива.

Биодизелът представлява едно от най – значимите биогорива – алтернатива на традиционното дизелово гориво. Основен проблем при производството на биодизелово гориво е отделянето на големи количества отпадъчен глицерол, почти еднакви с количеството на използвания метанол. Този глицерол е замърсен с калиева основа (катализатор на транс-естерификацията на липидите до метилови естери на висшите

мастни киселини) и остатъчни мастни киселини. Тези замърсявания и ограничения пазар на чист глицерол не позволяват директната му употреба за конвенционални цели.

От друга страна е известен процесът на анаеробна ферментация на органични отпадъци от естествен произход за получаването на биогаз. Последният представлява смес от основно метан и въглероден диоксид с енергийно съдържание около  $26 \text{ MJ/m}^3$ , което го прави годен за използването му като гориво.

В настоящата дисертационна работа се изследва възможността за оползотворяването на отпадъчния глицерол за добиване на енергия под формата на биогаз, получаван чрез анаеробна ферментация, както и на други продукти, основани на глицерола като суровина.

## 2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

С повишаването на нуждите от нефт, най – вече в транспортния сектор, се оформят и целите, които си поставят Зелената и Бялата книга на Европейската комисия. Целите включват до 2020 година, 20% от енергийните източници да се заменят с биогорива, природен газ, водород, или други екологични горива (биоетанол, биодизел), да се намалят на половина превозните средства от градския транспорт (които използват конвенционални горива) до 2030 год., и последващо преустановяване на тяхната употреба до 2050 год., съчетано със замяна на тези превозни средства, с такива използващи алтернативни горива. Смисълът на тези цели, е да се намалят вредните емисии и да се предложат нови енергийни източници.

Горивата в транспортния сектор представляват 32% от общата консумация на горива в ЕС, и имат дял от 28% от цялото количество отделени парникови газове. Около 80% от нефтените продукти на европейския пазар представляват внос.[1] Анализите показват покачване на пътническия транспорт с 50 %, а товарните превози – с 80 % до 2050 год. Това покачване на транспортните услуги, ще изисква и нови решения, които от една страна ще целят опазване на околната среда, а от друга развитието на икономическите процеси. [2]

През февруари 2006 година Европейската Комисия представи стратегията на ЕС за биогорива. В нея се включват следните приоритети:

- Представяне на биогоривата в ЕС и развиващите се страни;
- Подготовка за широкомащабна употреба на биогорива, чрез подобряване на техникo – икономическите фактори;
- Проучване на „второ поколение” биогорива (на базата на целулоза-съдържащи суровини);
- Проучване на възможностите на развиващите страни да произвеждат биогорива.

Тук ще направим кратък преглед на някои биогорива (биодизел, биогаз), тяхното приложение и проблемите, които поражда то.

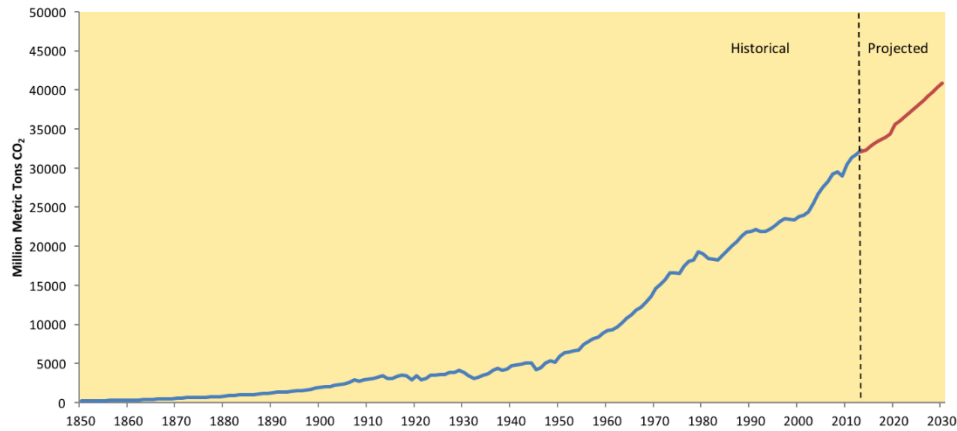
## 2.1. Биодизел

Биодизелът представлява смес от естери на висшите мастни киселини с метанола, а понякога и с етанола. За производство на биодизел могат да се използват различни мазнини, които се получават от:

- Рапица и соя
- Преработено отпадъчно олио
- Животински мазнини
- Водорасли – могат да се отглеждат с използването на отпадъчни материали и води, и без да е необходимо да се заделя обработваема земя. Предимствата на този метод, е че водораслите могат да бъдат отглеждани върху необработваема земя, като в пустините или в моретата.

Производството на тези естери става чрез транс-естерификация, т.е. заместването на глицерола в липидите с метанол или етанол. [3]

Биодизелът е класифициран като моноалкил – естер, получен при трансестерификация на метанол с висши мастни киселини. Те се получават от растителен и животински произход. Основни суровини са отпадъчното олио от готвене, соево масло, рапично масло, слънчогледово олио, животински мазнини и др. В транспортния сектор може да се смесва с обикновен дизел, като получените смеси се означават с буквата В и следва число показващо процентното съдържание на биодизел в смеската. В търговските вериги се използват смеси от В5, В10, В20 (съответно 5%, 10% и 20 % биодизел) [4]. Биодизелът може да се използва и за загряване на вода в домашни и промишлени бойлери. На изложението за биодизел през 2006 год. във Великобритания, е представено проучване, според което ако се използва биодизел от тип В 20, количеството на отделяните CO<sub>2</sub> емисии може да се намали с 1,5 млн. тона въглерод годишно. За сравнение, глобалните годишни емисии на въглероден диоксид през 2010 г. възлизат на 35 Gt въглероден диоксид [5], вж. Фиг. 1.



Фиг.1. Годишни емисии на въглероден диоксид в глобален мащаб [5].

Калоричната стойност на биодизела е между 37 и 40 MJ/L. Той не съдържа серни съединения. За сравнение, традиционното дизелово гориво има енергийно съдържание от около 46 MJ/L.

*Историческо развитие на технологиите за производство на биодизел* [6]. Идеята да се използват растителни масла като горива за дизелови двигатели е на възраст повече от сто години. Както отбелязва Кнот [7] (в обзор върху историческото развитие на производството на биогорива), самият Рудолф Дизел е провеждал изпитвания на растителни масла. Тъй като, обаче базираните на нефт горива скоро станали налични в големи количества на сравнителни ниска цена, интересът към растителните масла отслабнал. Едва през 70<sup>-те</sup> години на XX в. световните нефтени кризи и нарастващото екологично съзнание доведоха до повторно откритие на растителните масла като възможни алтернативи на базираните на въглеводороди горива.

Това обаче включва преодоляването на някои препятствия. Растителните масла обичайно показват вискозитети, 10 до 20 пъти по – високи от вискозитета на изкопаемото дизелово гориво. Това качество води до лошо атомизиране на горивото и резултатът е непълно изгаряне, което е било вече установено през 20<sup>-те</sup> години на XX в. [8]. Изключително високите пламни точки на растителните масла и склонността им към термична или окислителна полимеризация усложняват положението, водейки до образуване на отлагания върху инжекторните дюзи, постепенно разреждане на смазочното

масло и слепване на буталните пръстени. Като последица, продължителната работа с чисти растителни масла или смеси от растителни масла и изкопаемо дизелово гориво, неминуемо води до повреда на двигателя [9]. Тези проблеми могат да се разрешат или чрез приспособяване на двигателя към горивото, или чрез приспособяване на горивото към двигателя. Първата стратегия доведе до разработването на двигатели за работа с растителни масла, които обаче, едва ли са търговски приложими в днешно време. Втората стратегия имаше за цел модифициране на растителните масла чрез различни технологии за получаване на горива, които се доближават до свойствата и експлоатационните характеристики на изкопаемия дизел. Трите най – широко използвани технологии в този контекст са пиролиза, микроемулгиране и преестерификация [10].

*Пиролиза* означава реакции на термично разграждане, извършвани в отсъствие на въздух. Чрез пиролиза цетановото число на растителните масла се повишава, а концентрациите на сяра, вода и утайка за получените продукти са приемливи. Според съвременните стандарти, обаче, вискозитетът на горивата се счита за твърде висок, пепелта и въглеродният остатък далеч превишават стойностите за изкопаем дизел, а свойствата в студен поток на пиролизирани растителни масла са лоши [11].

*Микроемулгиране* е образуването на термодинамично стабилни дисперсии на две обикновено неразтворими течности, осъществявано чрез едно или повече повърхностно – активни вещества. Много изследователи са изучавали микроемулгирането на растителни масла с метанол, етанол или 1 – бутанол [12], [13], [10]. Те достигнали до извода, че микроемулсиите на растителни масла и алкохоли не могат да се препоръчат за продължителна употреба в дизелови двигатели, поради същите причини, както използването на чисти растителни масла. Получените горива са склонни към непълно изгаряне, образуване на въглеродни отлагания и повишаване на вискозитета на смазочното масло ([13].

*Преестерификацията* с нисши алкохоли, обаче, се оказва идеалното модифициране, така че терминът „биодизел“ сега се използва само за означаване на продукти, получени по тази технология. Реакцията между триглицериди и нисши алкохоли, при която се получава свободен глицерол и мастно – киселинни естери на съответния алкохол, е описана за първи път през 1852 г. [14]. Енрикес [15] постигнал почти пълно превръщане чрез взаимодействие на растителни масла с метанол в присъствие



на калиев хидроксид като катализатор. Вече през 1985 г. малка пилотна инсталация в Силберг, Австрия, започва производството на метилови естери на рапично масло на базата на новаторска технология при ниско налягане и ниска температура, която е разработена от Мителбах [16]. Последва първата инсталация за производство на RME през 1991 г. (Ашах/Донау, Австрия), а през 1996 г. две високопроизводителни промишлени инсталации в Руен, Франция, и Леер, Германия документират бързото разрастване на младата биодизелова индустрия.

Днес биодизелови горива са в търговска употреба в много страни, включително Австрия, Чехия, Германия, Франция, Италия, Словакия, Испания и САЩ. Понастоящем почти всяка страна по света развива дейност по производство и използване на биодизел. Биодизелът се използва или в чиста форма, или като смеси с изкопаемо дизелово гориво, които – за разлика от смесите чисто растително масло/дизел – са стабилни при всяка концентрация. Страните, в които се продават горива от чисти мастно – киселинни метилови естери (FAME), са Германия, Австрия и в по – малка степен Швеция. Във Франция, Чехия, и Испания, се продават смеси на биодизел с изкопаем дизел ( в диапазон от 30 % до 36 %), използвани преимуществено от големи общински автомобилни паркове.

**Суровини за производство на биодизел. Традиционни суровини.** Сред традиционните суровини за производство на биодизел доминират основно четири маслени култури – рапично масло, слънчогледово масло, соево масло и палмово масло. Проблемите при тяхната употреба се изразяват в няколко направления. Основното е, че се използва суровина, която е от голямо значение за други сектори, като хранително – вкусовата промишленост. Сред другите установени проблеми са трудното отглеждане на рапица – за разлика от житните растения или царевичата, рапицата не може да се отглежда като монокултура и е препоръчително канола (другото наименование на маслодайната рапица) да се култивира на едно и също поле само всяка трета или четвърта година, поради икономически и екологични причини. Следователно потенциалното отглеждане на рапица на наличната обработваема земя е ограничено [17].

Маслото от слънчогледово семе е на второ място в списъка на растителните масла за производство на биодизел в Европа. Безспорно признато като ценен маслен източник за човешка консумация, високото му съдържание на линолова киселина ограничава използването му производство на гориво. Според европейският стандарт за биодизел [18]

(EN14214) чистите метилови естери на слънчогледовото масло не могат да се използват като гориво за дизелови двигатели, тъй като то превишава границата за йодно число, установена на  $\leq 120 \text{ g I}_2/100\text{g}$ . Освен това горивата от слънчогледово масло без добавки дават също така лоши оценки за окислителната стабилност.

Маслото от соя е най – популярната суровина за биодизел в САЩ. Подобно на слънчогледовото масло, относно мастно – киселинния състав му състав, соевото масло показва йодни числа от 121 – 143  $\text{g I}_2/100\text{g}$ . Поради това EN 14214 изключва възможността чисти метилови естери на соевото масло да служат като гориво.

Маслодайната палма играе важна роля за производството на биодизел в Южна Азия. Различни части от палмовите плодове могат да се използват за производство на масло за човешка консумация и индустриални приложения. Високото му съдържание на наситени мастни киселини, водещо до неприемливо високи стойности за точка на задръстване при студено филтриране ( $+11 \text{ }^\circ\text{C}$ ) и точка на помътняване ( $+13 \text{ }^\circ\text{C}$ ), пречи за зимно опериране на чисти метилови естери на палмово масло при умерен климат. Освен това високото съдържание на свободни мастни киселини в суровината причинява проблеми при традиционното алкално – катализирано производство (чрез преестерификация) на биодизел и следователно прави неизбежна необходимостта от етапи на обезкиселяване или киселинно – катализирана предварителна естерификация.

За производство на биодизел могат да се използват и алтернативни хранителни масла като етиопски синап, и масло от вид артишок. Изборът на суровина в определен район зависи от главно от съответните климатични условия.

**Нехранителни масла.** Един от начините за намаляване на производствените цени за биодизеловите горива е използването на нехранителни масла, които са значително по – евтини от хранителните растителни масла. Голям брой растителни горива съдържат вещества, които ги правят негодни за човешка консумация. В някои случаи тези вещества могат да се отстранят чрез рафиниране. Сред нехранителните масла, използвани за производство на биодизел, специално внимание заслужават рициновото масло и различни масла, произвеждани в Индия. Голям брой нехранителни растителни масла с произход от Индия също биха могли да са подходящи като суровина с ниска цена за производство на биодизел. Друг потенциален вид суровина за получаване на биодизел могат да бъдат животинските мазнини и масла. Тъй като са вторични продукти от месната и рибната

промишленост, те имат ниски цени и представляват потенциални суровни за производство на биодизел. Въпреки това, те имат и своите недостатъци като високо съдържание на наситени мастни киселини в животинските мазнини, което води до получаването на метилови естери с лоши нискотемпературни свойства, което създава проблеми при работа в зимни условия.

Рециклираните или отпадъчните масла се развиват като много популярни суровини за производство на биодизел, тъй като те са евтини и предлагат допълнителни предимства по отношение на околната среда от използването на субстанции, които иначе би трябвало да се изхвърлят. Рециклирано пържилно масло е изследвано също като суровина за производство на биодизел от М. Мителбах (M. Mittelbach), който по – късно разработва промишлен процес за превръщане на отпадъчно масло от домакинства и ресторанти, както и на мастни отпадъци от кланници и инсталации за канални води в биодизелови горива [19]. Освен това Мителбах и Юнек доказват, че преестерификацията служи като способ за пречистване, така че могат да се произвеждат биодизелови горива, които като качество са равностойни на RME и дори показват подобрени емисии на отходни газове, в сравнение с естери, произведени от пресни масла. Сред останалите отпадни масла се нареждат маслото от оризови трици, маслото от пулпа на палмовия плод, соевият сапшчок, маслиново масло (при получаването на страничен продукт серно масло, при рафиниране на маслиново масло), отпадъчни индустриални масла като таловото масло, сифонни мазнини, събирани от каналните води в ресторанти и столови кухни, особено като се има в предвид, че този материал трябва да се изхвърля на определени места [20].

Всички тези проучвания, разработки и експерименти с различни видове суровини, довеждат до усъвършенстване на методите за получаване на биодизел, в резултат неговото производство и употреба в световен мащаб се увеличава.

**Обем на производството на биодизел.** Биодизел се произвежда в ЕС от 1992 год. Днес съществуват около 120 фабрики. Тези фабрики са разположени главно в Германия, Италия, Австрия, Франция и Швеция. Световното производство на биодизел е достигнало 3,8 млн. тона през 2005 год. През следващите няколко години, производството на биодизел само в САЩ се увеличава като достига 3,7 млн. тона през 2011 г. и 6,6 млн. тона през 2013 г. През 2016 год. производството на биодизел е около 6 100 000 тона/год. за ЕС и около 7

806 320 тона/год. за САЩ. Общото годишно производство на биодизел в световен мащаб възлиза на около 15 млн. тона. [21], [22].

**Ползи от използването на биодизел. Екологични ползи.** Биодизелът не съдържа сяра и ароматни съединения, а използването му в конвенционални дизелови двигатели води до намаляване емисиите на недоизгорените въглеводороди и на въглероден моноксид. Проучване на Министерството на енергетиката на САЩ показва, че производството и употребата на биодизел (B100), в сравнение с конвенционалния дизел, води до 78,5 % намаление на емисиите от CO<sub>2</sub> спрямо тези от конвенционалното дизелово гориво [23]. Според европейския биодизел борд, използването на биодизел отделя с до 65 – 90 % по – малко емисии от CO<sub>2</sub> в сравнение с обикновен дизел [3].

Намалението на емисиите при използване на биодизел спрямо тези при конвенционалното дизелово гориво се илюстрира от данните в таблица 1.

Таблица 1. Сравнение на емисиите от биодизел и конвенционален дизел [24].

Тип емисия	Биодизел	Дизел
	(% от ЕИО нормите 1993)	
Въглероден моноксид	60	180
Общо въглеводороди	90	150
Азотни оксиди	65	60
Фини прахови частици	95	190

Налични са огромно количество данни за измервания на законово ограничени компоненти на отработени газове. При сравняване на тези резултати, обаче, трябва да се имат в предвид някои моменти. Първо, отходните газови емисии се различават силно в зависимост от типа на двигателя, изпитните цикли и качеството на използваните горива. В Таблица X, са посочени само относително емисионни промени между биодизелови (разграничени на метилови и етилови естери на рапично масло – РМЕ РЕЕ, метилови естери на соево масло – СМЕ) и изкопаеми дизелови горива. Второ, емисионните стойности се влияят силно от прилагането на система за последваща обработка на отходните газове. Ако не е определено нещо друго, емисиите, получени от дизелови

горива с високо съдържание на сяра, без използване на конвертор за каталитично окисление, служат като база за сравнение, както е показано в Таблица 2.

Таблица 2. Сравнение на ограничени емисии между биодизел и изкопаемо дизелово гориво. Стойностите за изкопаемото дизелово гориво без конвертор за каталитично окисление са определени като 100 %.

<b>RME – етилов естер на рапично масло</b>	<b>CO</b>	<b>HC</b>	<b>NO<sub>x</sub></b>	<b>Прахови частици</b>
<i>Sharp</i> (1996) [25]	-39 %	-70 %	+3 %	-25 %
<i>Goerke</i> (1998) [26]	-41 %	-49 %	+12 %	-41 %
<i>Sams</i> (1998) [27]	-16 %	-33 %	+4 %	+11 %

<b>RME с конвертор за каталитично окисление</b>	<b>CO</b>	<b>HC</b>	<b>NO<sub>x</sub></b>	<b>Прахови частици</b>
<i>Hutwohl и сътр.</i> (1997) [28]	-78 %	-73 %	0 %	-58 %
<i>Hattingen и Adt</i> (1998) [29]	-36 %	-83 %	+12 %	-66 %
<i>Sams</i> (1998) [27]	-80 %	-81 %	-2 %	-46 %
<i>Eichlseder</i> (2003) [30]	-99 %	-99 %	+22 %	-48 %
<i>Hausberger</i> (2003) [31]	-99 %	-99 %	+17 %	-42 %

<b>REE – метилов естер на рапично масло</b>	<b>CO</b>	<b>HC</b>	<b>NO<sub>x</sub></b>	<b>Прахови частици</b>
<i>Peterson и сътр.</i> (1996) [32]	-51 %	-56 %	-12 %	+10 %
<i>Sharp</i> (1996) [25]	-35 %	-63 %	-3 %	-14 %
<i>Makareviciene и Janulis</i> (2003) [33]	-7 %	-53 %	+8 %	-68 %

<b>SME – метилови естери на соевото масло</b>	<b>CO</b>	<b>HC</b>	<b>NO<sub>x</sub></b>	<b>Прахови частици</b>
<i>Graboski и сътр.</i> (1996) [34]	-47 %	-44 %	+11 %	-66 %
<i>Purcell и сътр.</i> (1996) [35]	-23 %	-35 %	-10 %	-26 %
<i>Sheehan и сътр.</i> (1998) [36]	-46 %	-37 %	+9 %	-68 %
<i>Southwest</i>	-50 %	-95 %	+13 %	-30 %

<i>Research Institute</i> (2003) [37]				
<i>Sharp и сътр.</i> (2000) [38]	-38 % до -45 %	-74 % до -96 %	+4 % до +13 %	-28 % до -49 %
<i>Haas и сътр.</i> (2001) [39]	-40 %	-44 %	+10 %	-72 %
<i>Canakci, и Van Gerpen</i> (2003) [40]	-18 %	-43 %	+13 %	-61 %

Цитираните изследвания регистрират понижения в емисиите на въглероден оксид и въглеводороди за биодизелови горива. Тези резултатите се отдават на кислородното съдържание мастно – киселинните метилови естери, възлизащо на около 11 %, което води до по – пълно изгаряне. Що се отнася до азотните оксиди, почти всички цитирани изследвания докладват леко повишение за двигателите с биодизелово гориво. Причините за по – високите емисии все още не са напълно ясни. Някои учени поддържат тезата, че причината е по – високото кислородно съдържание на биодизела и произтичащото от това повишение в наличието на добре смесен кислород по време на процеса на изгаряне. Като основен проблем при контрола на емисиите се счита фактът, че всички мерки, които понижават емисиите на NO<sub>x</sub>, проявяват склонност да имат отрицателен ефект върху твърдите частици и обратно. Тази връзка обикновено се определя като „NO<sub>x</sub> / PM размяна“. Все пак вече са предложени няколко метода за преодоляване на тази дилема чрез комбинирани методи на конструкция на двигателя и последваща обработка на изпускните газове. За разлика от другите регулирани изпускани емисии, твърдите частици на дизела са сложна, нехомогенна в химическо и структурно отношение смес от органични и неорганични съединения..

**Проблеми при употребата и производството на биодизел.** Основен недостатък при употребата на биодизела е несигурната му стандартизация в зависимост от източника на мазнините. Това се изразява в различното цетаново число и в температурата, при която

чистия биодизел В 100 се превръща в гел, която варира в зависимост от естерите, които участват в него, а също така и от вида на суровината.

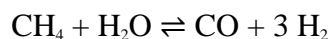
Друг основен проблем при производството на биодизелово гориво е отделянето на големи количества отпадъчен глицерол, почти еднакви с количеството на използвания метанол. За всеки 1 тон биодизел се произвеждат 100 кг глицерол. Този глицерол съдържа значителни количества вода, метанол, нереагирани мазнини, моно- и ди-глицериди, както и алкална основа, служеща за катализатор за транс-естерификацията. Ниското качество на този отпаден продукт прави невъзможно предлагането му на пазара преди основно пречистване. Хансен и сътр. [41], са изучавали състава на 11 вида отпадъчен глицерол, получени от 7 австралийски производители на биодизел. Установено е, че съдържанието на глицерол варира между 38 % и 96 %, като някои проби съдържат повече от 14 % метанол и 29 % пепел. Подобен състав на отпадъчния глицерол е очакван за малки инсталации. В повечето случаи, производството на биодизел включва използването на метанол и алкален катализатор, като натриев метоксид и калиева основа. Съответно в суровия глицерол се съдържат метанол, сапуни, катализатори, соли, неорганични вещества и вода. Например, суровият глицерол получен при производство на биодизел от слънчогледово масло съдържа 30 % глицерол, 50 % метанол, 13 % сапуни, 2 % влага, около 2 – 3 % соли (главно натриеви и калиеви), 2 – 3 % други замърсители [42].

Чистия глицерол намира редица приложения, в които обаче трудно може да бъде заместен от отпадъчния глицерол, основно поради изискванията за неговата чистота. Ако се стигне до годишно производство от 10 млн. тона биодизел (в ЕС, или 30 млн. тона в световен мащаб), това ще доведе до получаването на около 3 млн. тона/год. отпадъчен глицерол. Това е огромно количество глицерол (който е и отпадък), което поставя необходимостта от намиране на широк спектър от начини за неговото оползотворяване. Един от тези методи е получаването на биогаз (биометан). За постигане на максимално ефективно производство, се проучват различни схеми на хранване на биореакторите, както и избор на техния дизайн (разделяне на секции, определяне на размерите, броя и начина на свързване на секциите), контрол, състав и горимост на получения биогаз.

Глицеролът се използва като овлажнител и подсладящ агент в хранителните продукти и напитките. Въпреки, че има същата хранителна стойност като захарозата, глицеролът не повишава нивата на кръвната захар. Той се използва за производство на нитроглицерин,



който представлява съставка за различни експлозиви, като динамит и бездимен барут. Той намира приложение и във фармацията (един от най – широко разпространените методи за неговото оползотворяване) и парфюмерията (в сиропи за кашлица, пасти за зъби, сапуни). Разтвор на 10 % глицерол, предотвратява утаяването на танините в растителни екстракти. Отпадъчният глицерол може да се използва като гориво и директно да се изгаря (като котелно гориво или в малък ТЕЦ за когенерационно получаване на електрическа и топлинна енергия), но това води до силно замърсяване от отделените газове, а също така е и неефективно поради ниската му калоричност. Скорошни проучвания показват възможността за оползотворяване на отпадъчния глицерол за получаване на сингаз (синтезгаз, syngas), чрез паров реформинг (steam reforming) [43], [44], производство на водород [45] и производство на енергия чрез горивни и микробни биогоривни клетки [46], [47]. Един от най – използваните методи в Бразилия за получаване на енергия от биомаса е, чрез паров реформинг на метан (steam reforming):



В конкретния доклад [48] се проучва възможността за паров реформинг на отпадъчен глицерол. Поради агресивната природа на някои димни газове, е било установено, че температурата на парата, излизаща от котела трябва да е 400 °С, за да се избегне корозия [49], [50]. Необходим е прецизен контрол на температурата на горене, за да се избегне получаването на акролеин от непълното изгаряне на отпадъчния глицерол.

Друг метод за неговото оползотворяване е, да се използва като добавка към храната давана на животни – основно прасета и пилета. В този случай, обаче е установен проблем със замърсеността на отпадъчния глицерол, поради съдържащия се в него метанол [51]. Сред другите потенциални приложения на отпадъчния глицерол са получаване на биоразградими в-ва, използвани за направата на различни изделия, опаковки и др., заместване на етиленгликола (поради неговото корозивно и токсично действие), като антифриз в автомобилния сектор, като криоген – протектант при съхранение на микроорганизми в криогенни условия. Проучено е неговото приложение в препарати за размразяване на пътища и магистрали. В тези препарати се влага суров глицерол, отпадащ при производството на биодизел. В посочените препарати суровият глицерол съставлява

24,3 – 59,8 % [52]. Отпадъчният глицерол получен при производството на биодизел, може да бъде подходяща суровина за производство на високоефективни съединения от микроорганизмите. Друга възможност за оползотворяване на глицерола е използването му като хранителен субстрат от микроорганизмите във ферментационните производства за биосинтез на микробни метаболити. Суровият глицерол е бил използван като въглероден източник в хранителната среда за получаване на биополимери от видовете *Bacillus* и *Pseudomonas* [53].

Като основен източник на въглерод и енергия, суровият глицерол е включен в състава на ферментационна хранителна среда за производство на биоповърхностно активно вещество от *B. subtilis* ATCC 6633 и за продуцирането на биосърфактант от *B. subtilis* TD4 и *Pseudomonas aeruginosa* SU7 [54]

Anastacio et al., докладват, че суров глицерол, може да се използва директно, без етапи на пречистване, като източник на въглерод за производството на микробиален протеин от *Pichia Pastoris* [55].

**Водород и нискомолекулни горива.** Бактерията *Rhodopseudomonas palustris* е способна на фотоферментативно превръщане на суров глицерол във водород [45]. Производителността е близо 75 % от теоритичната. Скоростите и добивите на получаването на водород могат да бъдат повлияни от промяната на концентрацията на добавения азот. Въпреки това, съществуват някои препятствия, като конструирането на ефективни фотобиореактори. При използването на *Enterobacter aerogenes* HU-101 са установени по – високи добиви на водород и етанол. Това обаче, изисква разреждането на суровия глицерол със синтетични вещества [56]. Суров глицерол може да се използва като косубстрат за подобряване на получаването на водород и най – вече метан при анаеробната обработка на различни суровини като обществени отпадни води, канализационна утайка и отпадъци от кланниците [57, 58, 59].

**Глицеролът като суровина за химични продукти.** Натрупването му като отпадък от производството на биодизел е наложило търсенето на нови приложения на глицерола с оглед решаването на проблема с неговото натрупване, както и на едновременната му употреба като суровина, алтернативна на нефта в органичния синтез [60-62]. Такива опити са насочени към производството на различни органични вещества с широко промишлено значение, като полиоли за производството на пластмаси (2,3-бутандиол, 1,3-пропандиол)

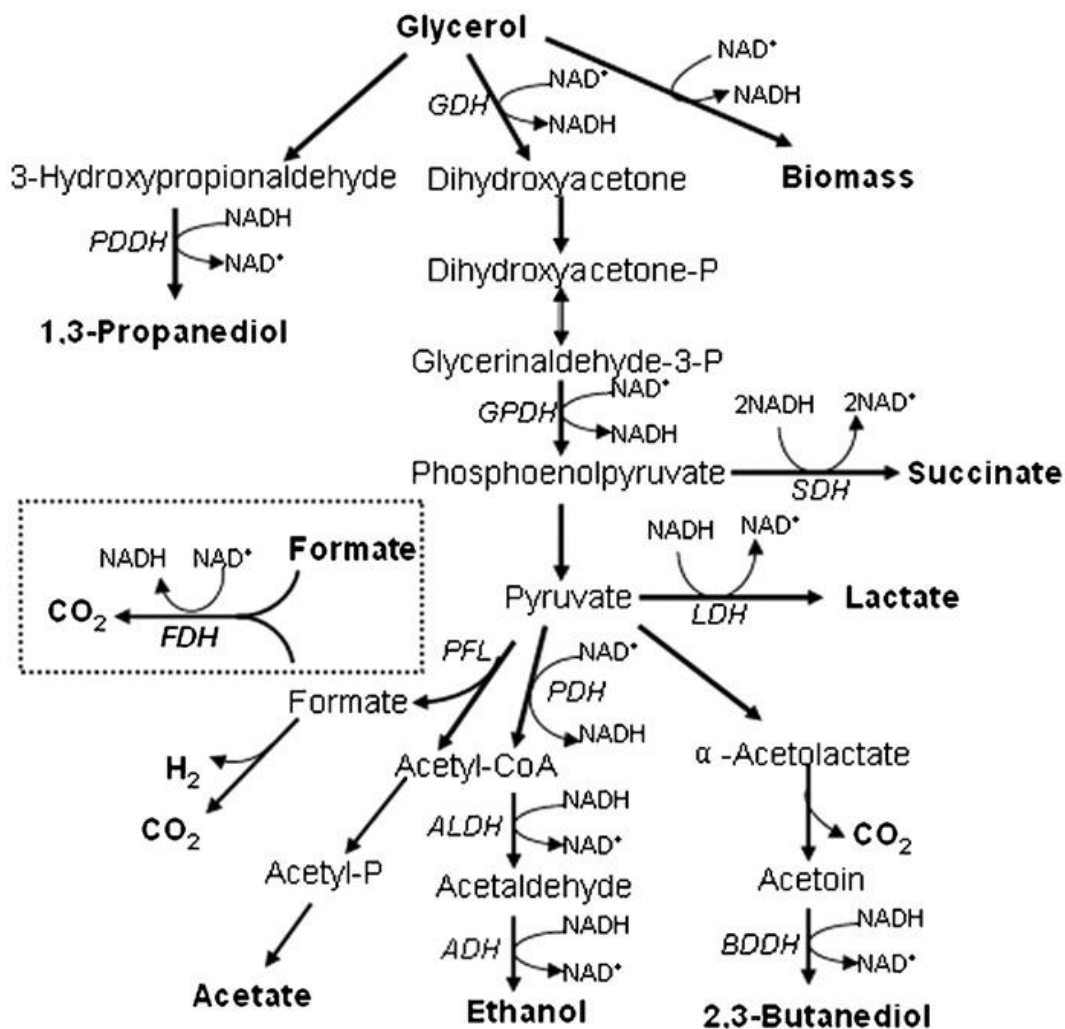
[63-66], млечна киселина за производството на биоразградими полимери [62, 63, 67, 68] пропионова [69,70] и янтарна киселина [64,65,71], превръщането му във водород [72] или въгледороди чрез каталитичен реформинг [73], за производството на епихлорхидрин, на дихидроксиацетон, етери [74], полиестери [67,68] и пр.

Един от начините за неговото оползотворяване, е чрез процеса на анаеробна ферментация до получаване на биогаз. Предимство на метода на анаеробна ферментация (АФ) е, че глицеролът може да се смесва с други отпадъци (като тор) с което се интензифицира процеса на АФ. Резултатът е повече биогаз и по – високо съдържание на метан в него, като се постига оползотворяване на 2 вида отпадъци (глицерол и биомаса). Със цел повишаване на ефективността на процеса се проучва влиянието на формата, размера и дизайна на реактора, е необходимо да се направи математичен модел, който описва АФ и дава представа за това как съответна форма (дизайн) на реактора влияе на добивите на биогаз. Тези резултати и изводите от тях, могат да помогнат при конструиране на биореактор в промишлени условия (машаби).

**Микробиологично превръщане на глицерола в химически продукти.** Известни са разработки за получаването на различни вещества от глицерол по микробиален път. Такива са дихидрокси-ацетонът [75,76], 1,3-пропандиолът [63-66] и пр.

Добре известно е, че 1,3-дихидроксиацетонът, 1,3-пропандиолът, янтарната киселина [64,65,71], пропионовата киселина [69,70,77], някои полиестери, като поли(хидроксиалканоати) се произвеждат от дейността на различни щамове. Тези полиестери са интересни с това, че се разграждат по естествен път в природата и затова се използват за опаковки на различни стоки с малко въздействие върху околната среда [67,68]. Освен това, 2,3-бутандиолът се получава и по ферментационен път от глицерол [78]. 2,3-бутандиолът е прекурсор при производството на бутадиен, метил-етилкетон и някои други приложения.

Различни бактерии (от родовете *Klebsiella*, *Clostridium*, *Enterobacter*) са в състояние да преработват глицерола, произвеждайки основни химически вещества, различаващи се по междинните реакции и продукти [61]. Метаболитната схема за превръщането на глицерол от бактериите от рода *Klebsiella* е предложена и обсъдена от Saxena *et al.* [79] и Zhang *et al.* [80]. Тя е показана на фиг. 2.

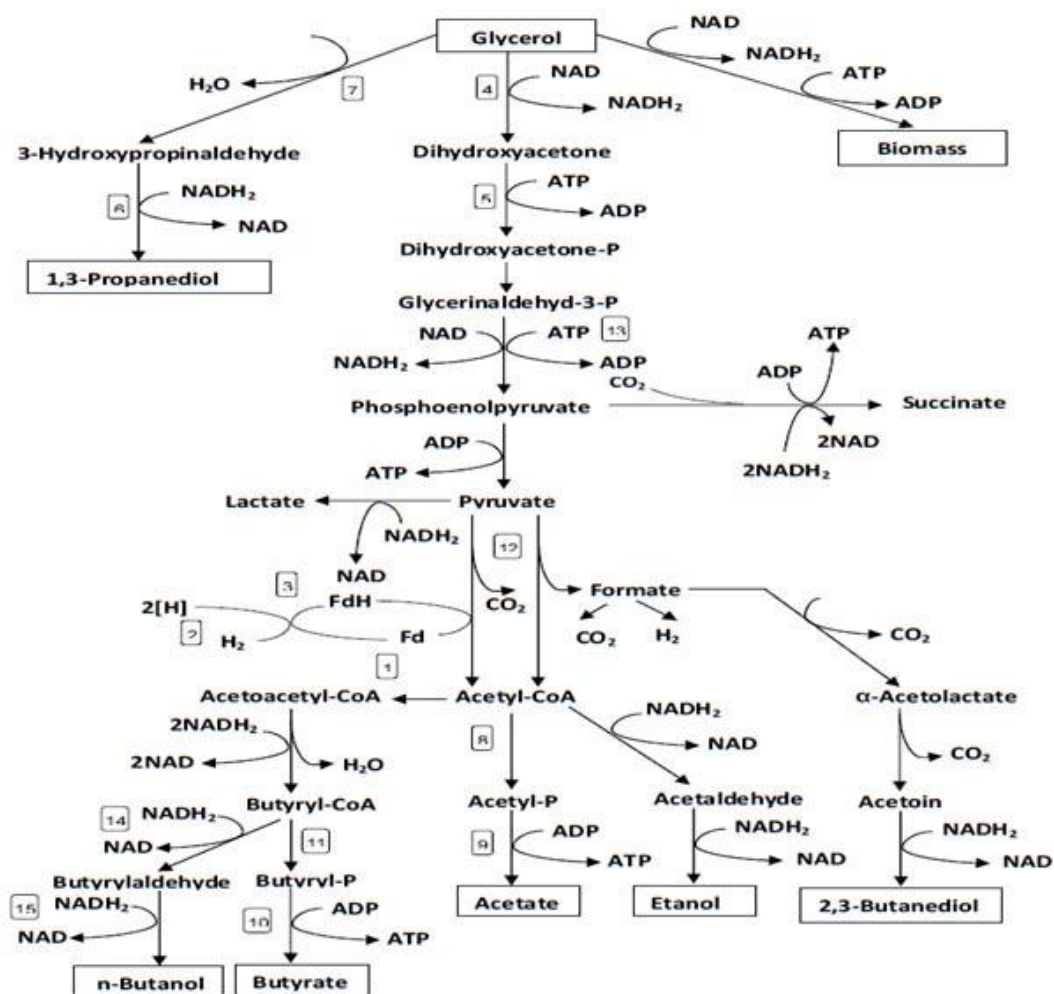


Фиг.2. Метаболитна схема на усвояване на глицерол от бактерии от рода *Klebsiella*. [79,80]

Вижда се, че по два конкурентни механизма се получават 1,3-пропандиол и 2,3-бутандиол. Освен това се получават като крайни продукти янтарна и млечна киселина, както и оцетна и мравчена. Възможен е и конкурентен механизъм за получаването на етанол.

Изследванията на превръщането на глицерола в ценни продукти при метаболизма на бактериите от вида *Clostridium* показват сходни процеси с този на рода *Klebsiella* [81-83]. При *Clostridium* основно се образуват 1,3-пропандиол, органични киселини (мравчена, оцетна, маслена, млечна), но и *n*-бутанол, вж. Фиг.3. При това остават проблемите с промяната на рН при образуването на органичните киселини за следващата метанова ферментация.

Изследванията върху метаболизма на бактериите от рода *Enterobacter* показват предимно получаването на етанол и водород [84-86].



Фиг. 3. Метаболитна схема на усвояване на глицерол от бактерии от рода *Clostridium*. [84-86]

Получаването на оцетна и мравчена киселина при тези метаболитни процеси представлява интерес във връзката с производството на биогаз (смес от метан и въглероден диоксид). В анаеробни условия и присъствие на метаногенни бактерии е възможно превръщането на мравчената и оцетната киселина (под формата на формиати и ацетати) в метан. Натрупването на киселините обаче води до подкиселяването на средата до рН, при които метаногенните бактерии се дезактивират.

Анаеробното превръщане на глицерола в енергия чрез анаеробна ферментация до биогаз представлява интересна възможност за добива на възобновяема енергия [87-89]. Белгийската фирма Organic Waste Systems (OWS) съобщава за използването на

произведения биогаз за захранването на завод за биодизел с енергия. Съобщава се, че глицеролът повишава значително добива на биогаз при подходящо подбрана микробна популация [90]. През последните години са известни множество изследвания относно ефекта на глицерола върху добива на биогаз при различни субстрати: оборски [91-93] и свински тор [88,94,95], активни утайки [96-98], както при по-сложни смеси от целулозни и битови отпадъци [88,89,99].

Във всички случаи се съобщава за значително повишаване добива на биогаз: от 180 до 400% по отношение на референтния субстрат. Характерно е обаче, че добавяните количества глицерол не са големи – от 1 до 4% тегл. по отношение на основния субстрат. Подаването на по-големи количества глицерол води до силно подкиселяване на средата и блокиране на метаногенезата [73,87].

Това означава, че не може да се очаква значително оползотворяване на отпадъчния глицерол под формата на биогаз.

Успоредно с тези процеси обаче протичат конкурентни микробни процеси до получаването на химични вещества (диоли, органични хидроксикарбонови киселини, нисши мастни киселини).

## ***2.2. Приложения на биогаза***

Полученият чрез анаеробно разграждане биогаз намира приложения в различни области. След подходяща обработка, той може да замести природния газ. Това води до намаляване зависимостта от внос на газ и нефт. Биометанът (метан, получен от биогаз) може да се инжектира директно в газопреносната мрежа, може да бъде използван като гориво за транспорта (като тук се включват не само автомобилите, но и превозни средства като автобуси, камиони, през-океански кораби, самолети), гориво за производство на топлинна и електрическа енергия (когенерация).

Получаването на биогаз чрез анаеробно разграждане, е широко използвано в съвременното общество за обработка на отпадъците от животновъдството, като целта е да се произведе възобновяема енергия. В страни със значително агроземеделско производство, затыгането на регулациите за животинските и растителни отпадъци, увеличи интереса към анаеробното разграждане, разглеждано като евтино и природосъобразно решение (Индия, Китай, Бразилия и др.). Анаеробното разграждане е стандартна технология за оползотворяване на активните утайки от пречиствателните станции за

отпадъчни води, органичен отпадък от хранително – вкусовата индустрия, твърди отпадъци от градската среда.

Биогазът има много приложения, в зависимост от природата на суровината и местните нужди. По принцип, биогаз може да се използва за производство на топлина чрез директно изгаряне, производство на електричество чрез горивни клетки и микротурбини, когенерация или като гориво за транспорта.

***Директно изгаряне и използване на биогаза за производство на топлинна енергия.*** Най – простия начин за оползотворяване на биогаза, е директното му изгаряне в котли или горелки. Биогазът може да се изгаря за производство на топлинна енергия на място или да се транспортира чрез система от тръби до крайните потребители. В случаите, при които целта е само производство на топлина, не е необходима обработка на биогаза.

#### ***Комбинирано производство на топлинна и електрическа енергия (когенерация)***

Когенерацията е стандартното приложение на биогаза в страни с развит биогазов сектор. Тя се смята за много ефективен начин за оползотворяване на биогаза за производство на енергия. Преди когенерацията, биогазът се изсушава. Повечето газови двигатели имат пределни ограничения за съдържанието на сяроводород и меркаптани в биогаза. Енергийната ефективност на централа работеща чрез когенерация е 90 %, като произвежда 40 % електрическа енергия и 60 % топлинна енергия.

Най – широко разпространеният вид централа е този от блоков тип с горивни двигатели свързани с генератор. Обикновено двигателите работят с постоянни обороти от 1500 rpm (оборота), за да бъдат съвместими с честотата на електрическата система.

Важно е от енергийна и икономическа гледна точка, да се оползотворява получената от биогаз инсталацията топлина. Обикновено, част от топлината се използва за затопляне на реактора и почти  $\frac{2}{3}$  от цялата произведена топлина може да се използва за допълнителни нужди. Много от по – ранните модели на биогаз инсталации са били конструирани основно за производство на електричество и не са били предвидени да оползотворяват получената топлина. Днес, оползотворяването на тази топлина, се смята за много важна част от ефективността на инсталацията.

Най – широко разпространената технология за генериране на енергия, е чрез вътрешно горене. Размерите на двигателите са различни и могат да варират от няколко

киловата до няколко мегавата. Газовите двигатели са два вида, такива при които запалването става чрез искра, и двигатели с двойна горивна система.

**Биогаз турбини и микротурбини.** Газовите турбини са стандартна технология, и основно се използват при производство на енергия от над 800 kW. В последните години, успешно са интегрирани малки по мащаб турбини (наречени микротурбини) произвеждащи енергия от 25 до 100 kW. Имат ефективност близка до тази на искровите двигатели, с ниски емисии и разходи за управление.

В биогаз микротурбините, въздухът се компресира в камера за изгаряне под високо налягане и смесен с биогаз. Сместа от въздух – биогаз се изгаря, като това води до повишаване на температурата и разширяване на газовата смес. Горещите газове се пускат през турбина, която е свързана към електрически генератор. Електрическият капацитет на микротурбините, е обикновено под 200 kW.

**Горивни клетки.** Горивните клетки представляват електрохимични устройства, които конвертират химическата енергия на дадена реакция директно в електрическа. Основната структура на горивната клетка се състои от твърд електролитен слой, който е в контакт с порьозен анод и катод от двете страни. В стандартна горивна клетка, газовото гориво се подава непрекъснато на анода, а оксидант (кислород от въздуха), се подава непрекъснато на катода. Електрохимическата реакция се провежда между електродите, като се получава електрическо напрежение.

При горивните клетки, основани на метана като гориво последният предварително се превръща в синтез-газ. От него след това се отнема въглеродният оксид, а оставащият водород захранва горивната клетка.

Горивните клетки имат потенциала да станат малкомащабните централи на бъдещето. Технологията на горивната клетка е на 160 години. Въпреки това, широко мащабното използване все още не е достигнато. Горивните клетки могат да достигат потенциал от над 60 % и имат ниски нива на емисии. Специален интерес за приложение в биогаз централите представляват високотемпературните горивни клетки, които работят при 800 °C, тъй като CO<sub>2</sub> не инхибира електрохимичния процес, а служи като преносител на електрони.

**Модифициране на биогаза.** Биогаза може да бъде доставян чрез съществуващата естествена национална газова мрежа, като се използва за същите цели като природния газ,



или може да бъде компресиран и използван като възобновяемо гориво за транспорта. Преди включването му в газовата мрежа, биогаза трябва да мине през процес на обработка, при който всички замърсители се отстраняват включително и  $\text{CO}_2$ , като съдържанието на метан се увеличава от 50 – 75 % до повече от 95 %. Модифицираният биогаз често се класифицира като биометан.

**Биогаз като гориво за транспорта.** Употребата на биогаз в транспортния сектор, е технология с голям потенциал и важни социалноикономически предимства. Биогазът вече се използва като гориво в държави като Швеция, Германия и Швейцария.

Броят на частните автомобили, обществения транспорт и камионите, използващи биогаз (биометан), се увеличава. Биометанът може да се използва като гориво по същия начин и от същите превозни средства, както тези, използващи метан. Увеличава се броят на европейските градове, които сменят дизеловите градски автобуси с газове. Установено е успешно използване на природен газ в товарен кораб с търговска цел. Възможно е, използваният в кораба природен газ, да бъде заместен от биометан (получен от биогаз). Известни са и проведените в миналото опити за захранване на пътнически самолети със метан (експериментален модел TU – 155, първо захранван с водород, а след това с втечен метан), като днес тези проучвания се подновяват. Компании като Aviat Aircraft, Chromarat и Катарските авиолинии (Qatar Airways) проектират и използват самолети, захранвани с метан (втечен или компресиран).

Превозните средства използващи биометан имат значителни предимства в сравнение със стандартните бензинови и дизелови двигатели. Общите емисии на  $\text{CO}_2$  драстично се намаляват, в зависимост от суровината и произхода на електрическата енергия, използвана за обработката на биогаза. Емисиите от частици също драстично се намаляват, дори в сравнение с модерните дизелови двигатели оборудвани с филтри за частици.

В сравнение с други биогорива се смята, че модифицираният биогаз (биометан) има най – голям потенциал като гориво за транспорта.

**Получаване на въглероден диоксид и метан за нуждите на химическата индустрия.** Получаването на чист метан и  $\text{CO}_2$  от биогаз може да бъде добра алтернатива от получаването им от нефтени източници. Метанът и  $\text{CO}_2$  са важни субстанции за

химическата индустрия. Чист  $\text{CO}_2$  се използва при производството на поликарбонати, сух лед или при обработка на повърхности (пясъчно-струйни инсталации с  $\text{CO}_2$ ).

**Приложение на компоста.** Агроемелското производство на биогаз, е интегриран елемент на модерното земеделие, което взема предвид не само икономическите, но също така и социалноикономическите ползи и опазването на околната среда.

**Анаеробно разграждане – технология за обработка на животинските отпадъци.** Отглеждането на животни е свързано с получаването на тор в големи количества. В някои случаи, фермите не притежават достатъчно земя, за да оползотворяват получения тор и утайки. Допълнителното количество тор, изисква адекватни мерки за управление, за да се предотвратят сериозните последици от прекалено наторяване.

**Приложение на компоста като тор.** Компостът е по – хомогенен и с по – добро съотношение на азотно – фосфорния баланс ( $\text{N} - \text{P}$ ), в сравнение с течния тор. Съдържа определени хранителни за растенията вещества, което дава възможност за прецизно наторяване съобразено с плановете на съответната ферма. Компостът съдържа по – голямо количество неорганичен азот, който е и по – усвояем от растенията, в сравнение с необработеният течен тор.

**Ефекти от използването на компост за наторяване.** Разграждането на органична материя, което става чрез процеса на анаеробно разграждане, включва разграждане на въглеродни връзки, органични киселини, разяждащи вещества и др. Поради тази причина, когато се използва в почвата, компостът е по – малко стресиращ за почвените микроорганизми, в сравнение със суровия течен тор. Директните измервания на биохимичната потребност от кислород (БПК) на компост получен от говежди и свински тор, показват 10 пъти по – ниско БПК, отколкото при суровия течен тор. [100]

### **2.3. Производство на биогаз чрез анаеробна ферментация**

Анаеробното разграждане (АР) на органични вещества представлява серия от процеси, в които микроорганизмите разграждат биоразградимите материали в отсъствие на кислород. Това е широко използван процес при третирането на отпадни води и органични отпадъци [101-103]. Анаеробното разграждане също така се използва и като възобновяем източник на енергия, тъй като при този процес се образува биогаз, който би могъл частично да замести горивата, получени от нефт, например природния газ. Според

Програмата за развитие на Обединените нации (ПРООН), съоръженията работещи с анаеробно разграждане са определени като най-достъпните децентрализирани източници на енергия, заради по – ниските капиталови разходи в сравнение с големите енергийни централи. Почти всеки органичен материал може да бъде усвоен чрез анаеробно разграждане. Това включва биоразградими материали като отпадъчна хартия, растителни отпадъци, остатъци от храна и животински отпадъци.

В развиващите се държави, базираните в домашни условия съоръжения, използващи процеса на анаеробното разграждане, предлагат потенциална възможност за получаване на евтина енергия за готвене и осветление.

**Намалени парникови газове.** Днешните световни енергийни доставки са силно зависими от изкопаеми източници (като суров нефт, лигнит, въглища, природен газ). Тези източници са получени от растителни и животински остатъци, които са били изложени на топлина и налягания в продължение на стотици милиони години. Поради тази причина, изкопаемите горива са невъзобновяем източник, като резервите се изчерпват много по – бързо отколкото новите се формират.

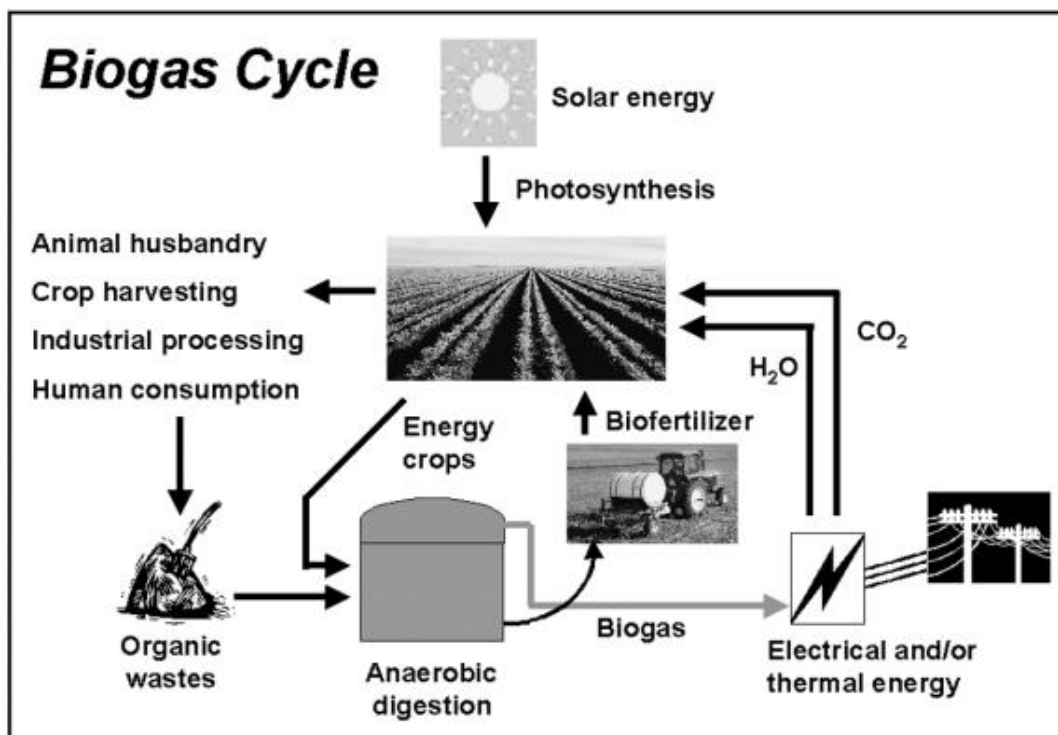
Използването технологията за получаване на биогаз би помогнало да се намалят емисиите от парникови газове по следните няколко начина:

- Заместване на нефтени горива;
- Намаляване на емисиите от метан;
- Намаляване на загубите на пренос в електрическата мрежа.

Използването на горива като лигнити, въглища и нефт, освобождават съхранявания в продължение на милиони години  $\text{CO}_2$  в атмосферата. Увеличаване на концентрацията на  $\text{CO}_2$  в атмосферата, води до глобално затопляне, тъй като  $\text{CO}_2$  е парников газ. Изгарянето на биогаз също отделя  $\text{CO}_2$ . Въпреки това, главната разлика при сравняване с изкопаемите горива, е че въглеродът в биогаза е бил скоро (в днешно време) абсорбиран (усвоен), чрез фотосинтетичната активност на растенията. По този начин въглеродният цикъл е затворен в много кратък времеви период. Производството на биогаз чрез анаеробна ферментация също така намалява и емисиите от метан и азотен оксид при складирането и използването на необработен животински тор. Парниковият потенциал на метана е по – висок от този на въглеродния диоксид с 23 пъти, и с 296 пъти повече от този на двуазотния оксид. Ако биогазът замести изкопаемите горива при производството на енергия и транспорт, ще се

намалят емисиите на CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, допринасяйки за намаляването на глобалното затопляне.

Принципна схема за рециклиране на въглерода във формата на въглероден диоксид и метан е представена на фиг. 4.



Фиг. 4. Принципна схема за кръговрата на въглерода и неговото оползотворяване [104]

**Принос към околната среда и енергийните цели на ЕС.** Борбата с глобалното затопляне е един от главните приоритети на ЕС за енергийната политика и политиката за околната среда. Целите на ЕС за производството на възобновяема енергия, намаляване на парниковите емисии, и устойчиво управление на отпадъците са основават на поетия ангажимент от страните членки да използват подходящи мерки, за да бъдат тези цели постигнати. Производството и използването на биогаз от АР има потенциала да отговори на всичките три цели едновременно.

**Намалена зависимост от вносни изкопаеми горива.** Изкопаемите горива са ограничен ресурс, концентриран в няколко географски зони на планетата. За страните извън тези зони, това създава постоянен и несигурен статус на зависимост от вноса на горива. Повечето европейски страни са силно зависими от внос на изкопаеми горива, главно от региони, богати на залежи като Русия и Средния изток. Развиването и внедряването на възобновяеми енергийни системи като биогаз от АР, базирани на

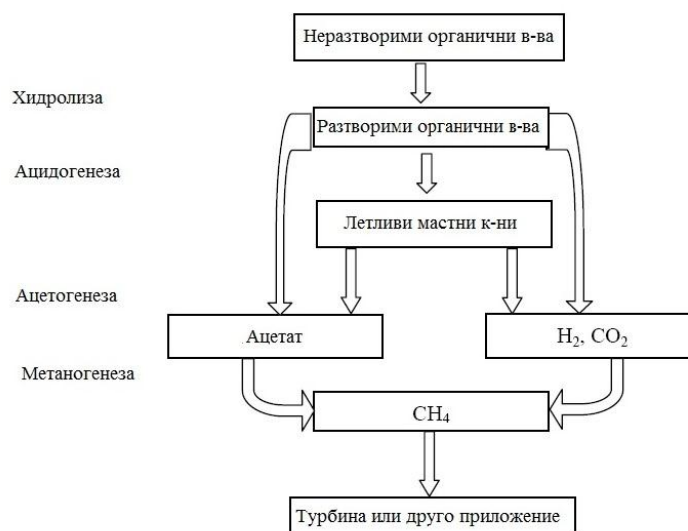
национални или регионални ресурси от биомаса, ще увеличи сигурността от националните енергийни доставки и ще намали зависимостта от вносни горива.

**Намаляване на отпадъците.** Едно от главните предимства при производството на биогаз е възможността отпадъчен материал да се трансформира в ценен ресурс, който играе ролята на субстрат при анаеробното разграждане. Много европейски страни срещат огромни проблеми, свързани със свръхпродукцията на органичен отпадък от индустрията, земеделието и домакинствата. Производството на биогаз е отличен начин да се спазят изключително рестриктивните национални и европейски регулации, а също и да се използва органичен отпадък за производство на енергия, следвано от рециклиране на разградения субстрат като тор. Анаеробното разграждане може да допринесе за намаляване на обема на отпадъците и цената за тяхното изхвърляне.

**Принцип на метаногенезата.** Процесът на разграждане протича в четири основни етапа и започва с хидролиза на неразтворимите органични съединения, като по този начин те стават усвояеми за други микроорганизми [99,105,106], вж. Фиг. 5.

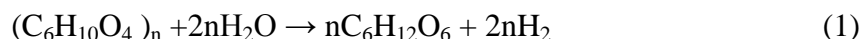
Метаболитният път за превръщането на високо-молекулните субстрати в метан е бил обект на много микробиологични и биохимични изследвания, в това число и с белязан въглерод. Тези изследвания са обобщени в обзора на Conrad [107].

При хидролизата сложните органични съединения се разграждат до техните градивни елементи. Протеините се разграждат до аминокиселини; мазнините – до мастни киселини; сложните въглехидрати – до прости захари.



Фиг.5. Основни етапи на метаногенезата [99].

Хидролизата се катализира от ензими като целулаза, протеаза, амилаза, липаза. Емпиричното уравнение, описващо процеса на хидролиза на полизахаридите е:

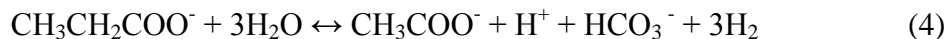


Във втория етап ацидогенните бактерии превръщат продуктите на хидролизата в прости органични съединения, най-вече късоверижни мастни киселини (пропионова, млечна и др.), кетони и алкохоли.

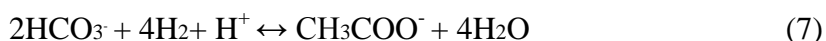
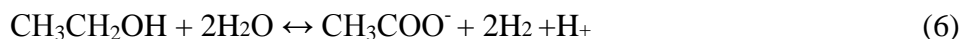
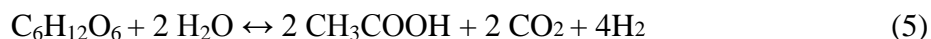
По долу са показани реакциите описващи процеса. Във второто уравнение, глюкозата се превръща в етанол, а в третото уравнение глюкозата се трансформира в пропионат:



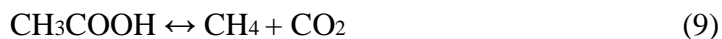
Следващият етап е ацетогенезата. Продуктите от ацидогенезата, които не могат да бъдат директно превърнати в метан от метаногенните бактерии, се превръщат в метаногенни субстрати по време на ацетогенезата. При него ацетогенните бактерии превръщат получените органични киселини в оцетна киселина. В резултат се получава смес от ацетат,  $CO_2$  и  $H_2$ . Ролята на водорода е важна за анаеробното разграждане и добива на биогаз, както се вижда от фиг. 5. Дълговерижните мастни киселини получени от хидролизата на липидите, се хидролизират до ацетат и пропионат, като в това време се получава и водород (като газ). Уравнението, показващо превръщането на пропионата в ацетат е:



Други паралелно протичащи реакции с образуване на ацетат са следните:



В четвъртия етап метаногените превръщат пропионовата и оцетната киселина в  $CH_4$  и  $CO_2$ :



Съществува и друг път за получаване на метан чрез редуцията на въглероден диоксид с водород, образувани при разлагането на мравчената киселина, вж. фиг. 2,3 и 4:



Когато за субстрат се използва глицерол, сумарното балансово уравнение е следното:



Метаногените са много чувствителни по отношение на промените на киселинността на средата и са жизнени в неутрална и слабо-алкална среда [108].

Интензифицирането на ацидогенезата е желано заради по-ефективното преработване на субстрата, но води до инхибиране на метаногенезата поради спадане на рН. Освен това метаногенезата е скоростно-определящ стадий в цялата последователна схема (5-11), [109]. Този факт е много важен от гледна точка гладкото протичане на цялостния процес, тъй като бавното разграждане на оцетната и пропионовата киселина, съчетано с бързото им натрупване ще води до спадане на рН под допустимия минимум и загиване на метаногенните бактерии. Освен това е установено, че пропионовата киселина и нейните аниони са инхибитор на метаногенезата. Това е в особена степен важно, когато всички стадии на метаногенезата протичат в един реактор по едно и също време. Тогава процесите протичат едновременно и синергично, като всеки етап определя протичането на следващия.

Разсъжденията относно подкиселяването на средата и спирането на метаногенезата важат в особена степен, когато се използва ниско-молекулен субстрат (какъвто е глицеролът), защото той много бързо се разгражда до органични киселини (пропионова, млечна, оцетна и пр.). Поради тази причина не е възможно да се работи при високи натоварвания по глицерол, защото рН на средата спада много бързо и метаногенезата спира. В резултат на това отделяният газ е богат на въглероден диоксид и не гори.

Ограниченията по киселинността на средата поставят системата в твърде деликатно състояние по отношение оптималните условия за протичане на отделните етапи. Например, хидролизата и ацидогенезата изискват кисела среда, докато метаногенезата – неутрална или слабо-алкална [110]. Известни са опити за повишаването на ефективността на метаногенезата чрез повишаване концентрацията на микробни клетки в биореактора чрез имобилизация [111, 112].

Една възможност за избягване на нежеланото понижаване на рН е неутрализацията с алкални агенти. Това обаче води до значително покачване на рН след

декарбоксилирането на органичните киселини и загиването на метаногенните бактерии. За избягване на този нежелан ефект се препоръчва неутрилизацията с амоняк, който е и източник на азот, подпомагащ растежа на бактериите. Амонякът обаче е и скъп консуматив, който оскъпява и усложнява анаеробната ферментация.

Друга възможност е отстраняването на анионите на излишните органични киселини чрез извличането им върху анион-обменна смола или с органични разтворители [113-116], както и чрез обратна осмоза или ултрафилтрация [117]. Но и в този случай натрупването на хидроксилни аниони в средата може да доведе до нежелано алкализиране след декарбоксилирането на органичните киселини.

По – мек и по – ефективен начин, макар и частичен, за преодоляване на ефекта на силно подкисляване при получаването на биогаз е пространственото разделяне на зоните на инхибиране (поради ниски рН) от зоните на метанизация. За тази цел може да се използва каскаден биореактор, разделен на отделения (камери) чрез прегради и непрекъснато или полу-непрекъснато захранване). Известно е, че този тип апарати са устойчиви спрямо смущения в захранването, изменения на рН, на температурата и пр. [118].

Основното предимство на този тип каскаден реактор в разглеждания случай е разпределянето на различните последователни процеси (хидролиза, ацидогенеза, ацетогенеза, метанизация) в различни отделения на реактора. Поради проточното му захранване продуктите от един междинен процес постъпват в следващото отделение (камера) като субстрати за следващия процес. Благодарение на тази организация на захранване и работа на реактора, в различните камери се култивират различни микроорганизми, специализирани да преработват различни междинни продукти на общата метаногенеза. В България са направени успешни опити по прилагането на този тип реактор при третирането на спиртна шлемпа с добив на биогаз [119, 120].

Когато субстратът е глицерол, достатъчни за подготовката на субстрата за метаногенеза са бактерии от един род, например *Klebsiella* или *Clostridium*. От схемите, показани на Фиг. 2 и 3 се вижда, че субстратът се довежда до аниони на органични киселини, две от които (мравчена и оцетна) са субстрати за добива на метан. Всички останали метаболитни процеси водят до конкурентни процеси – получаването на сукцинати, лактати, на 1,3-пропандиол, 2,3-бутандиол, янтарна и млечна киселина, както и



на малки количества етанол. Въз основа на тази метаболитна схема се вижда, че възможностите за получаването на биогаз (т.е. смес от метан и въглероден диоксид) са две: чрез декарбоксилирането на ацетатите до еквимоларна смес от метан и въглероден диоксид [64] или чрез редукция на въглеродния диоксид с водород [65] и двете получени при разлагането на формиати (соли на мравчената киселина). Тъй като съдържанието на метан в биогаза почти винаги е над 50% об. става ясно, че вторият процес е винаги застъпен.

Остава открит въпросът, каква част от глицеролът се превръща в целеви химически продукти и каква част – в биогаз. В литературата съществуват редица изследвания, в които се съобщава за различни видове метаногени, в които се извършват тези два типа процеси. Например, декарбоксилирането на ацетати се извършва от микроорганизмите от рода *Methanosarcina* [121-124], докато редукцията на въглероден диоксид с водород в резултат на разпадането на формиати – от родовете *Methanobacterium* и *Methanobrevibacter* (Fuchs *et al.* [122]; Games *et al.* [126]; Belyaev *et al.* [127]; Valabane *et al.* [128]).

С други думи, глицеролът може да служи както за добиването на биогаз, така и за получаването на ценни продукти, традиционно добивани от нефта. Дозирането на глицерол в първото отделение на каскадния биореактор може да доведе до предимно получаване на даден продукт от схемата на фиг. 2 или до получаването на биогаз.

От друга страна съдържанието на метан в биогаза зависи от конкуренцията на процесите, посочени в схемите, показани във Фиг. 2 и 3. В случай, че преобладава редукцията на въглеродния диоксид с водород, съдържанието на метана в биогаза може да достигне 95%, колкото е в природния газ. Затова от практическа гледна точка е важно кинетичното изследване на метаболитните процеси при превръщането на глицерола в продукти с добавена стойност и на биогаз с високо съдържание на метан. Отговорът на този въпрос трябва да се търси в кинетичното изследване на анаеробното превръщане на глицерола в различни продукти на метаболизма, в това число и в биогаз.

За тази цел е полезно съставянето на математични модели, основани на подходяща метаболитна схема и с тяхна помощ оценяването на кинетичните константи в модела и уточняването на скоросто-определящите фази и значението на междинните продукти като инхибитори. Така става възможно подбирането на условията за желани целеви процеси и избягването на нежелани.

Математичното моделиране на метановата ферментация досега е било основано на процесите, използващи сложни субстрати от селско-стопански произход [129-133]. Всички те засягат добре известната традиционна схема на последователни хидролиза, ацидогенеза, ацетогенеза и метанизация. Доколкото ни е известно, няма опити за математично описание на добива на метан и продукти на метаболизма при глицерол като субстрат.

С настоящата дисертационна работа се прави опит да се изследва възможността за метаногенеза, съчетана с получаването на други целеви продукти от субстрат глицерол, отпадащ от производството на биодизел. Избран е каскаден биореактор с разделени процеси, контрол на рН и извличане на органични киселини с йонообменна смола, когато е необходимо.

## **2.4. Изводи от литературния обзор**

В резултат на представените факти от новата научна литература може да се направят следните изводи.

1. Оползотворяването на възобновяеми суровини като енергия под формата на биодизел се затруднява поради ограниченото потребление на отпадъчния глицерол.
2. Оползотворяването на глицерола може да стане по два основни пътя: като органични продукти и като биогаз. Втората възможност се ограничава от силното подкиселяване на средата и подтискане активността на метаногенните бактерии.
3. Трябва да се търси съчетаване на двата процеса – получаване на ценни органични продукти и биогаз. Последният може да се използва за енергийно обезпечаване на получаването на целевите продукти.

### **3. ЦЕЛ**

Да се изследва възможността за оползотворяване на отпадъчния глицерол до получаване на биогаз в каскаден биореактор.

### **4. ЗАДАЧИ**

1. Да се направи опит за интензифициране на процеса и избягването на инхибиране от междинните продукти на процеса (органични киселини) чрез неутрализация и извличане от ферментационната среда.
2. Да се изследва възможността за получаване на ценни химически продукти от глицерола успоредно на анаеробното му превръщане в биогаз. За тази цел да бъдат проведени изследвания при различно натоварване на ферментатора с глицерол, като се следи за измененията в киселинността на средата и поддържане на подходящи стойности на рН. Изследванията да бъдат проведени в апарат с каскадна конфигурация, позволяващ едновременното протичане на отделните групи процеси на анаеробната метанова ферментация в различни места от пространството на биореактора.
3. Да се състави математичен модел на превръщането на глицерол в биогаз и други продукти на метаболизма. математичното моделиране, съчетано с опитни данни ще даде информация за кинетиката на последователните процеси в метаболитната схема. С негова помощ да се определят кинетичните константи на междините и конкурентните реакции и да се определят условията за получаване на биогаз или на целеви химически продукти. Резултатите от изследването, ще улеснят оразмеряването на отделните камери и определяне броя на камерите в каскаден реактор, съобразено със скоростта на отделните процеси.

## 5. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

### 5.1. Материали и методи

**Материали.** Като суровина беше използван отпадъчен глицерин, получен от промишлено предприятие за производство на биодизел, съдържащ около 80% глицерол и вода, метанол и калиева основа като остатък. Като посевен материал за ферментатора беше използвана активна тиня, взета от софийската пречиствателна станция за отпадъчни води, с. Кубратово.

Корекцията на рН се извършваше с 1 N NaOH, с квалификация “техническа”.

**Методи и апаратура.** Експериментите бяха извършени на пилотна инсталация, представена на фиг. 6. Биореакторът представлява басейн с обем 270 литра (1500 x 300 x 600 мм) с правоъгълна форма, разделен на 8 секции, през които разтворът на субстрата последователно преминава, след като постъпва в камера 1 и напуска басейна от камера 8. Апаратът е топлинно изолиран, а поддържането на необходимата температура (около 30 °С) става чрез серпентина на дъното на апарата, през която тече топла вода, подавана от термостат. Газовото пространство в реактора над течността е свързано с газ-холдер и с комин за вентилация при необходимост.

Голямо предимство на апарата е, че в него протичат едновременно хидролизата, ацидогенезата, ацетогенезата и метаногенезата в различни негови участъци. Така като цяло се създава апарат, работещ в режим, близък до идеалното изместване с микробен профил, следващ отделните етапи на метаногенезата: хидролиза на полимерните субстрати, ацидогенеза на продуктите – получаване на оцетна, пропионова и др. летливи мастни киселини. Продуктите от ацидогенезата, които не могат да бъдат директно трансформирани в метан от метаногенните бактерии, се превръщат в метаногенни субстрати по време на ацетогенезата. Летливите мастни киселини и алкохолите се окисляват до метаногенни субстрати като ацетат, водород и въглероден диоксид. Летливи мастни киселини с въглеродна верига по – дълга от две единици и алкохоли, с вериги по – дълги с една единица, се окисляват до ацетат и водород. Получаването на водород покачва парциалното налягане. Това може да се определи като „отпадъчен продукт“ на ацетогенезата и инхибира метаболизма на ацетогенните бактерии. По време на метаногенезата, водородът се превръща в метан. Ацетогенезата и метаногенезата обикновено се провеждат паралелно, като симбиоза между две групи микроорганизми. И

накрая – метаногенеза чрез декарбоксилиране на летливите мастни киселини. Смесването на микробните култури в отделните секции е ограничено с количествата течна среда, преминаваща от секция в секция. Тези обстоятелства правят апарата особено стабилен спрямо смущения в състава на хранящата суспензия, нейния дебит и пр. Разбира се, не може да се очаква, че тези четири фази на добиването на биогаз ще са ясно обособени в отделните камери. Тези четири различни процеса протичат *предимно* в различните зони на апарата, като в крайните камери хидролизата практически отсъства.

Схема на работата на инсталацията е показана на фиг. 7.

**Натоварване: от 126 до 1000 g глицерол /денонощие.** За храняване се използваше отпадъчен глицерин, смесен с определено количество отпадни води от изхода на реактора по следната схема в продължение на 30 дни. Бяха изследвани дневни дебита на подаване на глицерол от 0.1 до 0.8 литра/денонощие. За храняване се използваше отпадъчен глицерин, смесен с определено количество отпадъчни води. Първоначално хранянето е 100 ml глицерин в 10 L отпадни води. Следва повишаване на дневното количество (200 ml в 20 L), като хранянето става 2 пъти на денонощие. На следващия ден режимът на храняване е 3 пъти в денонощие, на всеки 8 часа в дневно количество 300 ml в 30 L отпадни води, трикратно в денонощие. В края на изследванията направихме опити при дневно количество 400 ml в 20 L отпадни води, както и при 800 ml глицерин в 10 L отпадни води (двукратно в денонощие).

Първоначално: 126 g глицерин в 10 L отпадни води(12.6 g/dm<sup>3</sup>), еднократно в денонощие.

След 24 часа - повишаване на дневното количество (252 g глицерин ) при същата концентрация, хранянето става 2 пъти на денонощие. След 24 часа - повишаване на дневното количество (378 g глицерин ) при същата концентрация, хранянето става 3 пъти на денонощие. След 24 часа - повишаване на дневното количество (757 g глицерин ) при концентрация 25.2 g/dm<sup>3</sup>. След 48 часа - намаляване на дневното количество (504 g глицерин ) при концентрация 25.2 g/dm<sup>3</sup>. След 72 часа – храняване с 757 g глицерин при концентрация 25.2 g/dm<sup>3</sup>, хранянето става 3 пъти на денонощие. След 48 часа - храняване с 504 g глицерин/ден при концентрация 25.2 g/dm<sup>3</sup>, хранянето става 2-3 пъти на денонощие (в продължение на 10 дни). След 240 часа - храняване с 504 g глицерин/ден при концентрация 50.4 g/dm<sup>3</sup>, хранянето става 2 пъти на денонощие (в

продължение на 10 дни). След 240 часа - захранване с 1000 g глицерин/ден при концентрация 100 g/dm<sup>3</sup>, захранването става 2 пъти на денонощие (в продължение на 2 дни).

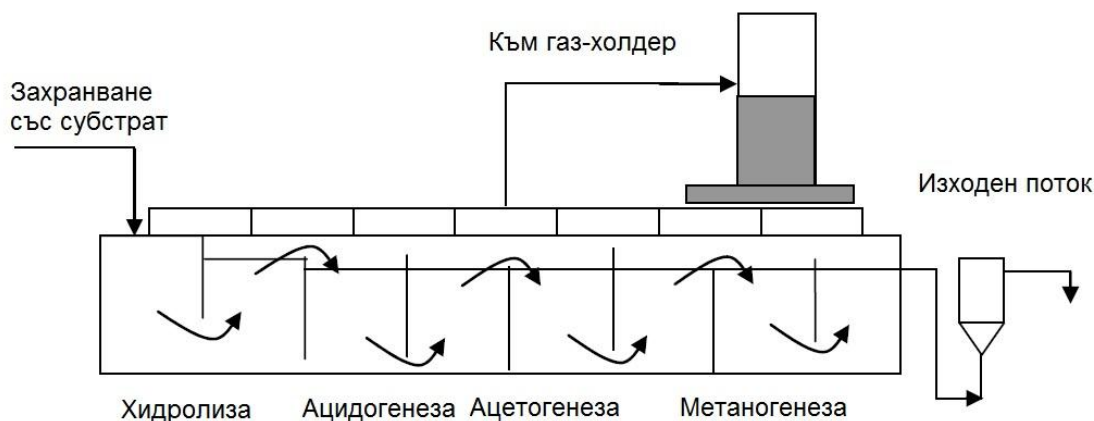
Субстратът се смесва с част от отпадната вода от биореактора в различни обемни съотношения и се подава периодично в биореактора в различно количество и с различна честота, спазвайки полу-непрекъснат режим. Отпадъчната вода на изход от реактора подлежи на допълнителна обработка, в случай, че остатъчната стойност на ХПК превишава нормата от 250 mg/l.



Фиг. 6. Общ вид на пилотната инсталация.

Отделяният газ се събира общо от пространството над течността и се подава в газо-сборния звънец (газ-холдер), където се съхранява над вода. Оттам при необходимост, той се пропуска през слой от разтвор на абсорбент (меден сулфат, ферисулфат) за отстраняването на серните съединения – сероводород и меркаптани.

Периодично бяха измервани отделяните обеми биогаз и газът беше изпробван за горимост. На базата на тези измервания беше изчисляван добива на биогаз като цяло и като скорост на продуциране.



Фиг. 7. Схема на инсталацията. [Т2]

След влизане на реактора в работен режим, се задава определена схема на захранване. Целта е да се провери, при какъв режим на захранване какви резултати ще се получат по отношение на дебита и горимостта на газа и до каква степен може да бъде натоварена микробната популация, без това да доведе до инхибиране и спиране на метаногенезата.

Преди захранването се снемаше рН-профила по секции, като се взимаха проби от всяка секция. Следваше захранване с определено количество субстрат в секции 1 или 3. Количеството на получения биогаз, както и горимостта му се определяха след събирането му в газо-сборника над вода. След това събраното и измерено количество се изгаряше в Бунзенова горелка или неговата горимост се определяше по експресен метод. Ако се отчетеше претоварване на реактора и спадане на рН в метаногенните секции (секции от 5 до 8) рН се коригираше и се намаляваше честотата на захранване. Постигането на постоянно рН в секциите говори за установяването на стационарен и оптимален режим на работа на реактора.

Периодично беше снеман рН-профила по дължината на апарата във всяка секция. При необходимост рН се коригираше с 1 N NaOH в секциите, в които стойността му беше под допустимата. Периодично се взимаха проби от всяка секция на апарата, които се подлагаха на количествен анализ с високо-ефективна течна хроматография (ВЕТХ).

За основен инхибитор на метановата ферментация се смята пропионовата киселина. Нейното извличане от ферментационната среда е от важно значение, тъй като тя представлява ценен продукт, а в същото време е и основната причина за понижаването на



pH, в резултат на което се получава неблагоприятна за микроорганизмите среда. Това може да стане по различни методи, като в конкретния случай е използвана йонообменна смола (анионитът IONAC SF7, Bayer). Чрез нея е възможно пропионовата киселина да се отстрани от реактора, да се пречисти и получи като готов продукт. За целта се използва йонообменна колона, свързана с перисталтична помпа, с чиято помощ се всмуква течност от определена секция от реактора. Преминавайки през колоната пропионовата киселина се задържа от смолата, а останалата течност (с по – високо pH ) се връща в реактора. Резултатът от това, е че не само се извлича пропионовата киселина, но се постига и едновременно корекция на pH на средата.

След насищане на анионита регенерацията ставаше чрез 1 N NaOH, а регенератът се анализираше за органични киселини с високо-ефективна течна хроматография.

Капацитетът на йонообменната смола бе определен по отношение на пропионовата киселина, като еднакви количества от смолата бяха третираны в продължение на 24 часа с разтвори на пропионова киселина с различни концентрации в условия на разбъркване на клатачна машина с 100 об/мин при 30 °C. Капацитетът беше определян по остатъчните количества в разтворите.

## **5.2. Анализи**

Анализът на състава на газа се извършваше с помощта на обемен газов анализ, като съдържанието на метан в него се определяше по обема на газа след поглъщане на въглеродния диоксид с 0,1 N калиева основа.

Предварително газовите проби се пропускаха през разтвор на меден сулфат за отстраняването на сероводорода и меркаптаните в газа.

Отделни газови проби бяха анализирани с помощта на газова хроматография (извършени в Института по катализ, БАН).

Анализите на течните проби се извършваха на HPLC-система Perkin Elmer Series 10, снабдена с колона Bio-Rad Aminex HPLC-87H за органични киселини. Киселините се определяха с Knauer UV- детектор при дължина на вълната 210 nm, докато анализът на алкохолите се извършваше с рефрактометричен детектор. Като подвижна фаза се използваше 0.01 N сярна киселина при дебит на елуиране 0.6 l/min при температура 65 °C. Междинните съединения се идентифицираха по времената на задържане, сравнени с добавени стандарти и се определяха количествено след съответна калибровка.

Концентрациите на продуктите на ферментацията се изчисляваха от площите на пиковете на хроматограмите въз основа на калибрационни линии. Преди хроматографските анализи пробите се филтруваха, за да се отстранят замърсяванията и клетките, които биха могли да повредят хроматографската колона.

Стойностите на рН в пробите се определяха с помощта на рН-метър (Radelkis, унгарско производство).

### **5.3. Охарактеризиране на микроорганизмите**

Охарактеризирането на микроорганизмите във всяка секция на ферментатора беше извършено в секция “Микробна генетика” на Института по микробиология при БАН<sup>1</sup>.

В нашето изследване бяха взети проби от отделните камери на биореактора, в които протичат отделните стадии на метановата ферментация и бе изследвано съдържанието на микроорганизми от различен физиологичен тип в тях, т.е. бяха изолирани както анаеробните, така и аеробните развиващи се при подхранване на биореактора с отпадъчен глицерол.

Бяха използвани следните среди за култивиране.

#### ***Среди за аеробни бактерии:***

- 1) Месо-пептонен агар
- 2) Kligler iron agar
- 3) Chrome coliforme agar

#### ***Среди за анаеробни бактерии:***

- 1) Тио-гликолатна среда (с резазурин), селективна за анаероби.
- 2) АТСС – среда за метаногени
- 3) 20% дрождев екстракт - Trypticase Solution
- 4) 20% натриев формиат
- 5) 25% натриев ацетат Sodium acetate
- 6) 0.2% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O
- 7) 0.1% ресазурин
- 8) натриев бикарбонат.

---

<sup>1</sup> Авторът изказва сърдечна благодарност на доц. д-р Пенка Петрова за оказаната помощ.

## 6. МАТЕМАТИЧНО МОДЕЛИРАНЕ (Т1)

Като основа на математичното моделиране е използван метаболитния път, показан на фиг. 2. Приемаме, че някои от междинните процеси са бързи и затова не са скорост-определящи. Като крайни продукти се приемат биомасата, биогаз, 2,3-бутандиол и включително ацетати и формиати. Получаването на тези продукти става по конкурентни пътища. Натрупването на киселини води до понижаване на рН, което води до инхибиране на метаболитните пътища, най-вече метаногенезата.

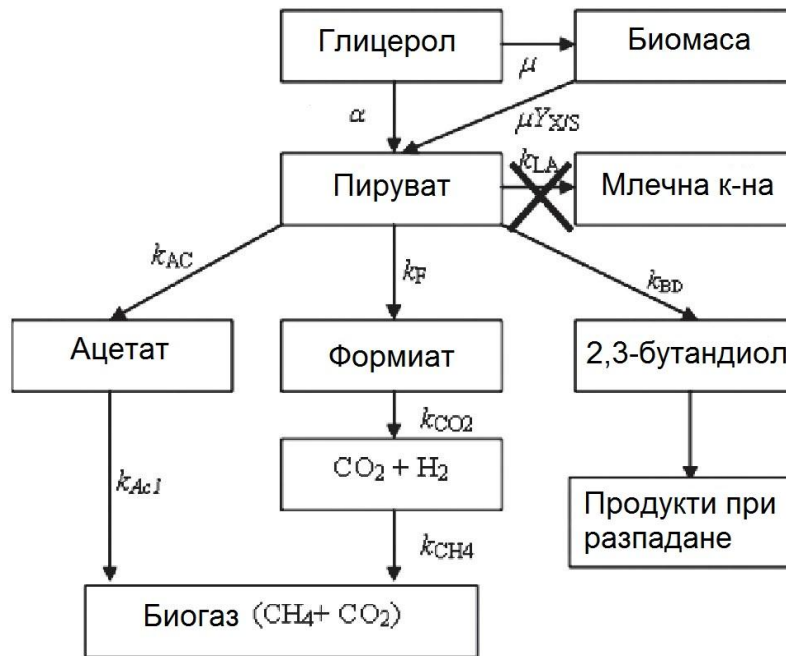
За целта на кинетичното изследване е съставен не-структуриран модел, представляващ система от обикновени нелинейни диференциални уравнения със съответните начални условия:

$$\begin{aligned}
 \frac{dX}{dt} &= \mu X - K_x X, \quad \mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_m}, \quad t = 0, \quad X = X_0 \\
 \frac{dS}{dt} &= -\mu Y_{XS} S - ab_S X.S, \quad t = 0, \quad S = S_0 \\
 \frac{dPv}{dt} &= ab_S X.S - (k_{BD} b_{BD} + k_{Ac} b_{Ac} + k_F b_F) XPv, \quad t = 0, \quad Pv = Pv_0 \\
 \frac{dF}{dt} &= k_F b_F X.Pv - k_{CO2} X.Fb_{CO2}, \quad t = 0, \quad I = 0 \\
 \frac{dBD}{dt} &= k_{bd} b_{bd} XPv - k_{bd1} b_{bd1} BD, \quad t = 0, \quad BD = 0 \\
 \frac{dAc}{dt} &= k_{ac} b_{ac} XPv - k_{Ac1} b_{Ac1} Ac, \quad t = 0, \quad Ac = 0 \\
 \frac{dCH4}{dt} &= k_{Ac1} b_{Ac1} Ac + k_{CH4} b_{CH4} X., \quad t = 0, \quad CH4 = 0 \\
 \frac{dCO2}{dt} &= k_{Ac1} Ac + k_{CO2} X.Fb_{CO2} - k_{CH4} b_{CH4} X, \quad t = 0, \quad CO2 = 0 \\
 b_i &= \exp(-(pH - pH_i)^2 / (2\sigma^2))
 \end{aligned}
 \tag{12}$$

Системата (12) се основава на опростяване на метаболитната схема за превръщане на глицерола от бактериите *Klebsiella* (фиг. 2). Опростената схема е показана на фиг. 8. На нея са означени коефициентите в системата (12). Използваните означения са показани в Приложение А в края на дисертацията.

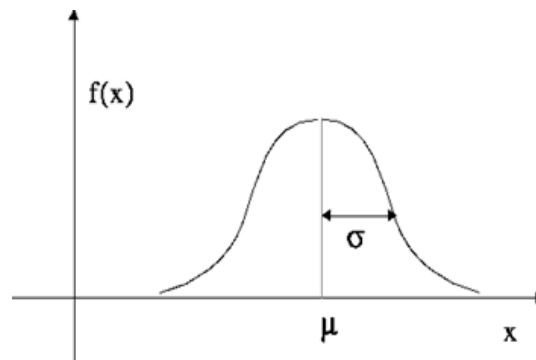
При опростяването са слети някои междини процеси и техните продукти и са взети само начални и крайни състояния в схемата на фиг. 2. Тъй като във ферментационната

среда не бяха открити млечна киселина и 1,3-пропандиол, тези реакции бяха изключени от метаболитната схема и математичния модел (фиг. 8).



Фиг. 8. Опростена метаболитна схема, основа на математичния модел (12). [Т1]

Навсякъде скоростните константи  $k_i$  са умножени по факторите  $b_i$ . С  $b_i$  означаваме относителната активност на  $i$ -тия ензим от рН, като с  $pH_i$  е означена оптималната стойност за активността на конкретния ензим. Зависимостта на ензимната активност от рН е апроксимирана с Гаусова разпределителна крива (фиг. 9), като полу-ширината на кривата  $\sigma^2$  показва чувствителността на ензима по отношение на рН. Оптималните стойности за интересуващите ни ензими са взети от литературата и са показани в Таблица 3.



Фиг. 9. Нормално вероятностно разпределение по Гаус.

Таблица 3. Подбрани рН-оптимуми за различните междинни реакции в модела (12).

Ензим/реакция	рН-оптимум	Литература
Глицерол до пируват, $b_S$	6.6	[78]
Пируват-декарбоксилаза, $b_{Ac}$	5.6	[79]
Пируват до водород и $CO_2$ , за $b_F$	6.8	[79]
Формиат до водород и $CO_2$ , $b_{CO_2}$	6.1	[79]
Ацетат до метан, $b_{AcI}$	7.5	[54]
Водород и $CO_2$ до метан, $b_{CH_4}$	7.5	[78]
2,3-бутандиол от пируват, $b_{BD}$	7.0	[80]
Биодеградация на 2,3- бутандиол, $b_{BD1}$	7.0	Постулирано

Всички определящи ензимни реакции освен декарбоксилирането на пирувата изискват практически неутрална среда. Наясно сме, че тези стойности може да не са верни заради различните микроорганизми за които те са установени, но за демонстративните цели, които сме си поставили това е достатъчно [134,135,136].

Решаването на системата (12) се отнася за каскаден биореактор с осем отделения. Системата уравнения трябва да бъде решавана за всяко отделение поотделно. Тъй като концентрациите на субстрата и на получаваните продукти бяха забележимо измерими в първите две отделения, ние се ограничихме с изчисления само за тях.

Сумарните стойности на рН в двете изследвани отделения на реактора бяха изчислявани от концентрациите на органичните киселини и техните дисоциационни константи, взети от литературата [136, 137].

Системата (12) беше решавана с помощта на динамичен симулатор 20-sim.3.4 (холандски софтуер), съчетан с оптимизационна програма за определяне на кинетичните параметри от опитни данни по градиентния метод Broydon–Fletcher–Goldfarb–Shanno [138]. Като целева функция беше избрана сумата от квадратите на разликите между опитните и изчислените стойности за глицерола, рН, 2,3-бутандиола и оцетната киселина:

$$Y = \sum_i (S_i - S_{\text{exp},i})^2 + \sum_i (pH_i - pH_{\text{exp},i})^2 + \sum_i (BD_i - BD_{\text{exp},i})^2 + \sum_i (Ac_i - Ac_{\text{exp},i})^2 \quad (13)$$

Броят на кинетичните параметри е 12. След предварителни числени експерименти бе установено, че решенията не са чувствителни спрямо шест от тях ( $\alpha$ ,  $K_X$ ,  $K_m$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $k_{CO_2}$  и

$k_{CH_4}$ ) и затова те може да се приемат за константи. Затова при математичната обработка на опитните данни трябва да се определят останалите шест параметъра ( $\mu_{max}$ ,  $k_F$ ,  $k_{BD}$ ,  $k_{BD1}$ ,  $k_{Ac}$ ,  $k_{Ac1}$ ). Имайки предвид сложността на задачата и недостига на кинетични данни за този случай, ние приехме получаваните стойности за качествена оценка за адекватността на модела поради постоянството на оценените параметри при различните опити.

Ефектът на ензимната чувствителност бе определян, променяйки полу-ширината  $\sigma^2$  на Гаусовата крива. Бяха подбрани две различни стойности на  $\sigma^2$ . Поради липса на опитни данни за началните концентрации на пирувата ( $Pv_0$ ) те също бяха варирани при числените експерименти.

## 7. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

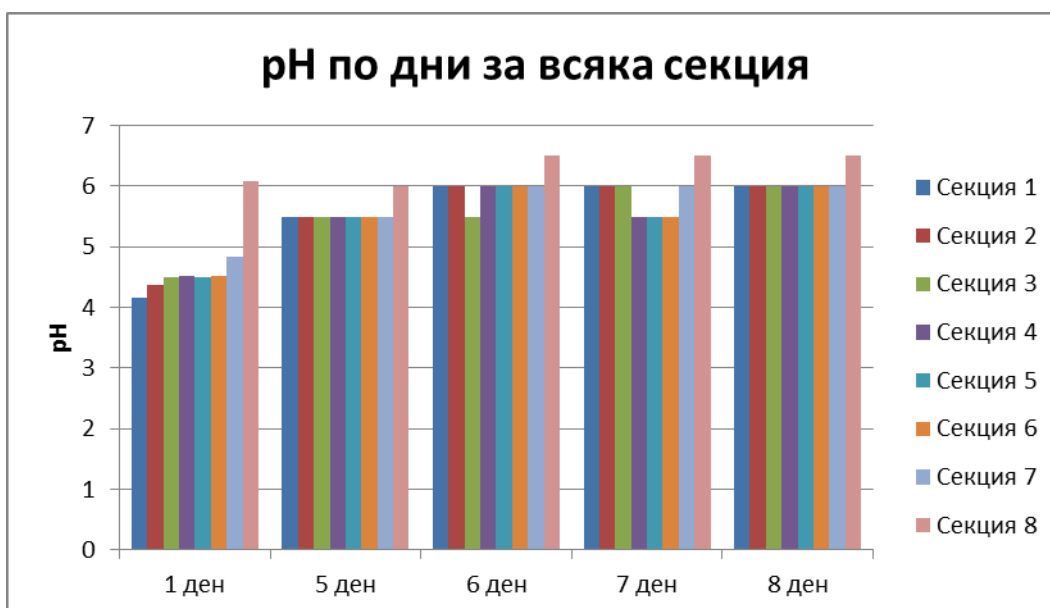
### 7.1 Опити в 8-стъпален биореактор с корекция на рН (Т3-Т5)

Отначало инсталацията се пуска да събира газ, като се измерва количеството му. За целта се използва газ – сборник с хидрозатвор. Преди пускането изходът към комина се затваря, за да не се разрежда биогаза. С помощта на помпа от газ-холдера се изпомпва проба от събраното количество биогаз, която се проверява за горимост и се измерва добива му.

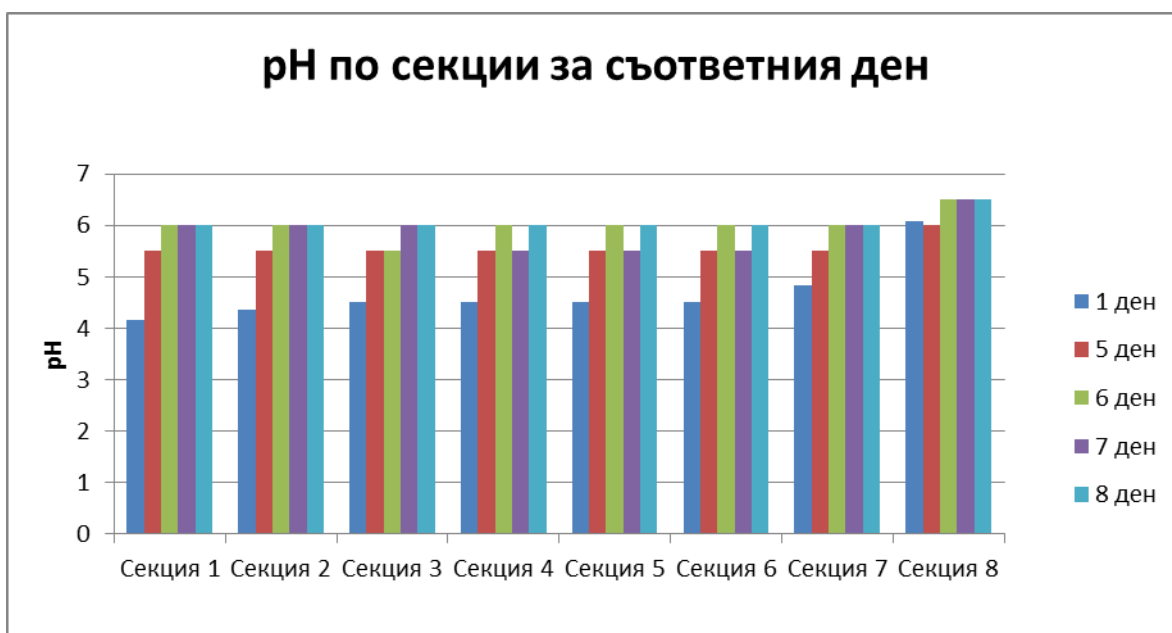
Таблица 4 и Фиг. 10. по долу представят данни за осем дни, отнасящи се до измереното за съответния ден рН.

Таблица 4. рН-профил в биореактора по секции преди и след корекция с натриева основа.

Секция	1	2	3	4	5	6	7	8	дата
рН	4.17	4.37	4.5	4.51	4.5	4.51	4.83	6.08	Ден 1
рН	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	6	Ден 5
рН	6	6	5.5	6	6	6	6	6.5	Ден 6
рН	6	6	6	5.5	5.5	5.5	6	6.5	Ден 7
рН	6	6	6	6	6	6	6	6.5	Ден 8



Фиг. 10. pH – по дни за всяка секция



Фиг.11. pH по секции за съответния ден

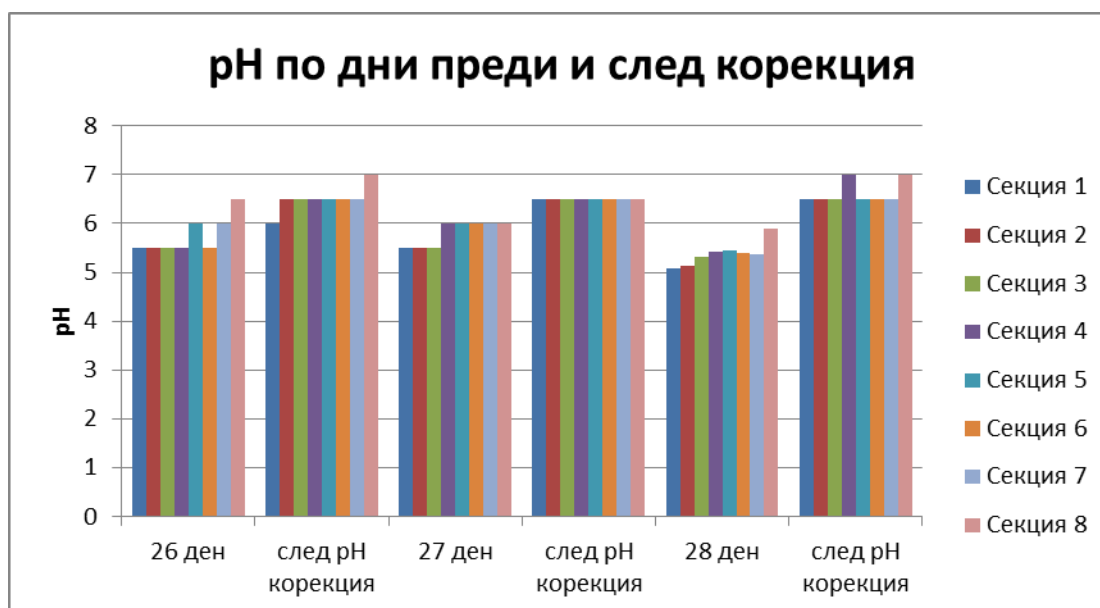
В началото на процеса pH е ниско във всички секции, което налага корекция. За целта се използва 1 N NaOH. Основата се добавя на порции към всяка отделна клетка, докато се постигне желаната стойност за pH. Тъй като реакторът се намира в начален етап на процеса, необходимо е известно време за да влезе в работен режим. Това е времето в което

бактериите при създадените условия ще се развият и ще започнат съответните метаболитни процеси. Измереното рН на ден 6 е в рамките на допустимото, следва захранване с разтвор от 1 L с 10 ml глицерин (10 ml/L). На ден 7 се получава газ, но той не гори. Вероятна причина е все още не добре развитите се популации от бактерии, предимно метаногени, в резултат на което полученият биогаз е с голямо съдържание на CO<sub>2</sub>. За да гори биогазът е необходимо съдържанието на метан да бъде над 50%. Колкото този процент е по – голям, толкова по – качествено ще бъде и горенето на биогаза.

В Таблица 5 са представени резултати за рН-профила по секции преди и след корекция на рН.

Таблица 5.

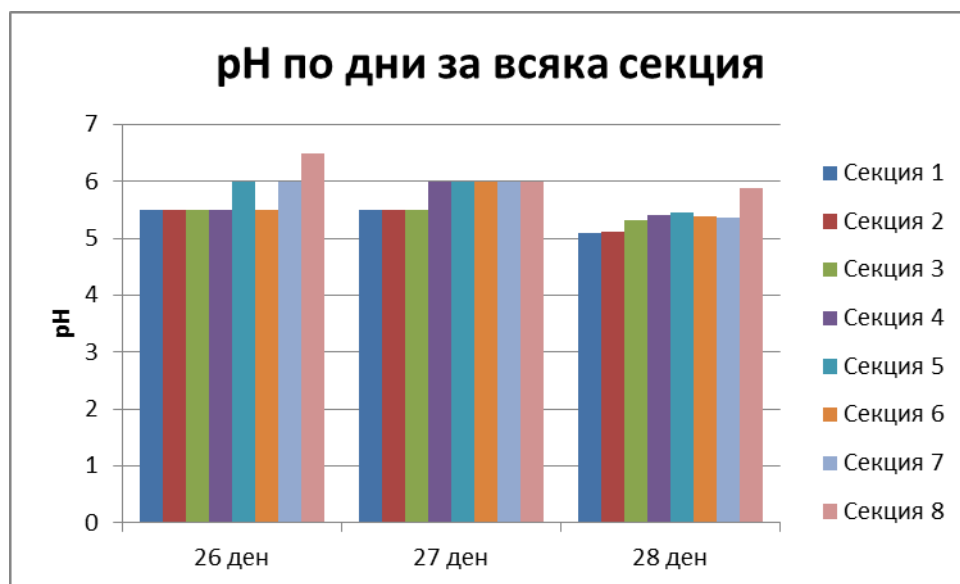
Дата	Секция	1	2	3	4	5	6	7	8	Газът:
Ден 26	преди	5.5	5.5	5.5	5.5	6	5.5	6	6.5	гори
	след	6	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	7	
Ден 27	преди	5.5	5.5	5.5	6	6	6	6	6	гори
	след	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	
Ден 28	преди	5.09	5.13	5.32	5.41	5.45	5.4	5.37	5.89	гори
	след	6.5	6.5	6.5	7	6.5	6.5	6.5	7	



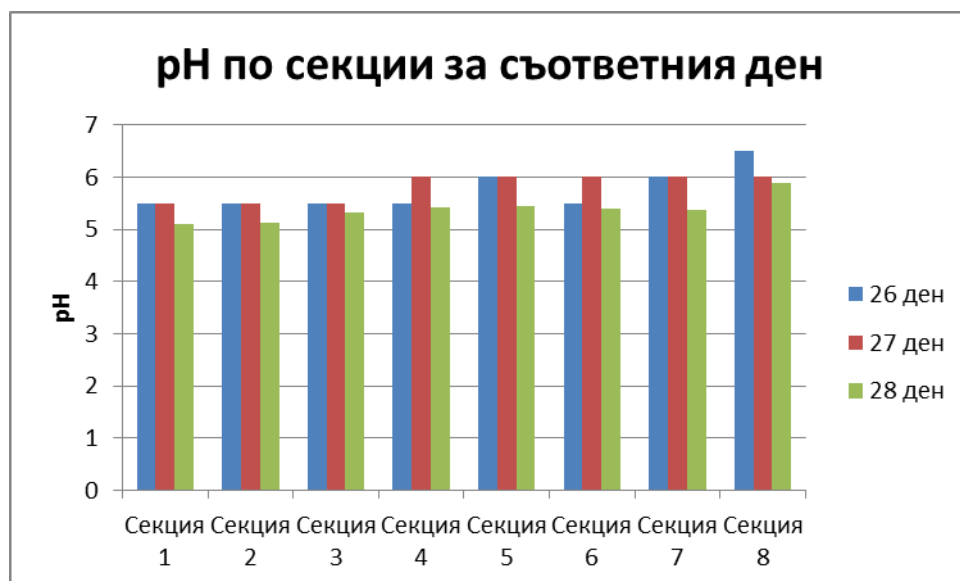
Фиг.12. рН по дни преди и след рН корекция



От фигурата (Фиг.12.) се вижда, че след всяко измерено рН от съответния ден, е необходима корекция на рН, за да се предотврати твърде голямо понижаване на рН, което би довело и до спиране на процеса. Стриктното следене и корекция на рН в хода на процеса е важно за постигането на балансиран процес на анаеробно разграждане.



Фиг. 13. рН по дни за всяка секция (само измерено рН, без корекция)



Фиг. 14. рН по секции за съответния ден

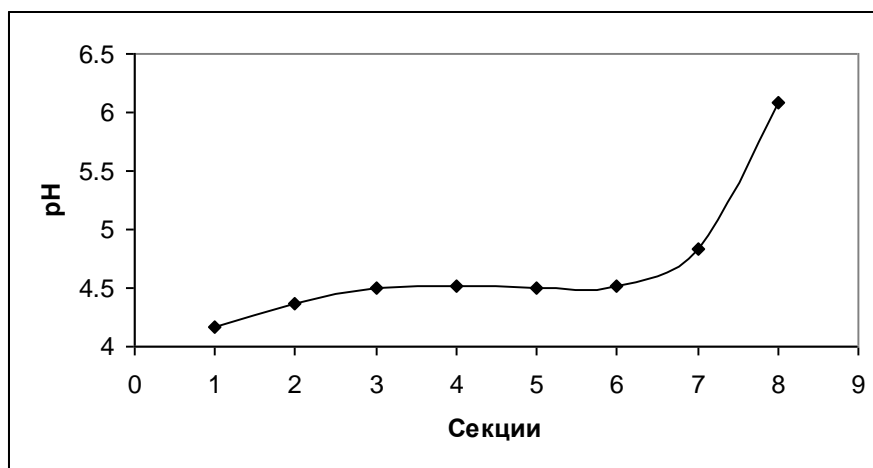
От фигурата (Фиг. 14.), може да се забележи, че във всяка секция, рН спада във всеки следващ ден. Известни изключения се забелязват в секциите 4 до 7, в които се наблюдават

колебания в нивата на рН. Това са и секциите в които основно са разположени процесите на ацидогенеза, ацетогенеза и метаногенеза.

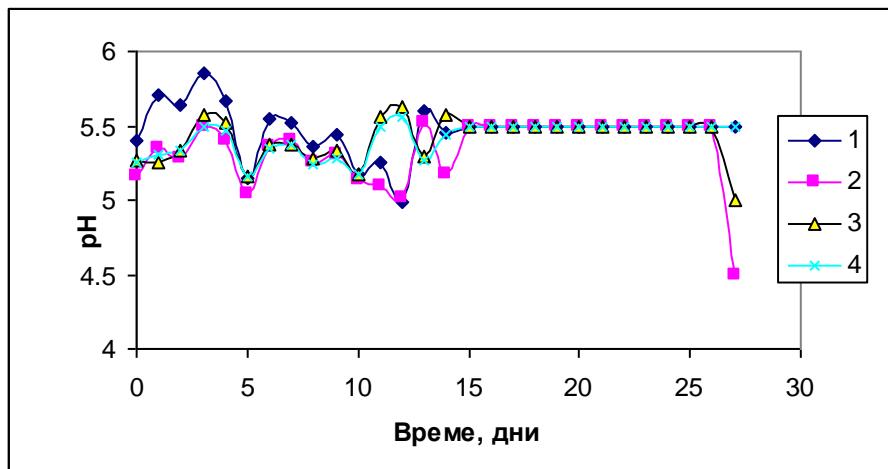
Понижаването на рН във всеки следващ ден се дължи на образуването на нови количества мастни киселини. Това най – отчетливо се проявява в първите три камери, където рН спада до стойности извън оптимума за метаногенеза. Ефектът не е толкова отчетлив в камери 7 и 8, където мастните киселини са вече разградени и условията са подходящи за метаногенеза.

В хода на процеса на етап ацидогенеза се образуват различни киселини, като в най – голямо количество и значение е пропионовата киселина.

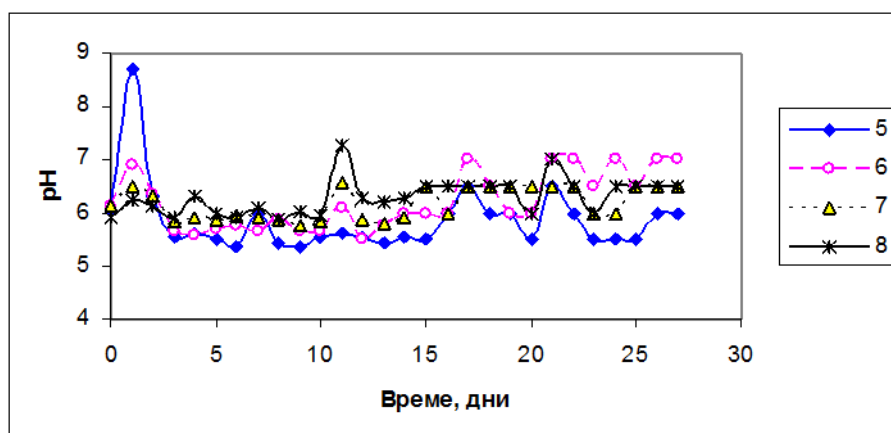
В началото стойностите на рН са твърде ниски и неподходящи за метаногенеза (фиг. 11). Примерни наблюдавани профили на рН и тяхното изменение при корекция на рН в продължение на 30 дни са показани на Фиг. 16 и 17. На фиг. 17 са показани профилите при корекция на рН с натриева основа. Стойностите на рН в секции 1-4 са ниски и сравнително стабилни (фиг. 16). В тези секции протичат предимно процесите на хидролиза, ацидогенеза и ацетогенеза. Условията в секции 5-8 не са така стабилни (фиг.17). Тук се налага строг контрол на рН, за да се избегне подкиселяването и компрометирането на метаногенезата.



Фиг. 15. Начален рН-профил по секции.

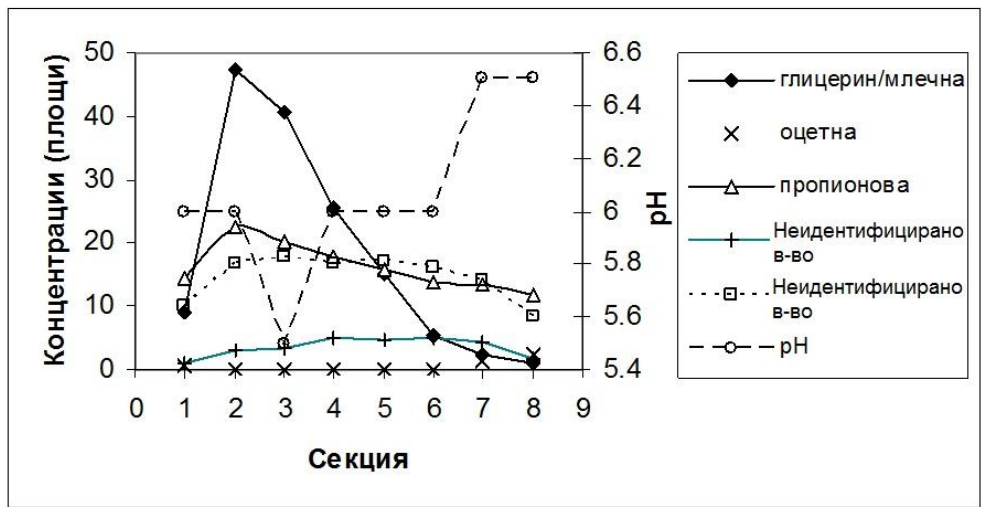


Фиг. 16. Изменения на рН за секции 1-4, снети в продължение на 28 дни.

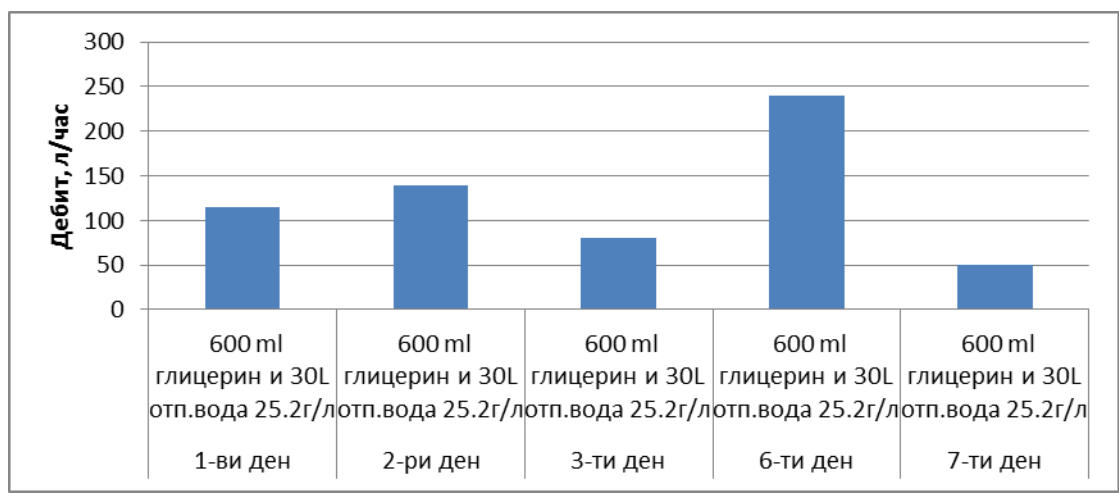


Фиг. 17. Изменения на рН за секции 5-8, снети в продължение на 28 дни с корекция на рН.

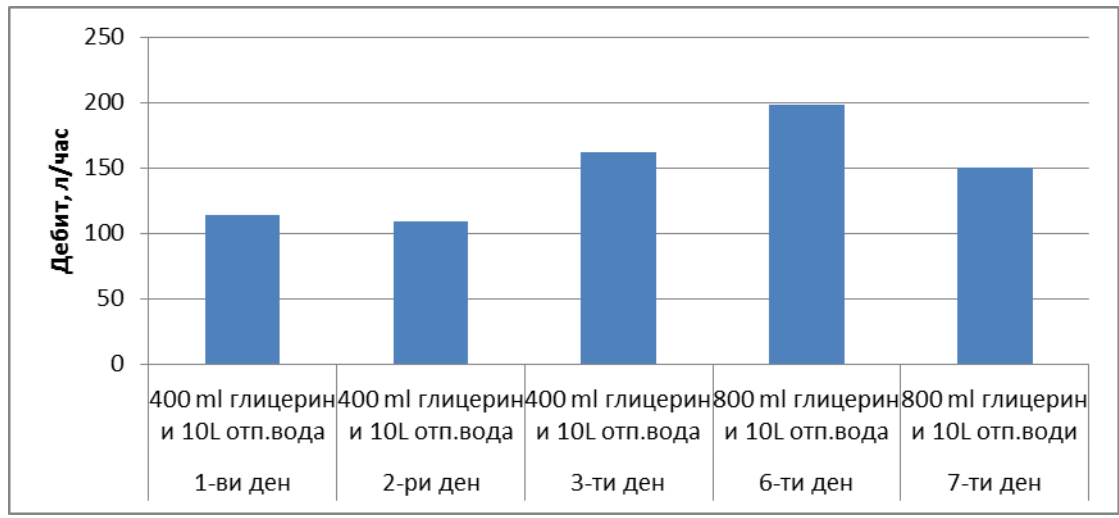
Част от получените резултати за съдържанието на органични киселини, съпоставени с данни за рН по секции са показани във фигура 18.



Фиг. 18. Профили на субстрата и образуваните органични киселини по секции.



Фиг. 19. График на захранване и часов дебит на биогаза за 7 дни.

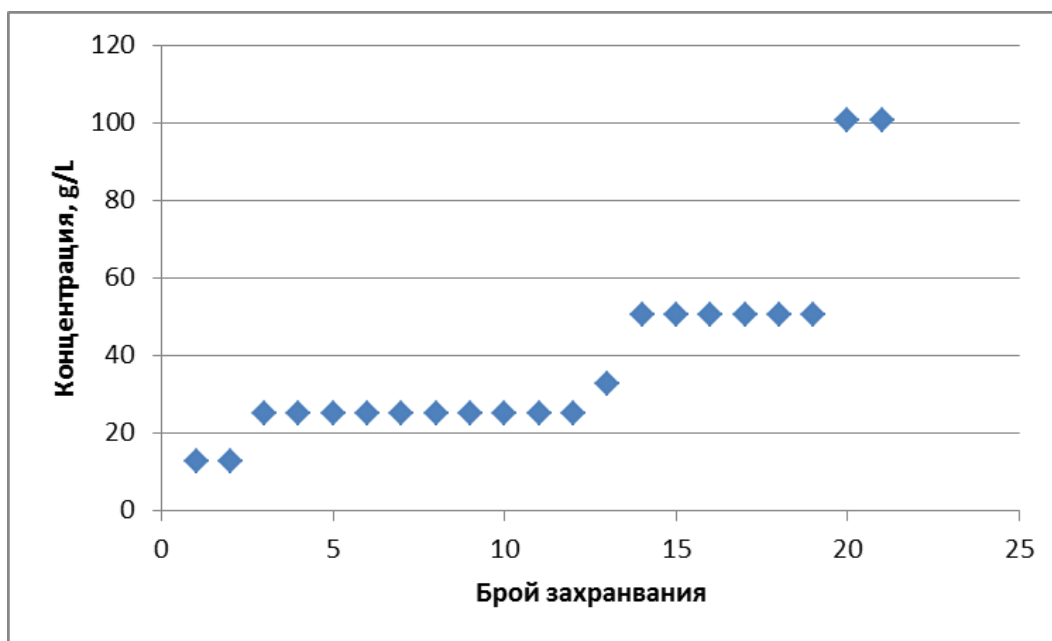


Фиг. 20. График на захранване и часов дебит на биогаза за 7 дни.

От графиките на фиг. 19 и 20, може да се каже, че при по – високо съдържание на глицерин в захранващия поток се постига сравнително стационарен процес по отношение на дебита и горимостта на биогаза. Необходимо е обаче строго контролиране на рН-профила в биореактора, особено в секциите, в които протича метаногенезата.

Качественият анализ на отделяния биогаз показва, че освен метан той съдържа малко въглероден диоксид и не съдържа серни съединения (сероводород и меркаптани). Последното се очакваше, поради факта, че основният субстрат е глицерол. Обемният газов анализ показва много ниско съдържание на въглероден диоксид (под 20% об.) В някои случаи съдържанието на метан достигаше 95% об. Тези факти ни доведоха до заключението, че пътят на редукцията на  $\text{CO}_2$  с водород, произлизащ при разпадането на формиати е основния процес и преобладава над декарбоксилирането на ацетати. Това заключение се потвърждава от установения микробен профил по камерите в биореактора, показан в Таблица 6.

Графиката по долу показва концентрациите на глицерола в захранващия поток във времето. Всяка точка отговаря на отделно захранване със съответната концентрация на глицерол.



Фиг.21. Концентрация на глицерол във воден разтвор в захранващия поток (в продължение на 38 дни).

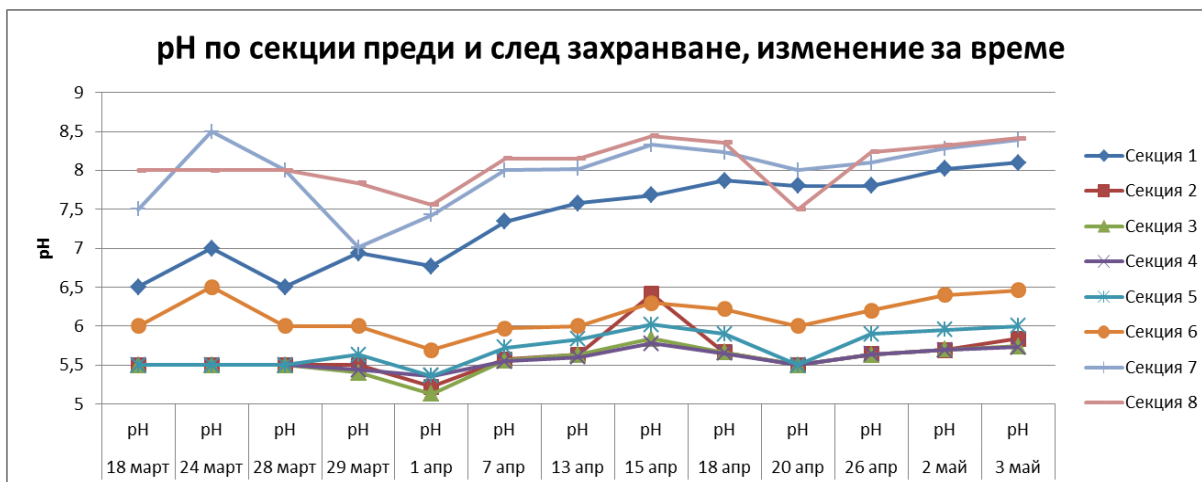
Захранването беше проведено в продължение на 38 дни, като в рамките на този период са направени 21 отделни захранвания. Началната концентрация е 12,1 g/L, а крайната – 100,8 g/L ( Фиг.21.).

След известно прекъсване работата на реактора беше проведен следващ експеримент, при който бяха използвани по – ниски концентрации на глицерол, но реакторът беше оставен да работи по – продължително време (от 29 март до 16 октомври). Целта бе да се установи влиянието на глицерола и получаването на биогаз за по – голям период от време. Прави се захранване само в началото на експеримента (на четири пъти), на 30<sup>-ти</sup> март с концентрация – 6,3 g/L (5 ml/L), на 7<sup>-ми</sup> април с концентрация – 12,6 g/L (10 ml/L), на 20<sup>-ти</sup> април с концентрация – 18,9 g/L (15 ml/L) (глицерол/вода) и на 3<sup>-ти</sup> май с концентрация – 25,2 g/L (20 ml/L). Биореакторът беше пуснат да работи в продължение на 202 дни, при който бяха взети 471 контролни проби за биогаз. Проследен беше добивът на биогаз, както и неговата горимост. От 471 контролни проби, положителни за горене бяха 444 и 27 бяха отрицателни.

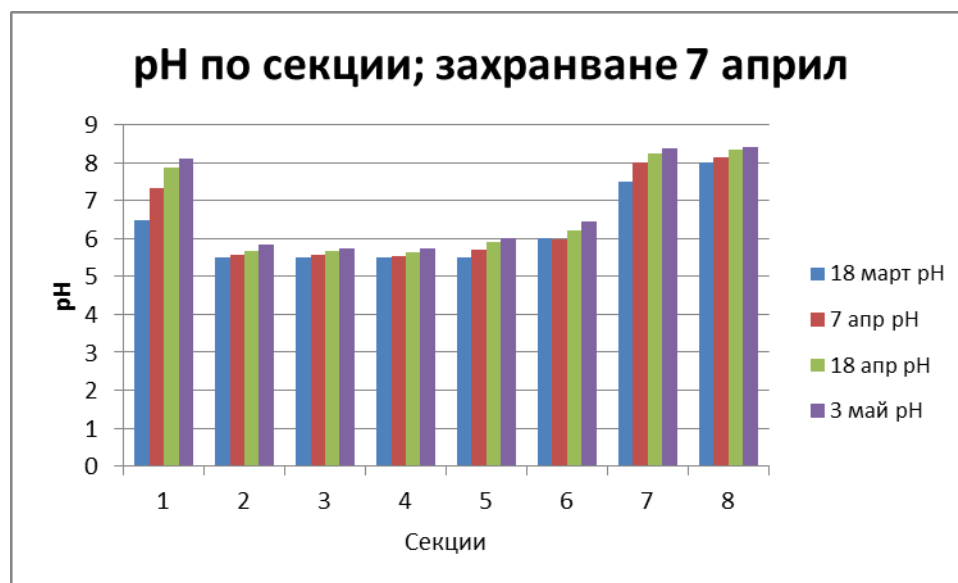
По долу е дадена графика (Фиг. 22) на полученият почасов дебит на биогаза.



Фиг. 22. Добив на биогаз, почасов



Фиг.23. Изменение на рН по секции във времето. Начало на захранването -30 март 2011 г. На графиката (Фиг.23. ) са показани данните от измереното рН в биореактора по секции. Данните от 18 до 29 март са преди захранване, данните от 1 април са след захранване на биореактора. Прави впечатление, че в Секция 1 (камера 1), рН нараства малко с течение на времето, особено след захранване. Това се дължи на факта, че добавения отпадъчен глицерол съдържа известни количества КОН.



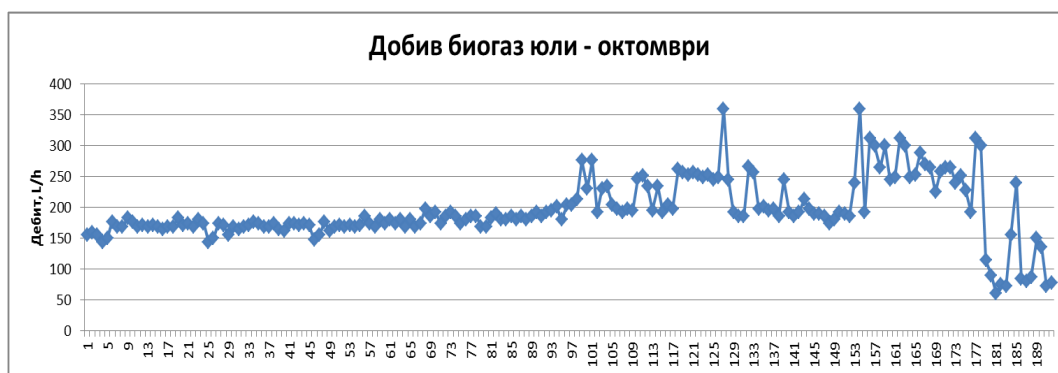
Фиг. 24. рН по секции; захранване 7<sup>ми</sup> април

От фиг 24, се вижда, че най – голямо понижение на рН поради натрупването на мастни киселини се наблюдава в секции от 3 до 5. рН расте в секция 6 поради изчерпване на киселините, а в секции 7 и 8 има добри условия за метаногенеза. Последният факт

благоприятства по – голямото натоварване на реактора с глицерол, при което продължава да се образува метан.



Фиг.25. Добив на биогаз във първата част на експеримента



Фиг.26. Добив на биогаз във втората част на експеримента

На фиг. 25 – 26 са показани часовите дебита на получаване на биогаз за периода 29 март до 16 октомври, 2011 г. В началото на експеримента се забелязват по – големи колебания в дебита на получения биогаз. След това се установява сравнително равновесие, последвано от нови колебания в края на експеримента (най – вероятно поради изчерпване на хранителния ресурс след захранването). Установеният среден часов дебит на газа за експеримента е 168,58 L/h. При предходния експеримент (Е1), установения среден дебит бе 137 L/h .

По – късно през 2015, бе проведен следващ експеримент (Е3), при който глицеролът беше заменен от говежди тор. Реакторът беше пуснат да работи в продължение на 3 месеца (90 дни). Резултатите за средния часов дебит на биогаза са показани на фиг. 27. Вижда се, че дебитът в този случай достига 700 L/h .



Очевидно оборския тор е по – подходящ като субстрат за получаване на биогаз. Той е достатъчно добре изучен, а нашата цел е да покажем пригодността на глицерола като субстрат за тази цел.



Фиг. 27 Среден почасов дебит на получения биогаз с оборски тор

## 7.2. Резултати от микробиологичната идентификация на развитите бактерии в реактора (Т2)

Резултатите от микробиологичния анализ на средите в камерите на 8-стъпалния реактор при субстрат глицерол са показани в Таблица 6.

Таблица 6. Съдържание на различни родове бактерии в отделните камери на 8-стъпалния биореактор. Аеробни, факултативно-аеробни и анаеробни бактерии.

Камера	Аеробни, факултативно-аеробни, брой бактерии в 1 мл	Анаеробни, брой бактерии в 1 мл	Родове	Получаване на метан
1	Плесени, <i>Bacillus</i> ~1 x 10 <sup>2</sup>	~1 x 10 <sup>1</sup>		-
2	<i>Klebsiella</i> ~1 x 10 <sup>3</sup>	~1 x 10 <sup>5</sup>	<i>Methanosarcina</i>	Ацетат, CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> [65-68]
3	<i>Klebsiella</i> ~1 x 10 <sup>3</sup>	~1 x 10 <sup>5</sup>	<i>Methanobacterium</i>	CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> [66, 69-79]
4	<i>Klebsiella</i> ~2 x 10 <sup>3</sup>	~1 x 10 <sup>6</sup>	<i>Methanobacterium</i>	CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> [66, 69-79]
5	<i>Klebsiella</i> 6-8 x 10 <sup>2</sup>	~4-5 x 10 <sup>6</sup>	<i>Methanobacterium</i>	CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> [66, 69-79]
6	<i>Klebsiella</i> ~4 x 10 <sup>2</sup>	~2 x 10 <sup>6</sup>	<i>Methanobrevibacter</i>	CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> [66, 69-79]
7	<i>Klebsiella</i> 1-2 x 10 <sup>3</sup>	~1 x 10 <sup>6</sup>	<i>Methanobrevibacter</i>	CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> [66, 69-79]
8	<i>Bacillus, Klebsiella</i> ~1 x 10 <sup>2</sup>	~1 x 10 <sup>5</sup>	<i>Methanobrevibacter</i>	CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> [66, 69-79]

При субстрат глицерол биореактора се обогатява на представители на пръчковидните *Methanobacteriales* – *Methanobrevibacter* (*Methanobrevibacter ruminantium*) и *Methanobacterium*. Съставът на микробното съобщество може да бъде обяснен с различните пътища на разграждане на ацетата - един от централните метаболити и главен прекурсор на метана при анаеробното разграждане на отпадъци. Разграждането на ацетата може да стане по два пътя – *ацето-кластично* и *окислително* - до водород и въглероден двуокис. Първият метаболитен път се предпочита от представителите на *Methanosarcina* и *Methanosaeta*, докато вторият се извършва от синтрофни асоциации от родовете *Methanobrevibacter* и *Methanobacterium*, които основно се наблюдават в нашия случай.

Освен метаногенните бактерии обаче, в биореактора се развиват и редица паразитни (плесени, дрожди и бацили, попаднали от въздуха) или „помощни” микроорганизми. Изследването на аеробните представители разкри наличието на *Klebsiella*, *Bacillus* и пр., които спомагат за началното разграждане на субстратите до киселини.

Преобладаващите микробни видове в отделните клетки на реактора за производство на биогаз са описани в таблицата по-горе. Вижда се значително по-високото съдържание на метаногени в сравнение с аеробните и факултативно аеробните видове.

### **7.3. Профили на междинните продукти (Т2)**

Някои експериментални резултати за междинните продукти, рН и тяхното разпределение по камерите на биореактора са показани във Фиг.28а-d. Вижда се, че пируватите са в първа камера, като в следващите те не присъстват. В средата на биореактора (камера 4) се наблюдава значително понижаване на рН, поради натрупването на летливи мастни киселини, в частност оцетна и пропионова киселина. Ниските стойности на рН инхибират метаногенезата. За щастие ситуацията се подобрява в следващите камери, поради декарбоксилирането на киселините, а рН е в границите на оптимума за метаногенезата.

Различни профили на междинните продукти и рН по дължина на реактора по камери са показани на Фиг. 29а-с. Вижда се, че рН-стойностите в първата и междинните камери спадат между 5 и 5,5. Тази киселинност не позволява метаногенезата да произведе метан, но в последните две камери рН-стойностите са между 6,5 и 7,5, т.е. в тях

метаногенезата е възможна. Допълнителните експерименти показаха, че претоварването с глицерол (със захранващи дебети над 0,8 L/ден) води до спирането на метаногенезата. Това се обяснява с отместването на ниските стойности на рН в камери 5 и 6, поради нарастването на концентрациите на киселините в тях. В тези случаи преобладава *окислителното разграждане на киселините - до водород и въглероден двуокис*. За сравнение, преди добавянето на глицерола (при  $t = 0$ ) рН-стойностите в камери 5 до 8 са над 6, т.е. подходящи за метаногенеза. След седем дни подходящи стойности на рН се наблюдават само в камери 7 и 8, а концентрациите на киселините спадат в камери 4 до 8. Ситуацията се подобрява и на 12-тия ден рН – профилът е по-добър отколкото в началото.

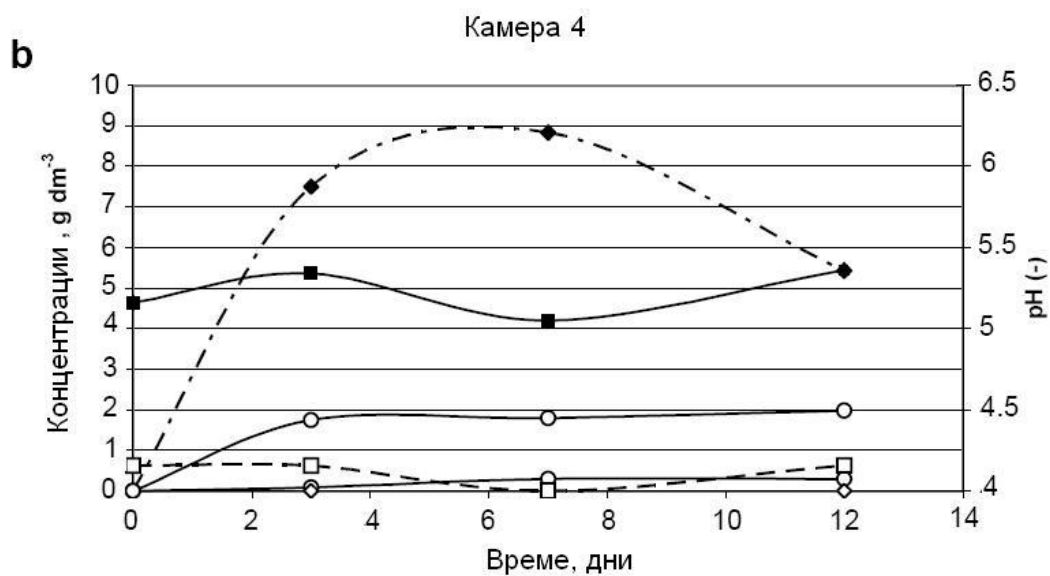
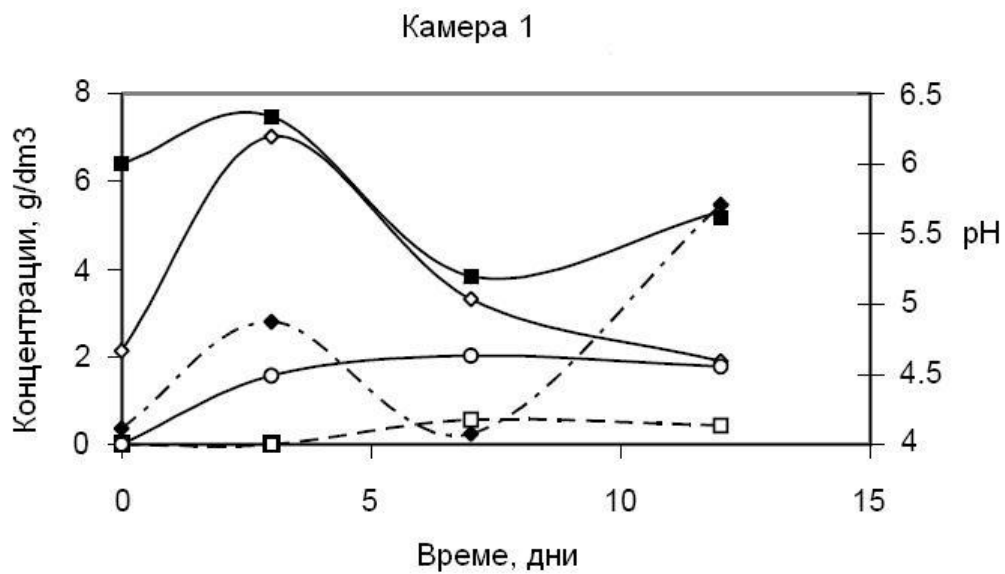
Значителни количества от 2,3-бутандиол са открити във ферментационната среда. Това е конкурентен процес на метаногенезата, както е показано в схемата на фиг. 2.

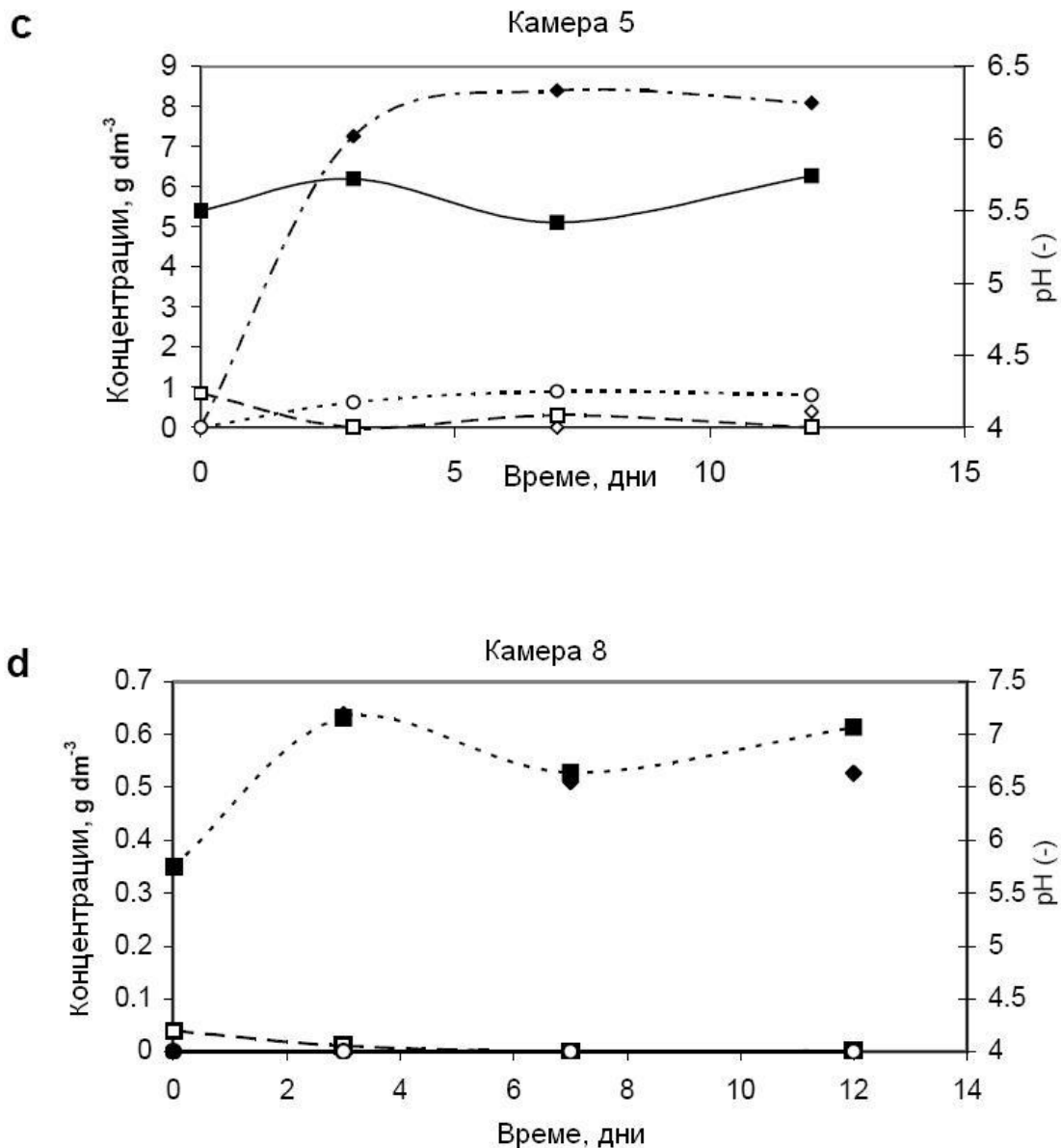
Прегледът на данните за 2,3-бутандиола показва, че след време концентрацията му в камери 4-8 се понижава, повече или по-малко. Количествена оценка на тези процеси, както и подбирането на време и камери за извличане на този продукт при непрекъснат процес на захранване може да се направи след съставянето на кинетичен модел и математично симулиране на базата на опитни данни.

Профилите на някои междинни продукти на 12-тия ден след добавянето на глицерол са показани на Фиг. 30. Глицеролът се забелязва само в камери 1-3. В тях оцетна киселина практически не се открива. Пропионовата киселина обаче плавно нараства в камери 1-3 и се забелязва във високи концентрации, освен в последните три камери, където очевидно тя се преработва. В камери 6-8 рН-стойностите са достатъчно високи за образуването на метан. Затова проблемът с натрупването на пропионова киселина е от съществено значение за добива на метан.

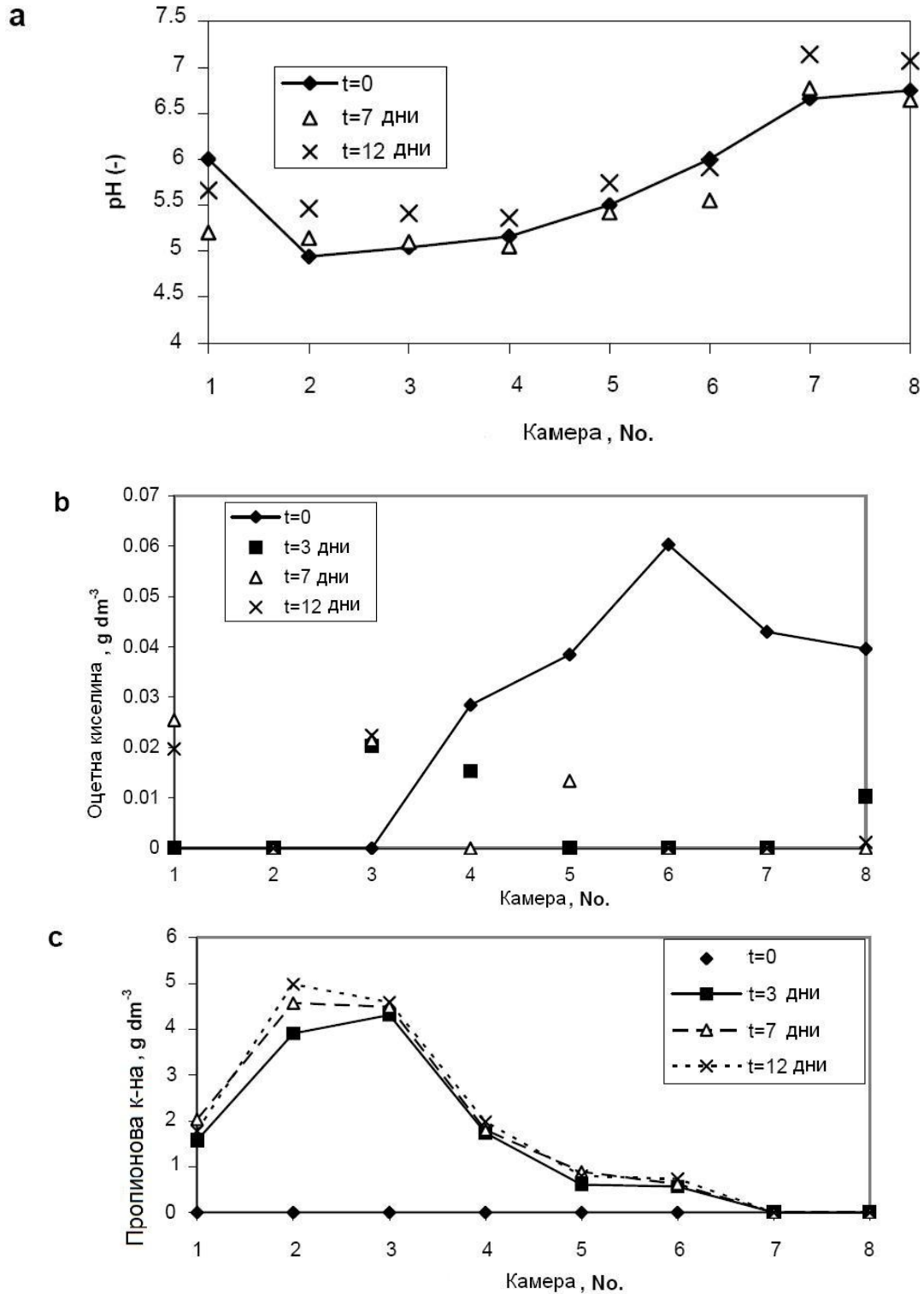
Оказа се, че обавянето на алкален агент за неутрализация на киселината и за корекция на рН не е подходящо, защото след декарбоксилирането на киселините алкалността на средата се повишава до недопустими (токсични) за бактериите стойности. Затова са допустими два алтернативни начина за справяне с проблема: селективно отстраняване на киселините (например чрез йонообмен) или контролирано добавяне на глицерола в малки количества. Първият е свързан с извличането на продукти – органични киселини, показани в схемите на Фиг. 2 и 3. Вторият не е подходящ при необходимостта от добив на биогаз, освен за ускоряването на добива на биогаз, с глицерол като

допълнителен субстрат. Този начин е подходящ за получаването на ценни продукти, например, 2,3-бутандиол, 1,3-пропандиол и пр.

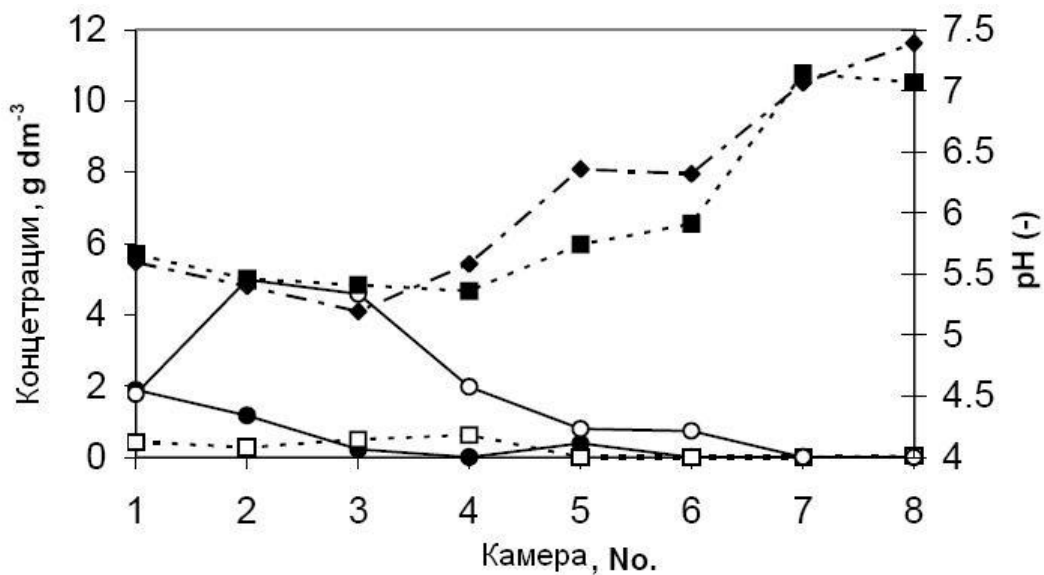




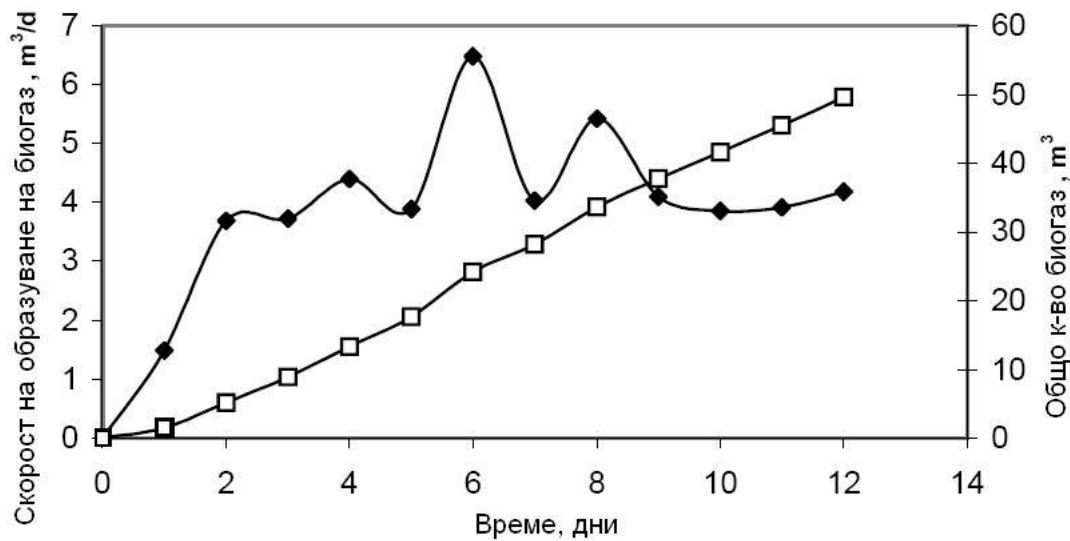
Фиг. 28. Времени профили на някои междинни продукти и рН в различни камери на биореактора (a-d). (◊) – неидентифицирано вещество; (◻) – оцетна киселина; (○) – пропионова киселина; (◆) - 2,3-бутандиол; (■) - рН. Захранване еднократно с 1 kg суров глицерол.



Фиг. 29. Профили на рН, оцетна и пропионова киселина различни моменти след захранването. (а) - рН; (б) – оцетна киселина; (с) – пропионова киселина. Захранване еднократно с 1 kg суров глицерол.



Фиг. 30. Концентрационни профили на субстрата, междинни продукти и рН 12 дни след захранването с глицерол.(●) - глицерол;(□) – оцетна киселина; (○) – пропионова киселина; (◆) - 2,3-бутандиол; (■) - рН. Захранване еднократно с 1 kg суров глицерол.



Фиг. 31. Изменение на производителността на биогаз и неговото натрупване във времето.(◆)- производителност на биогаз; (□) – общо количество на натрупания биогаз. Захранване еднократно с 1 kg суров глицерол.

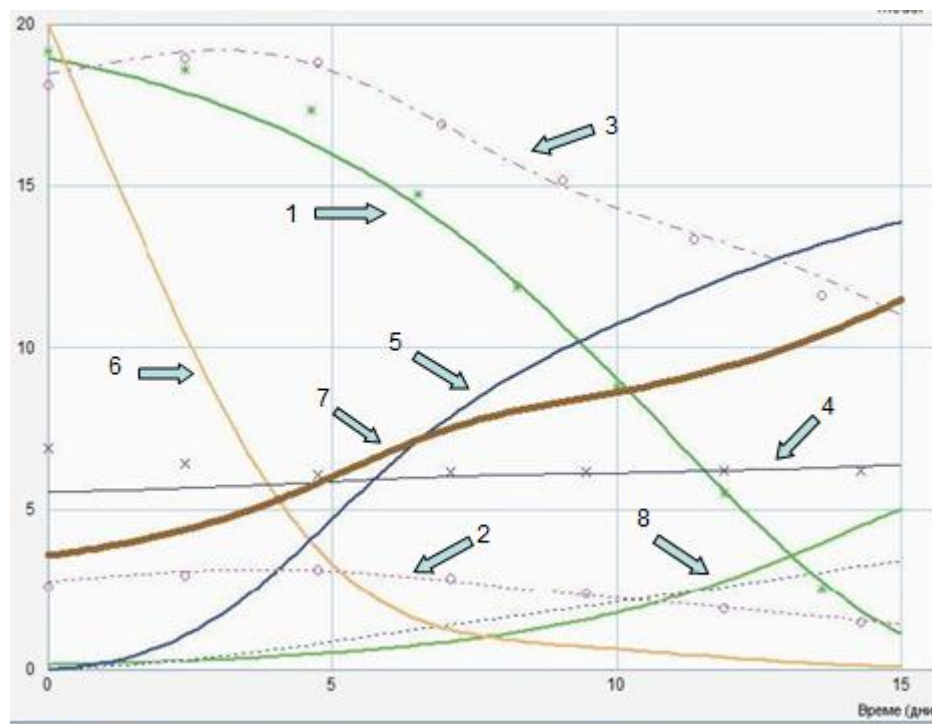
Производителността (получаването) на биогаз и неговото натрупване за период от 12 дни са показани във фиг. 31. Вижда се, че дневната производителност е най-висока на

шестия ден ( $6,5 \text{ m}^3/\text{ден}$ ). Общо взето, дневната производителност се колебае около средна стойност от  $4 \text{ m}^3/\text{ден}$ .

Тези резултати показват, че избраната конфигурация на биореактор позволява да се постигне много стабилен процес, тъй като при подбрения дебит на захранване винаги има камери с киселинност, подходяща за метаногенеза.

#### 7.4. Резултати от математичното моделиране (Т1)

На фиг. 32 са показани сравнения на моделните криви с опитните данни за различните определяни величини за камера 1 на биореактора. Моделните криви са определяни при по-висока чувствителност на ензимите, т.е. при по-тесен рН-интервал на ензимна активност, т.е. по-малка полу-ширина  $\sigma^2$  на разпределителната крива.



Фиг. 32. Времени профили и сравнение на моделните резултати с опитните данни (като площи на пиковете от ВЕТХ) при  $\sigma^2 = 0.25$ . Линия 1 – глицерол; линия 2 – оцетна киселина; линия 3 – 2,3-бутандиол; линия 4 – рН; линия 5 – обем на метана; линия 6 – пируват; 7 – ензимна активност на образуването на метан от мравчена киселина; 8 – концентрация на биомасата. Начална концентрация на глицерол в отделение 1:  $35 \text{ g/l}$ .

Линии 1 – 4 показват сравнението между опитните данни, определени чрез ВЕТХ и моделните криви. Линии 5 – 8 представляват качествена илюстрация за изменението на останалите величини. Същите опитни резултати са обработени с модела при ензимна



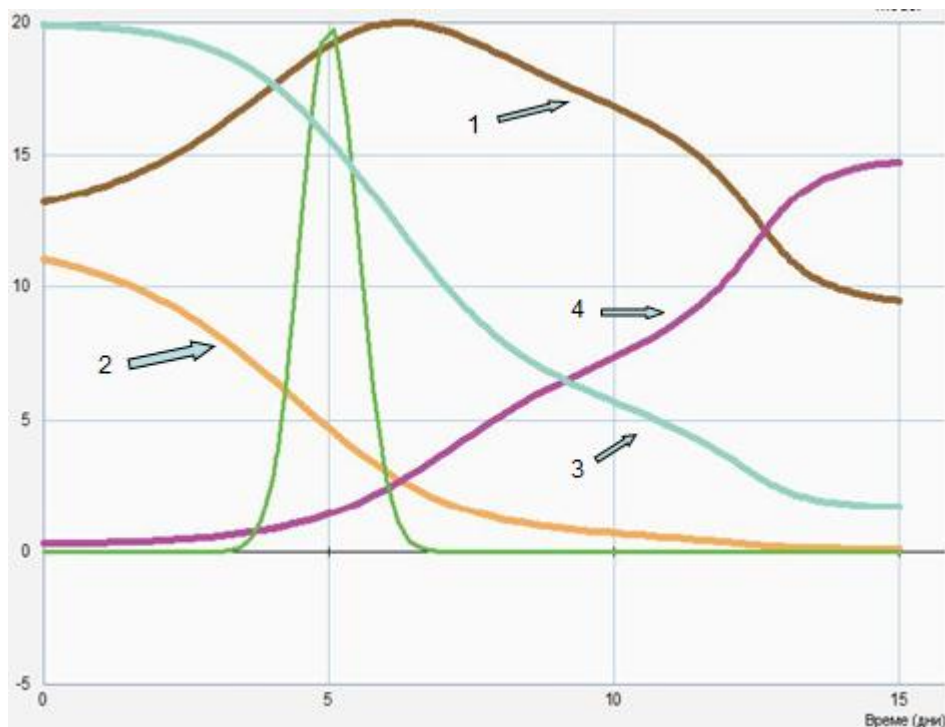
активност с друга полу-ширина на максимума  $\sigma$ . Наблюдавахме много добро съвпадение за 2,3-бутандиола (BD), глицерола (S), оцетната киселина (Ac) и рН. Оказа се, че ензимната активност при скоростната константа  $k_{CH_4}$  нараства по време на процесите в отделението на реактора поради слабото покачване на рН при превръщането на оцетната и мравчената киселина, фиг. 33.

**Ензимна чувствителност.** - Ефектът на чувствителността на ензимите ( $\sigma^2$ ) спрямо понижението на рН и неговото изменение във времето и спрямо концентрациите на различните компоненти на средата са показани на фиг. 22. Някои активности се покачват, други спадат в зависимост от рН-оптимумите и изменението на рН във времето.

Сравнението на определените кинетични параметри за тези два случая на ензимна чувствителност е показано в таблица 7. От представените резултати в Таблица 7 се вижда, че в някои случаи процесите са слабо чувствителни спрямо ензимната активност, като функция на рН. Това се отнася за параметрите  $\mu_{max}$ ,  $k_{BD}$ ,  $k_{BD1}$ ,  $k_{Ac}$  (максимална специфична скорост на растеж, скоростни константи на образуване и разграждане на 2,3 бутандиол и на образуване на оцетна киселина). Процесите на образуване на мравчена киселина и на декарбоксилиране на оцетна киселина с образуването на метан са по – чувствителни спрямо рН оптимума. Тази чувствителност се проявява при по – малката ширина на Гаусовата крива на ензимната активност ( $\sigma^2$ ). Скоростната константа на декарбоксилирането на оцетна киселина  $k_{Ac1}$  е почти 2 пъти по – висока при по – слаба чувствителност на рН.

Таблица 7. Сравнение на определените параметри за отделение 1 при различна ензимна чувствителност  $\sigma^2$ . Начална концентрация на глицерол в отделение 1: 35 g/l

Параметър	$\sigma^2 = 0,25$	$\sigma^2 = 0,5$
$\mu_{max}, h^{-1}$	0,274	0,275
$k_F, h^{-1}$	0,656	0,521
$k_{BD}, h^{-1}$	0,948	1,004
$k_{BD1}, h^{-1}$	0,105	0,118
$k_{Ac}, h^{-1}$	0,107	0,099
$k_{Ac1}, h^{-1}$	0,154	0,272
$Pv_0$ , площ на пика (-)	19,54	19,98



Фиг. 33. Симулирани изменения на ензимните активности ( $b_i$ ) по време на ферментационния процес в камера 1. Линия 1:  $b_{\text{CH}_4}$ ; линия 2:  $b_{\text{PV}}$ ; линия 3:  $b_{\text{F}}$ ; линия 4:  $b_{\text{BD}}$ . Гаусовата крива е за сравнение. Начална концентрация на глицерол в камера 1- 35 g/l.

**Определени параметри за две различни отделения на реактора.** Сравнение на кинетичните параметри, определени за отделения 1 и 2 е показано в Таблица 8. Може да се заключи, че с изключение на  $k_{\text{BD}}$  е налице разумно съвпадение на определените величини. Разликите в началните концентрации на пирувата са очаквани, тъй като във второто отделение постъпва разтвор с вече превърнат глицерол, съдържащ междинни продукти (в това число и пируват).

Близките стойности на изчислените скоростни константи са потвърждение на съставения математичен модел. Оказа се, че моделирането е безсмислено за отделения 3 и 4, поради липсата на много от целевите вещества, като целевата функция става все по-неопределена. Заедно с това и отделянето на биогаз от тези отделения става все по-малко интензивно.

Таблица 8. Сравнение на определените параметри за първите две камери на биореактора (опитни резултати от друг опит). Начална концентрация на глицерол в камера 1-35 g/l.

Параметър	Камера 1	Камера 2
$\mu_{\max}, \text{h}^{-1}$	0,274	0,242
$k_F, \text{h}^{-1}$	1,370	1,450
$k_{BD}, \text{h}^{-1}$	0,820	0,340
$k_{BD1}, \text{h}^{-1}$	0,084	0,075
$k_{Ac}, \text{h}^{-1}$	0,078	0,085
$k_{Ac1}, \text{h}^{-1}$	0,063	0,062
$Pv_0$ , площ на пика (-)	18,4	39,7

По този начин с помощта на нашия модел може да се предвидят необходимия брой стъпала в каскадния биореактор, необходими за отделянето на биогаз. Друга възможност, която дава модела е, да се определи времето, необходимо за получаването на целевия продукт (например 2,3-бутандиол) с високи концентрации и добиви, като се избегнат следващите превръщания или биодеградация.

Разработеният математичен модел, макар и опростен, може да опише конкурентното превръщане на глицерол в биогаз и 2,3-бутандиол под действие на бактерии от рода *Klebsiella*. Този подход може да бъде използван за изследването и на други микробни култури, при условие че е известен метаболитният път. Поради много сложния метаболизъм и липсата на знания за кинетиката на всяка реакция със съответните скоростни константи моделирането има в известна степен демонстративен характер, но може да служи като индикация за определянето на необходимия брой камери в каскадния реактор, достатъчни за пълното превръщане на глицерола в биогаз и други метаболити с практическо значение.

## 8. Изводи

1. Общият извод от направените изследвания е, че глицеролът може да се използва като субстрат за добив на биогаз, но този процес не може да бъде основен за решаването на проблема му като отпадък. Той може да се използва като спомагателен субстрат за добиването на биогаз при строг рН-контрол в метаногенната зона на реактора или с извличане на пропионовата киселина от онези секции, където киселинността е недопустимо висока (при ниски рН).
2. Метаногенните микробни култури, открити в биореактора при ферментацията на глицерола са в по-висока степен способни да превръщат въглеродния диоксид и водорода в метан, отколкото да разграждат органичните киселини (в частност пропионовата) до ацетат и метан. Затова биогазът се обогатява на метан, като съдържанието му достига 95% об.  
Слабо застъпеното декарбоксилиране на мастните киселини дава обяснение за силното подкисляване на средата при употребата на глицерола като субстрат в сравнение с други субстрати.
3. Експерименталното изследване на ферментацията на глицерол в биореактор, разделен на камери показва, че тази конфигурация на биореактора позволява разделянето на зоните с натрупване на органични киселини, съпроводено с понижение на рН от зоните с метаногенна активност. Каскадният биореактор осигурява голяма стабилност спрямо смущения в хранването, поради едновременното протичане на последователните процеси на хидролиза, ацидогенеза, ацетогенеза и метаногенеза на различни места в реактора по едно и също време.
4. Разработен е математичен модел, описващ кинетиката на ферментацията на глицерол на базата на известна метаболитна схема. Моделът отчита чувствителността на ензимната активност спрямо рН, като тези зависимости са апроксимирани с Гаусови криви. Моделът позволява да се преценят чувствителността на ензимите катализиращи реакции в метаболитната схема спрямо рН и условията за получаване на други продукти по конкурентен механизъм, например 2,3-бутандиол. Възможно е да се оцени необходимия брой

камери за пълното превръщане на глицерола в биогаз или в други метаболити от практическо значение.

## ОЗНАЧЕНИЯ

### към системата диференциални уравнения (12)

$A_c$  – концентрация на ацетат ( $\text{kg/m}^3$ )

$b_i$  – безизмерни функции, отчитащи рН-оптимумите на различните ензими

$BD$  – концентрация на 2,3-бутандиол ( $\text{kg/m}^3$ )

$CH_4$  – концентрация на метан ( $\text{kg/m}^3$ )

$CO_2$  – концентрация на въглероден диоксид ( $\text{kg/m}^3$ )

$F$  – концентрация на формиат ( $\text{kg/m}^3$ )

$K_x$  – специфична скорост на отмиране на биомасата, ( $\text{h}^{-1}$ )

$K_m$  – константа на насищане в уравнението на Моно, ( $\text{kg/m}^3$ ) вж. (12)

$k_i$  – скоростни константи на различните реакции, ( $\text{h}^{-1}$ ) вж. Фиг. 9.

$P_V$  – концентрация на пируват ( $\text{kg/m}^3$ )

$S$  – концентрация на субстрат-глицерол ( $\text{kg/m}^3$ )

$t$  – време, h

$X$  – концентрация на биомасата ( $\text{kg/m}^3$ )

$Y_{XS}$  - добивен коефициент за биомасата, (-)

$\alpha$  – безизмерен коефициент на добива за образуване на пируват, (-)

$\mu$  - специфична скорост на растеж на биомасата, ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_{\max}$  – максимална специфична скорост на растеж, ( $\text{h}^{-1}$ )

$\sigma$  - дисперсия в Гаусова разпределителна крива

### Индекси

$A_c$  - означава величини, свързани с образуването на ацетати

$A_{c1}$  - означава величини, свързани с декарбоксилирането на ацетати

$bd$  – означава величини, свързани с образуването на 2,3-бутандиол

$bd1$  – означава величини, свързани с разлагането на 2,3-бутандиол

*CH<sub>4</sub>* – означава величини, свързани с метан

*CO<sub>2</sub>* – означава величини, свързани с въглероден диоксид

*F* – означава величини, свързани с формиат

*PV* - означава величини, свързани с пируват

*S* – означава величини, свързани с субстрата

## ЛИТЕРАТУРА

1. Владислава Георгиева, Министерство на икономиката и енергетиката, Дирекция Опазване на околната среда
2. Европейската енергийна агенция - <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/real-change-in-transport-prices/assessment-6>
3. European Biodiesel Board
4. US Biodiesel Board
5. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory (2015); International Energy Agency, World Energy Outlook (2015)
6. Мартин Мителбах и Клаудия Ремшмидт – „Биодизел“ подробен наръчник, изд. Сдружение „Съюз на производителите на растителни масла и маслопродукти в България“
7. Knothe, G. Historical perspectives on vegetable oil – based diesel fuels. *Inform* **12** (11) (2001), 1103-1107
8. Mathot, R. E. Vegetable Oils for Internal Combustion Engines. *Engineer* **132** (1921), 138-139
9. Srivastava, A. and R. Prassad. Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **4** (2000), 111-133
10. Schwab, A. W., M.O. Bagby and B. Freeman. Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. *Fuel* **66** (1987), 1372-1378
11. Schwab et al, 1983
12. Pryde, E. H. Vegetable oils as fuel alternatives – symposium overview. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **61** (1984), 1609-1610
13. Ziejewski, M., K. R. Kaufman, A. W. Schwab and E. H. Pryde. Diesel engine evaluation of a nonionic sunflower oil – aqueous ethanol microemulsion. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **61** (1984), 1620-1626
14. Duffy, P. on the construction of stearine. *Journal of the Chemical Society* **5** (1-303), (1852)
15. Henriques, R. Über partielle Verseifung von Ölen und Fetten. *Zeitschrift für Angewandte Chemie* **15** (1898), 338-345



16. Mittelbach, M., F. Andrae and H. Junek. Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung eines als Kraft-bzw. Brennstoffs geeigneten Fettsäureestergemisches. Austrian Patent AT 386 222 B (1986)
17. Ufop (Union zur Förderung von Öl-und Proteinpflanzen). Biodiesel. Fakten Argumente. Tipps. [www.ufop.de](http://www.ufop.de). (January 2003)
18. EN 14214. Automotive fuels – Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines. Requirements and test methods. CEN. European Committee for Standardization. (July 2003)
19. Mittelbach, M. and H. Junek. Verfahren zur Herstellung eines Fettsäureestergemisches aus Abfallfetten bzw. Ölen und Verwendung dieses Gemisches als Kraft-bzw. Brennstoff. Austrian Patent AT 388 743 B (1988)
20. Muskett, R. and C. R. Anderson. Method for production of alkyl esters. International Patent WO 2004/048311 A1, (2002)
21. US Energy Information Agency – US EIA
22. International Energy Agency – IEA
23. US Department of Energy, information actual to 30 03 2016
24. D. L. van Dyne, P.L. Raymer, BIODIESEL PRODUCTION POTENTIAL FROM INDUSTRIAL RAPESEED IN THE SOUTHEASTERN U.S., 1992., p. 7.
25. Sharp, C. A. emissions and lubricity evaluation of rapeseed derived biodiesel fuels. Final Report from SWRI to Montana Department of Environmental Quality. November 1996
26. Goerke, D. Ansatzpunkte zur Verbesserung der Wettbewerbsfähigkeit von Pflanzenöl als Treibstoff gegenüber Dieselkraftstoff. Fortschritt – Bericht VDL. Reihe 12 Verkehrstechnik Nr.368. Düsseldorf: VDI – Verlag, 1998
27. Sams, T. Exhaust Components of Biofuels Under Real World Engine Conditions. Plant Oils as Fuels. Present State of Science and Future Developments. Proceedings of the Symposium held in Potsdam, Germany. Springer ( 1998), 64-77
28. Hütwohl , G., B. Maurer, and T. Vogel. Emissionen von Dieselmotoren. In Der Nahverkehr 7-8 (1997)
29. Hattingen, U. and H.U. Adt. Vergleichende Untersuchung zum Emissions – und Betriebsverhalten verschiedener Pkw – und Nutzfahrzeugmotoren bei Betrieb mit Pflanzenölester. Landbauforschung Völkenrode. Sonderheft 190 (Biodiesel – Optimierungspotentiale und Umwelteffekte) (1998), 127-133

30. Eichlleder, H. and S. Hausberger. Partikelemissionen eines GVB – Stadtbusses bei Betrieb mit Biodiesel und Potenziale von nachrüstbaren Abgasnachbehandlungssystemen. Study conducted by Forschungsgesellschaft für Verbrennungskraftmaschinen und Thermodynamik mbH Graz ( May 2003)
31. Hausberger, 2003
32. Peterson, C. L., D. L. Reece, J. C. Thompson, S. M. Beck, and C. Chase. Ethyl Ester of Rapeseed Used as a Biodiesel Fuel – A Case Study. *Biomass and Bioenergy* 10 (5/6) 1996, 331-336
33. Makareviciene , V. and P. Janulis. Environmental effect of rapeseed oil ethyl ester. *Renewable Energy* 28 (2003), 2395-2403
34. Graboski , M. S., J. D. Ross and R. L. McCormick. Transient emissions from no.2 diesel and biodiesel blends in a DDC series 60 engine. Society of Automotive Engineers. Special Publications SP-1179 (Diesel Engine Combustion and Emission Characteristics) (1996), 55-62
35. Purcell, D. L., B. T. McClure, J. McDonald, and H. N. Basu. Transient Testing of Soy Methyl Ester Fuels in an Indirect Injection, Compression Ignition Engine. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73 (3) ( 1996), 381-388
36. Sheehan, J., V. Camobreco, J. Duffield, M. Graboski, and H. Shapouri. An Overview of Biodiesel and Petroleum Diesel Life Cycles. A Joint Study sponsored by the U.S Department of Agriculture and U.S Department of Energy (1998)
37. Southwest Research Institute. Summary Results from NBB/USEPA Tier 1 Health and Environmental Effects Testing for Biodiesel Under the Requirements for USEPA Registration of Fuels and Fuel Additives (40 CFR Part 79, Sec 211(b) and 122 (e)). Final Report. ( 2003)
38. Sharp, C. A., S. A. Howell and J. Jobe. The Effect of Biodiesel Fuels on Transient Emissions from Modern Diesel Engines, Part 1. Regulated Emissions and Performance. Society of Automotive Engineers Technical Paper (2000)
39. Hass, M. J., K. M. Scott, T. L. Alleman and R. L. McCormick. Engine Performance of Biodiesel Fuel Prepared from Soybean Soapstock: A High Quality Renewable Fuel Produced from a Waste Feedstock. *Energy & Fuels* 15 (5) (2001), 1207-1212
40. Canakci, M., A. Monyem and J. Van Gerpen, 2003
41. Hansen et al., Hansen C. F, Hernandez A, Mullan BP, Moore K, Trezona-Murray M, King RH, Pluske JR: A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effects of feeding crude glycerol to growing

- finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. *Anim. Prod Sci* 2009, 49:154-161
42. Asad-ur-Rehman, Saman WRG, Nomura N, Sato S, Matsumura M: Pretreatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3 – propandiol production by *Clostridium butyricum*. *J Chem Technol Biotechnol* 2008, 83:1072-1080
  43. Dou, B., Dupont, V. and Williams, P. T., Computational Fluid Dynamics Simulation of Gas – Solid Flow during Steam Reforming of Glycerol in a Fluidized Bed Reactor. *Energy Fuels*, 22, 4102-4108 (2008)
  44. Adhikari, S., Fernando, S. D., To, S. D. F., Bricka, R. M., Steele, P. H. and Haryanto, A., Conversion of Glycerol to Hydrogen via a Steam Reforming Process over Nickel Catalysis. *Energy Fuels*, 22, 1220-1226, 2008
  45. Sabourin-Provost G, Hallenbeck PC: High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. *Bioresour Technol* 2009, 100:3513-3517
  46. Ragsdale, S. R. and Ashfield, C. B. , Direct – glycerin fuel cell for mobile applications. *ECS Transactions*, 16, 1847-1854 2008
  47. Arechederra, R. L. and Minter, S. D., Complete Oxidation of Glycerol in an Enzymatic Biofuel Cell. *Fuel Cells*, 9, 63-69, 2009
  48. J. Q. Albareli, D. T. Santos, M. R. Holanda, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* – Vol. 28, № 4, pp. 691 – 698, October – December, 2011
  49. Otoma, S., Mori, Y., Terazono, A., Aso, T. and Sameshima, R., Estimation of energy recovery and reduction of CO<sub>2</sub> emissions in municipal solid waste power generation. *Resources, Conservation and Recycling*, 20, 95-117, 1997
  50. Korobitsyn, M. A., Jellema, P. and Hirs, G. G., Possibilities for gas turbine and waste incinerator integration. *Energy*, 24, 783-793, 1999
  51. Lammers, P.J., Kerr, B.J., Weber, T.E., Bregendahl, K., Lonergan, S. M., Prusa, K. J., Ahn, D. U., Stoffregen, W. C., Dozier, W. A., Honeyman, M. S. Growth performance, carcass characteristics, meat quality and tissue histology of growing pigs fed crude glycerin-supplemented diets. *J. Anim. Sci.* 2008, 86, 2962 – 2970; Yang, F. X., Hanna, M. A., Sun, R. C. Value-added uses for crude glycerol - A byproduct of biodiesel production. *Biotechnol. Biofuels* 2012, 5, doi: 10.1186/1754-6834-5-13.
  52. Севдалина Тодорова, Русенски Университет, доклад „Оползотворяване на отпадъчен глицерол от производството на биодизел от *Bacillus subtilis* TS 01,

Science and Technologies, June 2015; 1. Патент BG 110823 A – течно вещество за размразяване на пътища и магистрали

53. Sathianachiyar, S., A. Devaraj, 2013. Biopolymer Producing by Bacterial Species Using Glycerol, a Byproduct of Biodisel. International Journal of Scientific and Research Publications, 3, 8, 1 – 5
54. Saimmai, A., O. Rukadee, V. Sbhon, S. Maneerat, 2012. Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7 Grown on Crude Glycerol Obtained from Biodisel Production Plant as Sole Carbon Source. Journal of Scientific and Industrial Research (India), 71, 06, 396 – 406
55. Anastacio, G.S., K. O. Santos, P. A. Suarez, F. A. Torres, J. L. De Marco, N. S. Parachin, 2014. Utilization of Glycerol Byproduct Derived from Soybean Oil Biodiesel as a Carbon Source for Heterologous Protein Production in *Pichia Pastoris*. Bioresour Technology, 152, 505 – 510. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.042
56. Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N: Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. J Biosci Bioeng 2005, 100:260-265
57. Fountoulakis MS, Manios T: Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. Bioresour Technol 2009, 100:3043-3047
58. Fountoulakis MS, Petousi I, Manios T: Codigestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. Waste Manage 2010, 30:1849-1853
59. Lopez JAS, Santos MDM, Perez AFC, Martin AM: Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. Bioresour Technol 2009, 100:5609-5615
60. Mario Pagliaro and Michele Rossi, The Future of Glycerol: New usages for a versatile raw material, RSC Publishing, Cambridge. ISBN: 0854041249.
61. da Silva, G. P., Mack M., Contiero, J., 2009, Biotechnol. Adv., 27, 30.
62. Ashby, R. D., Wyatt, V. T., Foglia, T. A. and Solaiman, D. K. Y. 2009, Industrial Products from Biodiesel Glycerol, in: Biocatalysis & Bioenergy, Hou, C. T. and Shaw, J. J. (Eds.), J. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, pp. 131-154.
63. Biebl H., Menzel K., Zeng A. P. And Deckwer W. D. 1999, Appl. Microbiol. Biotechnol., 52, 289.
64. Erik Wilkens & Anne Katrin Ringel & Diana Hortig & Thomas Willke & Klaus-Dieter Vorlop, BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING

65. Baek-Rock Oh, Jeong-Woo Seo, Sun-Yeon Heo, Won-Kyung Hong, Lian Hua Luo, Jun Ho Son, Don-Hee Park, Chul-Ho Kim, *Bioprocess Biosyst Eng*, DOI 10.1007/s00449-011-0603-2
66. Fermentive production of 1,3-propanediol; United States Patent 5254467; <http://www.freepatentsonline.com/5254467.html>
67. Braunegg, G., Genser, K., Bona, R. And Haage, G. 1999, *Macromol. Symp.*, 144, 375.
68. Tohoku Electric turns glycerin into bioplastics, <http://www.greencarcongress.com/2007/08/tohoku-elec-dev.html>
69. Himmi, E. H., Bories, A., Boussaid, A., Hassani, L. 2000, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 435.
70. P Boyaval, C Corre, *Production of propionic acid, Lait* (1995) 75, 453-461.
71. Pyung Cheon Lee, Woo Gi Lee, Sang Yup Lee, Ho Nam Chang, 2001, *Biotechnol. Bioeng.*, 72, 41.
72. S. Adhikari, S. D. Fernando, A. Haryanto, *Energy Conversion and Management*, Volume 50, Issue 10, October 2009, Pages 2600–2604.
73. López J.Á.S., De los Ángeles Martín Santos M., Pérez A.F.C., Martín A.M. (2009) *Bioresource Technol.*, 100,5609-5615.
74. K. Klepáčová, D. Mravec, E. Hájeková, M. Bajus, *Petroleum and Coal*, Vol. 45, 1-2, 2003, 54–57.
75. Hu, Z. C., Liu Z. Q., Zheng Y. G. and Shen Y. C. 2010, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 340.
76. Wei, Shenghua, Song, Qingxun and Wei, Dongzhi , *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 37:2, 113 – 121, 2007
77. Maerkl, H. 1980, *Fortschritte der Verfahrenstechnik*, VDI-Verlag: Düsseldorf, D., S. 509.
78. Petrov K. and Petrova P. 2010, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 943.
79. Saxena, R., Anand, P., Saran, S. and Isar, J.2009, *Biotechnol. Adv.*, 27, 895.
80. Yanping Zhang, Zhihua Huang, Chenyu Dua, Yin Li, Zhu'an Cao, 2009, *Metabolic Eng.*, 11, 101-106.
81. González-Pajuelo M., Meynial-Salles I., Mendes F., Soucaille P., Vasconcelos I., *Appl Environ Microbiol.* 2006 Jan;72(1):96-101.

82. Biebl H, *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2001 Jul;27(1):18-26.
83. D. Szymanowska-Powalowska, *Electronic Journal of Biotechnology*, Volume 17, Issue 6, November 2014, Pages 322–328.
84. A. Reungsang, S. Sittijunda, I. Angelidaki, Simultaneous production of hydrogen and ethanol from waste glycerol by *Enterobacter aerogenes* KKU-S1, *International Journal of Hydrogen Energy*, Volume 38, Issue 4, 12 February 2013, Pages 1813–1825
85. Raymond E., S. Nwachukwu, A. Shahbazi, Lijun Wang, M. Worku, S. Ibrahim, K. Schimmel, Optimization of cultural conditions for conversion of glycerol to ethanol by *Enterobacter aerogenes* S012, *AMB Express.* 2013; 3: 12. doi: 10.1186/2191-0855-3-12.
86. R. Jitrwung, V. Yargeau, Biohydrogen and Bioethanol Production from Biodiesel-Based Glycerol by *Enterobacter aerogenes* in a Continuous Stir Tank Reactor, *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 10650-10664; doi:10.3390/ijms160510650
87. Kolesárová N., Hutňan M., Špalková V., Lazor M. (2010). In: Proceedings from the 37th International Conference of SSCHE, Tatranske' Matliare, Slovakia, 1126-1139.
88. Yang Y., Tsukahara K., Sawayama S. Biodegradation and methane production from glycerol-containing synthetic wastes with fixed-bed bioreactor under mesophilic and thermophilic anaerobic conditions. *Process Biochemistry* 2008;43(4):362–7.
89. Amon T., Kryvoruchko V., Amon B., Schreiner M. Untersuchungen zur Wirkung von Rohglycerin aus der Biodieselerzeugung als leistungssteigerndes Zusatzmittel zur Biogasproduktion aus Silomais, Körnermais, Rapspresskuchen und Schweinegülle. Institut für Landtechnik, Universität für Bodenkultur Wien. Source: [http://www.nas.boku.ac.at/fileadmin/\\_/H93/H931/AmonPublikationen/SEEGEndbericht.pdf](http://www.nas.boku.ac.at/fileadmin/_/H93/H931/AmonPublikationen/SEEGEndbericht.pdf); 2004 [accessed 25.05.09].
90. Glycerin as a biogas feedstock. <http://news.mongabay.com/bioenergy/2006/12/glycerin-as-biogas-feedstock.html>
91. L. Castrillón, Y. Fernández-Nava, P. Ormaechea, E. Marañón, *Bioresource Technology*, Volume 102, Issue 17, September 2011, Pages 7845–7849
92. Robra S., Serpa da Cruz R., Oliveira A.M., Almeida Neto J.A., Santos J.V. Generation of biogas using crude glycerin from biodiesel production as a supplement to cattle slurry. *Biomass and Bioenergy* 2010;34(9): 804 - 806.
93. S. Astals, V. Nolla-Ardèvol, J. Mata-Alvarez, *Bioresource Technology*, Volume 110, April 2012, Pages 63–70.

94. S. Astals, V. Nolla-Ardèvol, J. Mata-Alvarez, *Bioresource Technology*, Volume 110, April 2012, Pages 63–70.
95. O. Wohlgemut, *Co-Digestion of Hog Manure with Glycerol to Boost Biogas and Methane Production*, MSc. Thesis, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, p. 51.
96. Siles J.A., Martín M.A., Chica A.F., Martín A. Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource Technology* 2010;101(16):6315e21.
97. Fountoulakis M.S., Petousi I, Manios T. Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. *Waste Management* 2010;30 (10):1849e53.
98. M.S. Fountoulakis , T. Manios, *Bioresource Technology*, Volume 100, Issue 12, June 2009, Pages 3043–3047.
99. K. Ostrem, *Greening waste: anaerobic digestion for treating the organic fraction of municipal solid wastes*, M.S. Thesis, Columbia University, May 2004, p. 6.
100. Biogas Handbook Authors: Teodorita Al Seadi, Dominik Rutz, Heinz Prassl, Michael Köttner, Tobias Finsterwalder, Silke Volk, Rainer Janssen ISBN: 978-87-992962-0-0 Published by University of Southern Denmark Esbjerg, Niels Bohrs Vej 9-10, DK-6700 Esbjerg, Denmark
101. European Union. Article 1, Directive 1999/31/EC from April 1999 on the landfill of waste.
102. Co., B.A.G. (2004). *Waste To Biogas and Compost*. 2004. Danish Ministry of Environment and Energy, Copenhagen, Environment News,61. 2001.
103. De Baere, L. (2001). "The Right Forces - Producing Power from Recycled Organics." *Biocycle*. Department of Energy. (2001). *Emissions of Greenhouse Gases in the United States*.
104. A.C. Wilkie, *The Other Bioenergy Solution (The case of converting organics to biogas)*, *Engineering & Technology for a Sustainable World*, 13(8) 11-12, 2006.
105. Baccay and Hashimoto (1984). *Biotechnology and Bioengineering* 26(8): 885-891.
106. Lusk, P. (1999). "Latest Progress in Anaerobic Digestion." *Biocycle* 40(7).
107. Conrad, R. 2005, *Org. Geochem.*, 36, 739.
108. Gas Technology, I. (2003). *HIMET-A Two-Stage Anaerobic Digestion Process for Converting Waste to Energy*, 2003.

109. Davis, M. and D. Cornwell (1998). *Introduction to Environmental Engineering*. New York, WCB/McGraw-Hill.
110. Angelidaki I., W. Sanders (2004), *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 3, 117-129.
111. Krysteva M., Lalov I., Phelouzat J. L., *Bioresource Technol.* ,79, 83-85 (2001).
112. Krysteva M., Lalov I., Phelouzat J. L. (1999) Chaptire 6. *Energie de Biomasse*, 205-238, in the book *Sources D'Energie Renouvelables*, Edition de l' Universite Technique de Sofia.
113. Daugulis, A. J. (1988). "Integrated reaction and product recovery in bioreactor systems", *Biotechnol. Prog.*, 4, pp. 113.
114. Kertes, A. S. and King, C. (1986). "Extraction Chemistry of Fermentation product Carboxylic Acids", *Biotechnology and Bioengineering*, 28, pp. 269-282.
115. Yabannavar, V. M. and Wang, D. I. C. (1991a). "Strategies for reducing solvent toxicity in extractive fermentations", *Biotechnol. Bioeng.*, 37, pp. 716-722.
116. Yabannavar, V. M. and Wang, D. I. C. (1991b) "Extractive fermentation for lactic acid production", *Biotechnol. Bioeng.*, 37, pp. 1095-1100.
117. Timmer, J. K. M., Kromkamp, J. and Robbertsen, T. (1994). "Lactic acid separation from fermentation broth by reverse osmosis and nanofiltration", *Journal of Membrane Science*, 92, pp. 185-197.
118. Grobicki, A. and Stuckey, D. C. 1992, *Water Res.*, 26, 371.
119. В. Бешков и колектив, „Производство на биогаз от органични отпадъци“, проект No ИФ-02-15/24.10.2005 от Нац. иновационен фонд.
120. Bozadzhiev, O., Valchevski, I., Lalov, I. (2007) *Biometanation of distillery wastewater in an anaerobic baffled reactor system.*, *Bioautomation*, 8, 146-153.
121. Krzycki, J. A., Kenealy, W. R., DeNiro, M.J. and Zeikus, J. G. 1987, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2597.
122. Fuchs, G., Thauer, R., Ziegler, H., Stickeler, N. 1979, *Arch. Microbiol.*, 120, 135.
123. Zyakun, A.M., Bondar, V.A., Laurinavichus, K.S., Shipin, S.S., Belyaev, S.S, Ivanov, M.V. 1988, *Mikrobiol. Zh.*, 50, 16.
124. Gelwicks, J.T., Risatti, J.B., Hayes, J.M. 1994, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 467-472.
125. Ferry, J.G. 1997, *Biofactors*, 6, 25.



126. Games, L.M., Hayes, J.M., Gunsalus, R.P. 1978, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 42, 1295.
127. Belyaev, S.S., Wolkin, R., Kenealy, W.R., DeNiro, M.J., Epstein, S., Zeikus, J.G. 1983, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 691.
128. Balabane, M., Galimov, E., Hermann, M., Letolle, R. 1987, *Org. Geochem.*, 11, 115.
129. Kalyuzhnyi S.V., Fedorovich V.V. (1997) *Wat. Sci. Technol.*, 36, 201-208.
130. Kleinstreuer C., Poweigha T. (1982) *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1941-1951
131. Schön M. (2009) Numerical modeling of anaerobic digestion processes in agricultural biogas plant, DSc Thesis, Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, pp. 22-25, 32-34.
132. Simeonov I., Stoyanov S. (2003) *Chem. Biochem.Eng.Q.*, 17, 285-292.
133. Simeonov I., Queinnec I. (2006) *Control Engineering Practice*, 14, 799-810.
134. BRENDA – The Comprehensive Enzyme Information System, [http://www.brenda-enzymes.org/php/result\\_flat.php4?ecno=1.1.1.8](http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=1.1.1.8)
135. Stephenson M.P., Dawes E.A. (1971) *J. Gen. Microbiol.*, 69, 331-343.
136. Yankova S., Begova P., Beschkov V. (2010) In: *Proceedings from Linnaeus Eco-Tech'10*, Kalmar, Sweden, 960-964.
137. Näser K.-H. *Physikalisch-Chemische Rechenaufgaben*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig (1963), pp. 354-355(издание на български).
138. Bazaraa M.S., Sherali H.D., Shetty C.M. , *Nonlinear Programming, Theory and Algorithms*, John Wiley & Sons Inc., New York(1990).

**ТРУДОВЕ , ВКЛЮЧЕНИ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

- T1. V. Beschkov, T. Sapundzhiev, I. Angelov, Modelling of Biogas Production from Glycerol by Anaerobic Process in a Baffled Multi-Stage Digester , *Biotechnology & Biotechnological Equipment* (IF= 0.622), **26** (5),3244-3248 (2012).
- T2. V. Beschkov, I. Angelov, P. Petrova, Biogas Production from Glycerol in a Multistage Anaerobic Digester, *Current Topics in Biotechnology*, **7**, 61-69 (2012).
- T3. V. Beschkov, I. Angelov, P. Petrova, Biogas production from waste glycerol with inhibition from carboxylic acids, *Proc. Linnaeus Eco-Tech'10*, 22 -24 November, 2010, Kalmar (Sweden), pp. 584-591.
- T4. В. Бешков, Ив. Ангелов, Biogas production, *Научни трудове на УХТ-Пловдив*, том 58, свитък 2, 372-377 (2011).
- T5. Венко Бешков, Иван Ангелов, Получаване на биогаз, чрез оползотворяване на отпадъчен глицерол, *Научни трудове на Русенския университет*, том 50, серия 9.2, 55-58 (2011).

**ДОКЛАДИ НА НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ И СИМПОЗИУМИ:**

1. V. Beschkov, I. Angelov, P. Petrova, Biogas production from waste glycerol with inhibition from carboxylic acids, Proc. Linnaeus Eco-Tech'10, 22 -24 November, 2010, Kalmar (Sweden), pp. 584-591.
2. V. Beschkov, I. Angelov, P. Petrova, Biogas recovery from waste organic materials: a comparative experimental study, Proc. Seventh National Conference on Chemistry, International Conference on Green Technologies and Environmental Protection (7-O5), 26–29 May 2011, Sofia, Bulgaria, p. 70.
3. V. Beschkov, T. Sapundzhiev, I. Angelov, Modelling of Biogas Production from Glycerol by Anaerobic Process in a Baffled Multi-Stage Digester (4.2). International Conference on Mathematical Methods and Models in Biosciences, BIOMATH 2011, Sofia, June 2011, p.16.
4. Venko Beschkov and Ivan Angelov, Production of biogas and other products by utilizing waste glycerol, International Conference on Green Technologies for Environmental Rehabilitation, February 11-13, 2012, Haridwar, Uttarakhand, India. OP-38, p. 43.
5. V.N. Beschkov, I.K. Angelov, Production of biogas and other products by utilizing waste glycerol, 22<sup>nd</sup> International Symposium “Ecology&Safety-2013”, Sunny Beach, June 7/11, 2013, P16.

## ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ

***Венко Бешков, Иван Ангелов, Получаване на биогаз, чрез оползотворяване на отпадъчен глицерол, Научни трудове на русенския университет, том 50, серия 9.2, 55-58, 2011.***

Цитирана от:

- Z. Glavcheva-Laleva, St. Kerekov, D. Pavlov, Iv. Glavchev, Obtaining of Modifiers for Reduced Friction by Esterification of Waste Glycerol from Biodiesel Production and Syllfat 2, Chemical Engineering and Science, 2015, Vol. 3, No. 1, 1-6.

***V. Beschkov, T. Sapundzhiev, I. Angelov, Modelling of Biogas Production from Glycerol by Anaerobic Process in a Baffled Multi-Stage Digester, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 26 (5), 3244-3248 (2012).***

Цитирана от:

- Xu, J.H. , Chen, X.F. , Mu, L.L. , Zhang, H.B. , Bi, Y.F., Mesophilic anaerobic study on Chinese herbs residues of honeysuckle and midday tea, Advanced Materials Research, Volume 878, 2014, Pages 481-488.
- Cruz Kozani, Modelling the anaerobic methane production process: current developments and importance for an increased process flexibility, Institute of Biotechnology, Berlin University of Technology (2014).

