

Anaerobna kodigestija stajske gnojnice i kukuruzne silaže u pilot postrojenju

Stojić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:841147>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Marija Stojić

**ANAEROBNA KODIGESTIJA STAJSKJE GNOJNICE I KUKURUZNE SILAŽE
U PILOT POSTROJENJU**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij	Procesno inženjerstvo
Znanstveno područje:	Biotehničke znanosti
Znanstveno polje:	Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet:	Kemijski i biokemijski reaktori
Tema rada	je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2014./2015. održanoj 28. 4. 2015.
Mentor:	doc. dr. sc. <i>Marina Tišma</i>

Anaerobna kodigestija stajske gnojnice i kukuruzne silaže u pilot postrojenju

Marija Stojić, 260-DI

Sažetak:

Proces anaerobne digestije je jedan od najučinkovitijih mehanizama pretvorbe biomase u energiju. Osim energetske iskoristivosti, ovaj proces je i održiv i ekološki prihvatljiv. U ovome radu je istraživao utjecaj različitih omjera gnojovke, silaže i kukuruznog šrota na proces anaerobne kodigestije i prinos bioplina. Istraživan je utjecaj omjera supstrata u reakcijskoj smjesi (gnojovke, silaže, kukuruznog šrota) na pH i prinos bioplina.

Ključne riječi: anaerobna kodigestija, gnojovka, silaža, kukuruzni šrot

Rad sadrži: 40 stranica
13 slika
4 tablice
72 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | | |
|----|---|---------------|
| 1. | izv. prof. dr. sc. <i>Mirela Planinić</i> | predsjednik |
| 2. | doc. dr. sc. <i>Marina Tišma</i> | član-mentor |
| 3. | izv. prof. dr. sc. <i>Ana Bucić-Kojić</i> | član |
| 4. | doc. dr. sc. <i>Sandra Budžaki</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 16. srpnja 2015.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Subdepartment of Thermodynamics and Reaction Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program: Process engineering
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Chemical and Biochemical Reactors
Thesis subject: was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII. held on April 28, 2015.
Mentor: PhD, prof. Marina Tišma

Anaerobic digestion of cattle manure and corn silage in the pilot plant

Marija Stojić, 260-DI

Summary:

The process of anaerobic digestion is one of the most effective mechanisms of transformation of biomass into energy. In addition to energy efficiency, it is sustainable and eco-friendly.

The influence of different ratios of liquid manure, silage and corn scrap on the process of anaerobic codigestion and biogas yield was researched.

Effect of the substrate ration in the reaction mixture (manure, silage, corn scrap) on the pH and biogas yield was researched.

Key words: anaerobic co-digestion, cow manure, silage, corn scrap

Thesis contains: 40 pages
13 figures
4 tables
72 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | | |
|----|--|--------------|
| 1. | <i>Mirela Planinić</i> , associate prof. | chair person |
| 2. | <i>Marina Tišma</i> , PhD, prof. | supervisor |
| 3. | <i>Ana Bucić-Kojić</i> , associate prof. | member |
| 4. | <i>Sandra Budžaki</i> , PhD, prof. | stand-in |

Defense date: July 16, 2015

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Ovaj rad izrađen je u sklopu "ProBioTech" projekta koji je sufinancirala Europska unija iz Europskog Fonda za regionalni razvoj (EFRR)



Ulaganje u budućnost!
Europska unija

ZAHVALE

Zahvaljujem posebnom Prijatelju koji mi je omogućio ostvarenje ovoga sna.

Zahvaljujem svojim roditeljima na nesebičnoj ljubavi i žrtvi, bez vas ovo ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem svojoj sestri Ruži- Jeleni na pomoći i prijateljstvu, hvala što si se živcirala za mene 😊. Na svemu zahvaljujem bratu Zvonimiru i djedu Peri.

Zahvaljujem svim svojim kolegama, a posebno Ivi Mračić, Ivani Vrgoč, Mariji Blagović, Đinu, Andreji Bošnjak, Kristini Gligori, Marini Karimović i Minnie, Ignacu Zagorščaku...

Hvala i Malome Genijalcu.

Veliko hvala mentorici doc. dr sc. Marini Tišmi i ostalim profesorima, uzorima profesionalnosti, kolegijalnosti i ljudskosti.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1 KORIŠTENJE BIOPLINA	4
2.1.1 Zatvoreni ciklus proizvodnje bioplina	5
2.1.2 Parametri anaerobne digestije	6
2.1.2.1 Temperatura	6
2.1.2.2 pH vrijednost	6
2.1.3 Biopliniska postrojenja za poljoprivredna gospodarstva	7
2.2 FAZE ANAEROBNE DIGESTIJE	8
2.2.1 Hidroliza	10
2.2.2 Acidogeneza	11
2.2.3 Acetogeneza	11
2.2.4 Metanogeneza	11
2.3 SUPSTRAT ZA ANAEROBNU DIGESTIJU	12
2.3.1 Upotreba lignoceluloznog materijela u procesu proizvodnje bioplina	14
2.3.2 Svojstva lignoceluloznog materijala	14
2.4 METODE PREDOBRADE	16
2.4.1 Fizički predtretmani	16
2.4.1.1 Usitnjavanje	16
2.4.1.2 Parna eksplozija	17
2.4.1.3 Obrada tekućom vrelom vodom	17
2.4.1.4 Ekstruzija	17
2.4.2 Kemijske metode	18
2.4.2.1 Alkalni (bazični) predtretman	18
2.4.2.2 Kiselinški predtretman	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1 ZADATAK	21

3.2	MATERIJALI I METODE	21
3.2.1	Inokulum za anaerobnu kodigestiju	21
3.2.2	Supstrati za anaerobnu kodigestiju	21
3.2.3	Pokretanje procesa anaerobne kodigestije.....	21
3.2.4	Provođenje polukontinuiranog procesa anaerobne kodigestije	23
3.2.5	pH vrijednost i temperatura	23
3.2.6	Mjerenje volumnog protoka bioplina	24
3.2.7	Određivanje udjela vlage termogravimetrijskom metodom	24
4.	REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1	TEMPERATURA PROCESA	27
4.2	UTJECAJ DODATKA SILAŽE NA pH VRIJEDNOST I VOLUMEN NASTALOG BIOPLINA	27
4.3	UTJECAJ DODATKA KUKURUZNOG ŠROTA NA pH VRIJEDNOST I VOLUMNI PROTOK NASTALOG BIOPLINA	31
4.4	KUMULATIVNI VOLUMN BIOPLINA.....	32
5.	ZAKLJUČAK	33
6.	LITERATURA	35

Popis oznaka, kratica i simbola

PTF	Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
AD	Anaerobna digestija
HMF	Hidroksimetil furfural
HMK	Hlapive masne kiseline
VS	Hlapive tvari
TS	Ukupna suha tvar

1. UVOD

Anaerobna digestija (AD) je biološki proces u kojem se organska tvar razgrađuje asortimanom mikroba u uvjetima bez prisutnosti kisika pri čemu nastaje bioplin koji sadrži oko 50 – 75 % CH_4 i 25 – 50 % CO_2 (Chen i sur., 2010). U pogledu omjera proizvedene energije prema unosu energije (28/1), anaerobna digestija je učinkovitija metoda za proizvodnju energije iz biomase u odnosu na druge biološke i biokemijske procese konverzije (Fernandes i sur., 2009). Druga korist anaerobne digestije je redukcija prirodne emisije metana koja se događa vlastitom razgradnjom biomase u odlagalištima ili drugim otvorenim okruženjima. Naime, procijenjeni štetni utjecaj metana na globalno zatopljenje je 20 puta veći od ugljikovog dioksida (Rutz i sur., 2008). Anaerobnom digestijom metan se koristi za proizvodnju energije.

Kodigestija silaže, gnojnice (sa ili bez kukuruznog šrota) u različitim omjerima se može prikazati temeljem četiri faze anaerobne digestije što rezultira različitim količinama dobivenog bioplina. Faze anaerobne digestije su: hidroliza šećera, lipida i proteina, acidogeneza šećera i aminokiselina, acetogeneza dugolančanih masnih kiselina i hlapivih masnih kiselina i metanogeneza octene kiseline i vodika.

Faze AD se provode u nizu povezanih paralelnih koraka koji su međusobno zavisni. Slijedom koraka je omogućena potpuna pretvorba početnih nutrijenata do krajnjeg produkta metana pomoću različitih vrsta mikroorganizama u anaerobnim uvjetima. Cilj eksperimenta je bio istražiti utjecaj sastava reakcijske smjese (udio gnojnice, kukuruzovine i kukuruznog šrota) s ciljem maksimalne produkcije bioplina u reaktoru s mješalom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 KORIŠTENJE BIOPLINA

Prema Al Seadi i sur. (2008), bioplin je gorivi plin koji se može upotrebljavati u različite svrhe. Na farmama u kojima se proizvodi, najčešće se upotrebljava kao izvor toplinske energije ili uz kogeneraciju za dobivanje električne energije. Svrhu pronalazi još kao pogonsko gorivo u vozilima ili uz doradu i pročišćavanje se može uključiti u sustav postojeće mreže zemnog plina. Njemački institut za energetiku i okoliš tvrdi da se u bioplinu nalazi dovoljan energetska potencijal te se njime u potpunosti može zamjeniti ukupna proizvodnja zemnog plina (**Slika 1**).



Slika 1 Potencijalna europska mreža cjevovoda za bioplin (Al Seadi i sur., 2008)

Uz energetska učinkovitost, bitan je i podatak da bioplin za svoju proizvodnju treba manje vode od zemnog plina.

Rezultat anaerobne digestije je nastanak bioplina i digestata. Kada se za proces koristi mješavina više supstrata, postupak se naziva kodigestija. Ujedno je to i najčešći način dobivanja bioplina.

Proizvedeni bioplin se najčešće koristi za dobivanje toplinske energije i to direktnim izgaranjem i za proizvodnju električne energije kogeneracijom ili uz pomoć mikro i makro turbina i kao pogonsko gorivo.

Sastav bioplina ovisi o parametrima proizvodnje te izvoru supstrata. Energetska vrijednost bioplina potječe iz kemijskih veza sadržanih u metanu. Osim metana i ugljikovog dioksida, koji su količinski najbitniji produkti procesa anaerobne digestije, bioplin sadrži i vodenu paru, kisik, dušik, amonijak, vodik, sumporovodik (**Tablica 1**).

Tablica 1 Sastav bioplina (Al Seadi i sur., 2008)

Plinovi	Kemijski simbol	Udio (vol.-%)
metan	CH ₄	50-75
ugljikov dioksid	CO ₂	25-45
vodena para	H ₂ O	2 (20° C) – 7 (40 ° C)
kisik	O ₂	<2
dušik	N ₂	<2
amonijak	NH ₃	<1
vodik	H ₂	<1
sumporovodik	H ₂ S	<1

Energetska vrijednost bioplina ovisi o izvoru supstrata (**Tablica 2**).

Tablica 2 Produktivnost i sastav bioplina s obzirom na kemijski sastav supstrata (Al Seadi i sur., 2008)

Supstrat	Produktivnost bioplin [L plina / kg suhe tvari]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]
Bjelančevine	700	70 – 71	29 – 30
Masti	1 200 do 1 250	67 – 68	32 – 33
Ugljikohidrati	790 do 800	50	50

2.1.1 Zatvoreni ciklus proizvodnje bioplina

Proizvodnja bioplina predstavlja zatvoreni ciklus. Posebno je pogodan ekološki aspekt dobivanja toga energenta.

Postupkom digestije se smanjuje količina ugljikovih spojeva pri čemu se nastali metan koristi kao izvor energije, a ugljikov dioksid ispušta u atmosferu te ga vežu biljke sa sposobnošću

fotosinteze. U digestatu zaostaje udio ugljikovih spojeva te se iz tog razloga digestat može upotrebljavati kao potencijalno gnojivo bogato dušikom, fosforom, kalijem i ostalim elementima u tragovima. U usporedbi sa svježim stajskim gnojem, digestat ima bolja svojstva zbog svoje homogenosti i veće hranidbene vrijednosti. Predstavlja bolji omjer ugljika i dušika te mu je neugodan miris reducirao na minimum.

2.1.2 Parametri anaerobne digestije

Učinkovitost procesa anaerobne digestije ovisi o nekoliko ključnih čimbenika kao što su nutrijenti, temperatura, pH vrijednost, učinkovitost mješanja, geometrija reaktora (Al Seadi, 2008).

2.1.2.1 Temperatura

Najčešći raspon temperature za rast i razmnožavanje bakterija jest područje od 45 °C do 70 °C tj. većina bakterija spada u termofile. Mezofilnim bakterijama je nužno osigurati raspon temperature od 25 °C do 45 °C, a psihrofilnim bakterijama do 25 °C (Al Seadi, 2008).

U industrijskim postrojenjima se temperatura izabire ovisno o vrsti korištenog supstrata, a regulira se sustavima grijanja.

O temperaturi pri kojoj se proces vodi ovisi i inhibicijsko djelovanje amonijaka. Njegova toksičnost za sustav raste proporcionalno s temperaturom te se time otvara mogućnost reguliranja ukupnog procesa na nastanak inhibitora jer je samo djelovanje inhibitora reverzibilno. Prestankom uvjeta koji su prouzročili inhibiciju, sustav se vraća u prvotno stanje.

Temperaturu je važno održavati konstantom. Termofilne bakterije podnose temperaturne oscilacije od +/- jedan °C, dok je za mezofilne bakterije to područje malo šire i iznosi +/- 3 °C.

2.1.2.2 pH vrijednost

Kiselost cjelokupnog sustava u bioreaktoru ovisi o sastavu supstrata. pH najviše utječe na aktivnost i metabolizam metanogenih bakterija. Optimalno pH područje je u rasponu od pH 6,5 do 8,0 (Imamović, 2014).

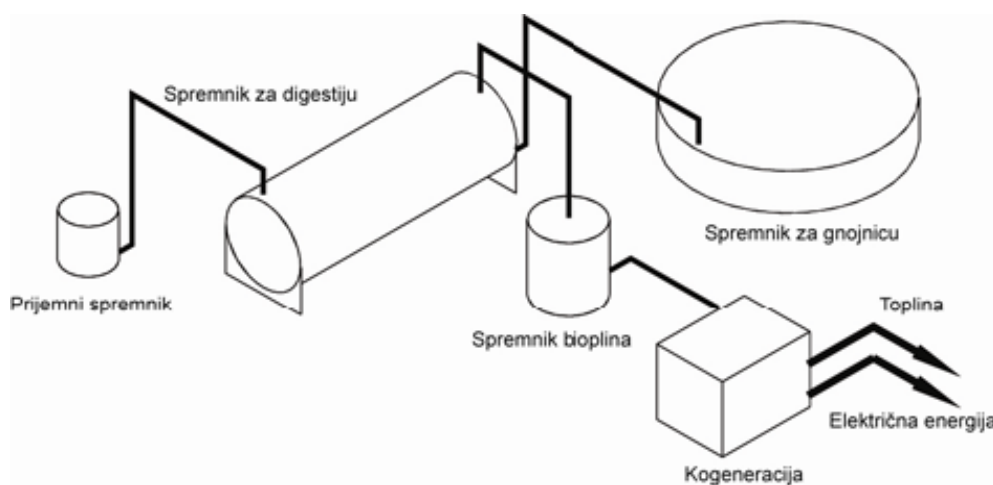
Metan može nastajati u području pH između 5,5 i 8,5, ali ima optimalni raspon od pH 7 do pH 8.

Ugljikov dioksid hidratacijom stvara ugljičnu kiselinu i topivost u vodi mu opada porastom temperature. Sniženje pH u sustavu mogu uzrokovati i hlapive masne kiseline (HMF), a amonijak nastao iz proteinskih dijelova supstrata povišuje pH sustava. Izvor amonijaka također može biti urin, te se u stajskoj gnojnici nalazi u povišenoj koncentraciji.

Ukupni pH unutar bioreaktora ovisi o parcijalnom tlaku ugljikovog dioksida i udjelu kiselih ili bazičnih spojeva.

2.1.3 Bioplinska postrojenja za poljoprivredna gospodarstva

Možemo reći da se bioplinska postrojenja za poljoprivredna gospodarstva baziraju na jednome principu rada: prikupljanje supstrata u predspremniku (sabirni spremnik) iz kojeg se supstrat sustavom pumpi dostavlja u fermentor funkcionalno osposobljen za skladištenje plinova, izgrađen od čelika ili betona i termički izoliran (**Slika 2**).



Slika 2 Princip rada bioplinskog postrojenja

Vrijeme retencije supstrata u digestoru iznosi od 20 do 40 dana.

Česti supstrati su i životinjski ekstremiteti. Jeftini su i lako dostupni, dobro se miješaju s drugim supstratima zbog visokog udjela vode, prirodno sadrže anaerobne bakterije.

Stupanj razgradivosti stajske gnojnice je 40 %, a svinjske 65 %. Razgradivost ovisi o vrsti sirovine, vremenu zadržavanja supstrata u digestoru i temperaturi.

Noviji trend u proizvodnji bioplina jest sadnja i korištenje usjeva isključivo u svrhu proizvodnje bioplina. Usjevi su energetske iskoristivosti od životinjskih ekstremiteta, ali zbog troškova rada i korištenja zemljišta postoje i veća ograničenja. Sadnjom usjeva iscrpljuje se zemljište te ono prestaje biti pogodno za proizvodnju namijenjenu prehrani ljudi, te se i zbog toga javljaju i moralne dvojbe oko dobivanja bioplina ovim načinom.

Fermentor

Fermentor je centralna jedinica postrojenja za proizvodnju bioplina. Može biti vertikalni ili horizontalni. Konstrukcijski mora ispuniti zahtjeve za primitak i skladištenje plina tj. mora biti nepropustan. Karakteriziraju ga sustav za punjenje sirovine te sustavi za izlaz bioplina i digestata. U velikoj većini slučajeva je i termoizoliran te sadrži mješalo.

Napravljen je od različitih materijala: betona, čelika, cigle, plastike te su oblikovani po potrebama. Veličina fermentora također varira. Može biti ukopan u zemlju ili se nalaziti iznad površine.

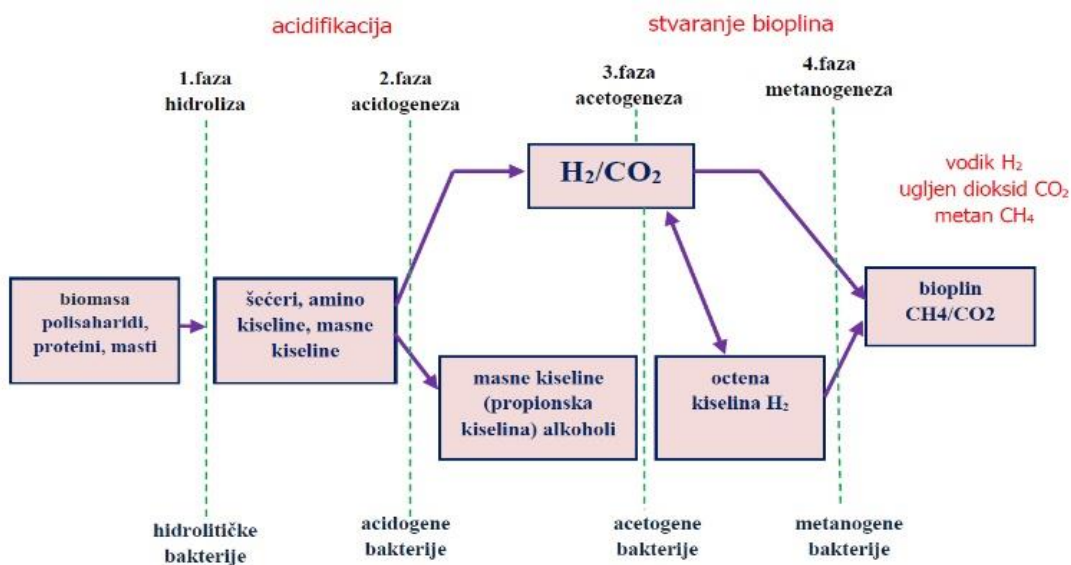
Vrstu fermentora određuje udio vode u sirovini za anaerobnu digestiju, suhi supstrat (do oko 20 % vlage) i mokri supstrat (od oko 20 % vlage) (Al Seadi i sur., 2008).

2.2 FAZE ANAEROBNE DIGESTIJE

Metan se AD proizvodi kao rezultat istovremenog provođenja četiri faze anaerobne razgradnje. Te faze se odvijaju različitim brzinama, tj. razgradnja celuloze, proteina i ugljikohidrata do krajnjih produkata AD se ne odvija jednako brzo. Hidroliza se opisuje kinetikom prvoga reda; acidogenezu, acetogenezu i metanogenezu opisuje Monodov kinetički model. Hidroliza je najsporija faza AD, ali zbog visoke osjetljivosti bakterija metanogeneze, upravo je ta završna faza ona koja limitira cjelokupan proces (Chen i sur., 2008).

Interakcije između različitih mikrobnih skupina su složene. Neravnoteža između bilo koje dvije skupine će utjecati na ukupnu brzinu reakcije ili čak uzrokovati nakupljanje inhibitora, što može dovesti do toga da cijeli proces AD bude neuspješan (Griffin, 1998).

Proces anaerobne digestije (AD) se može podijeliti u četiri koraka, kao što prikazuje **Slika 3**.



Slika 3 Shematski prikaz procesa anaerobne digestije

Neke bakterijske vrste koje sudjeluju u procesu anaerobne razgradnje prikazane su u **Tablici 3.**

Tablica 3 Prikaz nekih bakterija anaerobne digestije

	RED	PORODICA	ROD
ACIDOGENE BAKTERIJE	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i>
		<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>
		<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
METANOGENE BAKTERIJE	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanobrevibacter</i> <i>Methanosphaera</i> <i>Methanothermobacter</i>
		<i>Methanothermobacteriaceae</i>	<i>Methanothermobacter</i>
	<i>Methanococcales</i>	<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanococcus</i> <i>Methanothermobacter</i>
		<i>Methanocaldococcaceae</i>	<i>Methanocaldococcus</i> <i>Methanoterris</i>
	<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanomicrobium</i> <i>Methanoculleus</i> <i>Methanofollis</i> <i>Methanogenium</i> <i>Methanolacinia</i> <i>Methanoplanus</i>
		<i>Methanocorpusculaceae</i>	<i>Methanocorpusculum</i>
		<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanospirillum</i>

	<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i> <i>Methanococcoides</i> <i>Methanohalobium</i> <i>Methanohalophilus</i> <i>Methanolobus</i> <i>Methanomethylovorans</i> <i>Methanimicrococcus</i> <i>Methanosalsum</i>
		<i>Methanosaetaaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>

2.2.1 Hidroliza

Hidroliza je faza u kojoj se pomoću ekstracelularnih enzima fakultativnih anaerobnih bakterija razgrađuju složeniji lipidi, ugljikohidrati i proteini na jednostavnije, šećere, aminokiseline i masne kiseline, čime se direktno stvara supstrat za rast mikroorganizama sljedeće faze anaerobne digestije (Zheng i sur., 2014).

Jednadžbe 1 - 3 prikazuju transforaciju biopolimera na jednostavnije jedinice:

polisaharidi $\xrightarrow{\text{celulaze, celubiaze, amilaze, ksilanaze}}$ monosaharidi (1)

proteini $\xrightarrow{\text{protaze}}$ aminokiseline (2)

lipidi $\xrightarrow{\text{lipaze}}$ dugolančane masne kiseline, glicerol (3)

Djelovanjem fermentativnih bakterija supstrati nastali hidrolizom se razgrađuju na octenu kiselinu, vodik i ugljikov dioksid, koji se u metanogenezi transformiraju u metan i ugljikov dioksid (Li i sur., 2011). Manje razgradivi produkti hidrolize kao što su hlapive masne kiseline i alkoholi predstavljaju nutrijente za rast acetogenih bakterija. Acetogene i metanogene bakterije su međusobno u sintropijskoj korelaciji tj. za svoj rast koriste iste nutrijente (Hublin, 2012).

Brzina hidrolize ovisi o brojnim čimbenicima kao što su koncentracija biomase, svojstvima supstrata (površina, veličina čestica, oblik), proizvodnji enzima, adsorpciji (Parawira i sur., 2005; Boe, 2006). Brzina cjelokupnog procesa ovisi o brzini najsporijeg koraka, a u slučaju digestije stajске gnojnice, to je hidroliza (Vavilin i sur., 1996.; Vavilin i sur., 1997; Gunaseelan, 1997).

2.2.2 Acidogeneza

Spojevi nastali hidrolizom, jednostavniji šećeri, aminokiseline i masne kiseline se u fazi acidogeneze razgrađuju do octene kiseline, vodika i ugljikovog dioksida koji se mogu direktno pretvoriti u metan u fazi metanogeneze. Ostale produkte acidogeneze, kao što su hlapive masne kiseline (propionska, maslačna, octena) i alkoholi, metanogene bakterije ne mogu direktno koristiti u svome metabolizmu te se moraju dodatno oksidirati (Batstone i sur., 2000). Acidogeneza je općenito najbrža faza AD u tekućoj fazi. Produkti su octena kiselina (51%), vodik (19%) te više hlapive masne kiseline, alkoholi i mliječna kiselina (oko 30 %) (Boe, 2006).

Tablica 4 Produkti nastali acidogenezom glukoze (Hublin, 2012)

PRODUKT	REAKCIJA
ACIDOGENEZA	
OCTENA KISELINA	$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2O$
PROPIONSKA I OCTENA KISELINA	$3C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2 + 2H_2O$
MASLAČNA KISELINA	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$
MLIJEČNA KISELINA	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH$
ETANOL	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$

2.2.3 Acetogeneza

Acetogeneza je faza u kojoj se nastali produkti fermentacije, kao što su hlapive masne kiseline s brojem ugljikovih atoma višim od dva i alkoholi s više od jednog ugljikovog atoma, ne mogu direktno razgraditi u metan tijekom metanogeneze. Oni se u fazi acetogeneze oksidiraju do octene kiseline i vodika (Hublin, 2012).

2.2.4 Metanogeneza

Tijekom ove faze, obligatne anaerobne bakterije razgrađuju neke produkte fermentacije kao što su octena kiselina i vodik do metana i ugljikovog dioksida. Jedna vrsta bakterija razgrađuje octenu kiselinu u metan i ugljikov dioksid, a druga vrsta koristi vodik i ugljikov dioksid za proizvodnju metana (Zheng i sur., 2014). Većina metanogenih bakterija može proizvoditi

metan iz vodika i ugljikovog dioksida, a manji broj vrsta razgrađuje octenu kiselinu do metana (Boe, 2006), kako prikazuju **jednadžbe 4 i 5**:



Iz octene kiseline nastaje 70 % metana, a 30 % iz vodika i ugljikovog dioksida (Majcen, 2012).

Mnogi faktori utječu na rast metanogenih bakterija kao što su pH, temperatura, brzina unosa supstrata u reaktor (Majcen, 2012) i dr. Pri temperaturi manjoj od 20 °C metanogene bakterije nemaju veliku aktivnost, a pri temperaturama višim od 40 °C aktivnost bakterija je povoljna (Al Seadi i sur., 2008).

2.3 SUPSTRAT ZA ANAEROBNU DIGESTIJU

Sastav supstrata utječe na moguću prisutnost međuprodukata razgradnje koji mogu imati i inhibicijsko djelovanje kao što su furfural i HMF, te analogno tome na odabir procesnih parametara pri kojima će se proces anaerone digestije provoditi (pH, T). (Wilkie i sur., 2004).

Vrijednost supstrata za bioplini potencijal izražavamo preko KPK vrijednosti i odnosa hlapivih tvari u biomasi što je bitno jer ne može cijeli supstrat biti podložen biorazgradivosti u AD (Hublin, 2012). Primjer je lignin, koji ako se ne predobrađi ne može sudjelovati u procesu anaerobne digestije radi svojih strukturnih karakteristika. Samo ulazni materijal koji je moguće razgraditi u procesu nazivamo supstratom (Vivilin i sur., 2008; Lyberatos i sur., 1999).

Stajska gnojnica spada pod supstrate s masenim udjelom suhe tvari manje od 15 % koje nazivamo „mokrim supstratom“. U suprotnom, „suhi supstrati“ imaju maseni udio suhe tvari viši od 15 % (Zheng i sur., 2014).

Gnojovka, po svom kemijskom sastavu sadrži visok udio vode i nerazgradivih tvari. To posljedično daje niži prinos metana. Ovisno o vrsti životinja, stajska gnojnica u prosjeku daje 100 – 400 L/kg hlapive tvari (Hublin, 2012).

Ovisno o vrsti supstrata i kapacitetima reaktora, potrebno je optimirati unos organske tvari u reaktor (Wilkie i sur., 2004). Ako je unos prespor, tj. količine organske tvari su manje od optimalnih, proces proizvodnje bioplina će biti smanjen, a ukoliko je brzina unosa organske tvari prevelika, može doći do akumulacije hlapivih masnih kiselina, odnosno povećanja organskog opterećenja te se pH vrijednost sustava može smanjiti. Prevelika količina hlapivih masnih kiselina može negativno utjecati na metanogene bakterije. (Griffin i sur., 1998).

Izvor ugljika je direktno povezan s efektivnosti cijelog procesa, a na njega bitno utječu i ostale hranjive tvari izvori ugljika, vodika, dušika i kisika koji direktno grade stanice mikroorganizama. Sumpor, fosfor, kalij, kalcij i željezo su hranjive soli bitne za sintezu određenih proteina (enzima) (Galegenis i sur., 2007).

Elementi u tragovima su potrebni u malim količinama, dok nedostatak istih može ograničiti rast bakterija, a prevelika koncentracija uzrokuje inhibiciju procesa i toksična je za mikroorganizme (Al Seadi i sur., 2008).

Stabilnost temperature je nužna u procesu anaerobne digestije. Pri temperaturi nižoj od 20 °C metanogene bakterije sporije rastu te je smanjena i proizvodnja metana. Pri nižim temperaturama je sporija razgradnja organske tvari, tj. vrijeme zadržavanja supstrata u reaktoru se povećava. Pri višim temperaturama je proces efikasniji, odvija se brže, tj. vrijeme zadržavanja supstrata u reaktoru je kraće te je mogući unos veće količine biomase u digestor u jedinici vremena.

Povisuje se iskoristivost supstrata te je razgradnja bolja. Bakterije brže rastu, što znači povišenje brzine biokemijskih reakcije što rezultira učinkovitijom sintezom metana. Povišenjem temperature, dovodi se energija u sustav, difuzija je olakšana, viskoznost se smanjuje, a time i potreba za miješanjem (Wilkie i sur., 2004). Topivost organskih komponenata je bolja čime je pospješena biorazgradnja, tj. dostupnost supstrata za bakterije. (Mawson, 1994).

Nedostatak provedbe procesa pri višim temperaturama je taj što se povećava neravnoteža sustava te može doći do povećanja udjela nedisociranih hlapivih masnih kiselina čime se stvaraju povoljni uvjeti za nastanak inhibitora, primjerice amonijaka.

U industrijskom mjerilu, nedostatak provedbe procesa pri višim temperaturama je povišenje troškova vođenja procesa. To se može riješiti korištenjem proizvedene toplinske energije u sustavu kogeneracije za zagrijavanje reaktora (Galegenis i sur., 2007).

Svaka promjena temperature utječe negativno na ukupan proces te je bitno da se ona održava konstantom tijekom provedbe cijelog procesa. Mezofilne bakterije su osjetljive na promjene temperature od $\pm 3,0$ °C (Erguder i sur., 2001; Malaspina i sur., 1996).

2.3.1 Upotreba lignoceluloznog materijela u procesu proizvodnje bioplina

Lignoceluloza, kao što je poljoprivredni otpad i usjevi, široko je raspostranjen energetski resurs. Velike količine lignoceluloze se akumuliraju iz poljoprivrede, šumarstva, komunalnog otpada i drugih izvora. Lignoceluloznu biomasu uglavnom tvore tri polimera: celuloza, hemiceluloza i lignin. Ugljikohidratni dijelovi su podložni fermentaciji nakon hidrolize, pa je lignocelulozna sirovina prikladna za proizvodnju bioenergije. Međutim, svojstvene karakteristike sirove lignoceluloze, kao što su strukturne i kemijske karakteristike, čine ju otpornom na enzimatsku i mikrobnju razgradnju. (Zheng i sur., 2014).

Stoga je predobrada lignoceluloze nužna za postizanje visokih prinosa bioplina anaerobnom digestijom. Istražuje se veliki broj tehnika predtretmana u proteklih nekoliko desetljeća, koji uključuju fizičke, kemijske i biološke metode, ali ne postoji sistematska usporedba učinkovitosti svakog od njih.

2.3.2 Svojstva lignoceluloznog materijala

Celuloza je glavna komponenta staničnih zidova lignoceluloze. To je linearan polisaharidni polimer celobioze (disaharid glukoze) povezan β -1, 4 glikozidnim vezama. U celuloznim lancima su prisutne brojne hidroksilne grupe pa dolazi do formiranja i vodikovih veza u istom lancu ili sa susjednim lancima. Celulozni lanci su povezani vodikovim vezama i van der Waalsovima silama rezultira mikrovlaknima visoke čvrstoće (Ha i sur., 1998). Molekule celuloze imaju različite orijentacije uzduž struktura što dovodi do različitih stupnjeva kristalnosti. Tako se celuloza sastoji od dva područja, amornog (niska kristalnost) i kristalnog (visok stupanj kristalnosti) (Atalla i sur., 1984). Kristalnost celuloze se može karakterizirati indeksom kristaliniteta. Što je indeks kristaliniteta veći, to je razgradnja celuloze teža.

Također, mikrovlakna celuloze su međusobno povezana s hemicelulozom i/ili pektinom i prekrivena ligninom. Tako specijalizirana i posebna struktura čini celulozu otpornom na biološko i kemijsko djelovanje.

Za razliku od celuloze, hemiceluloza je amorfna, nasumična i razgranata heterogeni polisaharid različitih pentosa (ksiloza i arabinoza), heksoza (glukoza, galaktoza, manosa i/ili ramnoza) i kiselina (glukuronska, metil glukuronska i galakturonska kiselina). Kratki i razgranati lanci hemiceluloze pomažu u izgradnji mreže s celuloznim mikrovlaknima i u interakciji s ligninom, tvoreći matricu celuloza-hemiceluloza-lignin iznimno čvrstom. Amorfna i razgranata svojstva čine hemicelulozu osjetljivom na biološku, termalnu i kemijsku hidrolizu monomernih dijelova (Ademark i sur., 1998; Morohoshi i sur., 1991). Sadržaj vlage, pH i temperatura su kritični parametri u termo-kemijskoj hidrolizi hemiceluloze (Bobleter i sur., 1994; Fengel i sur., 1984; Garrote i sur. 1999).

Nakon celuloze, drugi u skupini najobilnijih spojeva u prirodi je lignin. To je veliki i kompleksni, aromatski hidrofolni heteropolimer i čine ga fenilpropanske jedinice kao što su koniferilni alkohol i sinapilni alkohol s hidroksilnim, metoksilnim i karbonilnim funkcionalnim skupinama (Stamatelatou i sur., 2012). Lignin igra ulogu cementa u umrežavanju celuloze i hemiceluloze i formira krutu trodimenzionalnu strukturu stanične stijenke (Palmqvist i sur., 2000). Također je netopiv u vodi i optički inertan. Dokazano je da se lignin razgrađuje u vodi pri visokim temperaturama (npr. 180 °C) ili kiselim/alkalnim uvjetima (Grabber, 2005). Ta svojstva ga čine najnepodatkijom komponentom biljne stanične stijenke, i što je viši udio lignina, veća je nepodatkost biomase na biološku i kemijsku degradaciju. Lignin je glavna prepreka za korištenje lignoceluloze u biokonverziskim procesima.

Svojstva lignocelulozne biomase čine ju otpornom na biorazgradnju. Zbog složenosti i različitosti kemijske strukture biomase, uvjeti i optimalne metode predobrade ovise o vrsti prisutne lignoceluloze. Otkriveno je da nekoliko strukturnih i sastavnih svojstava utječu na biorazgradivost lignocelulozne biomase, uključujući kristalnost celuloze, dostupnu površinu, stupanj polimerizacije celuloze, prisutnost lignina i hemiceluloze i stupanj acetilacije hemiceluloze (Hsu, 1996; Kim i sur., 2005; Kim i sur., 2006). Cilj predtretmana jest da promijeni ta svojstva da bi se poboljšali uvjeti za djelovanje enzima i mikroba.

Općenito, različite metode predtretmana utječu različito na ova svojstva, ali sve metode imaju veliki utjecaj na dostupnost površine lignoceluloze.

Povećanjem dostupne površine povećava se i prinos metana (Zheng i sur. 2014). Općenito se smanjenjem kristalnosti povećava prinos bioplina (Zheng i sur. 2014). Općenito, smanjenjem udjela lignina se prinos bioplina povećava (Fernandes i sur., 2009; Liew i sur. 2012).

Da bi se poboljšao prinos bioplina, predtretmanom se moraju razgraditi prirodno nepodobne ugljikohidrate - sastavnice lignina koje sprječavaju dostupnost celuloze i hemiceluloze enzimima i mikrobima (Cantarella i sur. 2004).

Razgradnjom organske tvari najviše metana nastaje iz lipida, a zatim iz proteina i ugljikohidrata. Ukupna suha tvar i topiva tvar predstavljaju kruti sadržaj otpadne biomase. Hlapive tvari obuhvaćaju frakcije biorazgradive hlapive tvari i nerazgradive hlapive tvari (Vieitez i sur., 1999). Biorazgradive hlapive tvari obuhvaćaju saharin, škrob, organske kiseline, celulozu, lipide i proteine. Nerazgradive hlapive tvari su sastavljene od lignina i drugih nerazgradivih supstanci. Obično, odnos VS (hlapive tvari) prema TS (ukupna suha tvar) se smatra organskim opterećenjem (Qiao i sur., 2011).

2.4 METODE PREDOBRADE

2.4.1 Fizički predtretmani

Fizički pretretmani se odnosi na metode koje ne koriste kemikalije ili mikroorganizme tijekom procesa predobrade.

2.4.1.1 Usitnjavanje

Usitnjavanje lignoceluloze se koristi za smanjenje veličine čestica i obično se primjenjuje u većini procesa proizvodnje biogoriva uz druge metode predobrade. Smanjenje veličine čestica biomase može promijeniti unutarnju strukturu lignocelulozne biomase, povećati dostupnu površinu, smanjiti kristalnost celuloze i smanjiti stupanj polimerizacije celuloze za poboljšanje digestije (Kratky i sur., 2011). Za usitnjavanje biomase se mogu koristiti strojevi za sjeckanje i brušenje, uključujući kugle, vibraciju, čekić, nož, prevrtanje, koloidne i abrazivne mlinove, kao i ekstrudere. Izbor stroja za usitnjavanje ovisi o udjelu vlage u sirovini.

2.4.1.2 Parna eksplozija

U ovoj se metodi čestice biomase griju sa zasićenom parom pri visokom tlaku u kratkom vremenu, nakon čega dolazi do brzog pada tlaka što uzrokuje eksplozivnu dekompresiju biomase. Ovi procesi se odvijaju pri temperaturama od 160 do 260 °C, tlakovima od 0,69 do 4,83 Mpa, te u vremenima od nekoliko sekundi do nekoliko minuta (Sun i sur., 2002). Predtretmanom organskim kiselinama koje se formiraju iz acetiilnih skupina, pospješuje se hidroliza hemiceluloze. Nadalje, voda, koja na visokim temperaturama ima neka kiselost svojstva, dodatno katalizira hidrolizu hemiceluloze (Weil i sur., 1997). Prema tome, degradacija reducirajućih šećera se može dogoditi tijekom parne eksplozije pri kiselim uvjetima (Cantarella i sur., 2004; Garcia-Aparicio i sur., 2006). Parna eksplozija je jedan od najučestalijih predtretmana lignocelulozne biomase (Zheng i sur., 2014).

2.4.1.3 Obrada tekućom vrelom vodom

Predtretman tekućom vrelom vodom je jedna od metoda koja ne zahtjeva dodatak kemikalija i koristi se u industriji za obradu tkanina i za proizvodnju bioetanol. U predtretmanu tekućom vrelom vodom (Brandon i sur., 2008; Dien i sur., 2006; Negro i sur., 2003; Rogalinski i sur., 2008), biomasa se kuha u vodi pri visokim temperaturama i tlaku. Tijekom predtretmana, voda može prodrijeti u staničnu strukturu biomase, hidrirajući celulozu, otapajući hemicelulozu i razgrađujući male količine lignina. Predtretmanom vrelom tekućom povećava se dostupnost i osjetljivost celuloze te njezina dostupnost za hidrolizu. (VanWalsum i sur., 1996). Postoje brojna istraživanja ovog načina predobrade u svrhu daljnje upotrebe u proizvodnji bioplina, kao što je predobradba stabljike suncokreta (Monlau i sur., 2012), šećerne trske (Badshah i sur., 2012), *Miscanthus* i trave (Li i sur., 2012), papira (Teghammar i sur., 2010) i mikroalgi (Gonzales-Fernandez i sur., 2013).

2.4.1.4 Ekstruzija

Ekstruzija je proces koji kombinira više jediničnih operacija. Sirovina, kao što je stočna hrana, se stavlja u ekstruder i transportira uzduž cijevi pomoću dovodnog vijka. Kako se materijal kreće uzduž cijevi, podvrgava se trenju te se zagrijava, miješa i smiče (VanWalsum i sur., 1996). Proces se može modificirati promjenom dizajna vijka (Monlau i sur., 2012). U sredini cijevi se nalazi zona kompresije, a na kraju cijevi je zona ekspanzije. To rezultira značajnom abrazijom materijala u točki otpuštanja tlaka, gdje dolazi do razbijanja strukturnih elemenata materijala.

Ekstruzija uzrokuje depolimerizaciju celuloze, hemiceluloze, lignina i proteina (Camire i sur., 1998; Bernatoviciute i sur., 2008; Karunanithy i sur., 2010). Nadalje, ovisno o intenzitetu uključenog stresa, može također uzrokovati toplinsku degradaciju šećera i aminokiselina.

Sam proces ekstruzije ovisi o vrsti biomase.

2.4.2 Kemijske metode

Kemijska predobrada podrazumijeva korištenje kemikalija, kao što su kiseline, baze i ionske tekućine radi promjene fizikalnih i kemijskih svojstava lignoceluloze. Mnoge metode se proučavaju za upotrebu u proizvodnji etanola, ali za proces AD u proizvodnji bioplina nisu toliko učestale.

2.4.2.1 Alkalni (bazični) predtretman

Alkalna predobrada podrazumijeva upotrebu NaOH, KOH, Ca(OH)_2 , NH_3 , za razgradnju lignina, hemiceluloze i/ili celuloze. Alkalna predobrada uzrokuje povećanja unutrašnje površine, smanjenje stupnja polimerizacije i kristalnosti, cijepanje strukturnih veza između lignina i ugljikohidrata (celuloza i hemiceluloza) i narušavanje strukture lignina. Nadalje, alkalni predtretman smanjuje stupanj inhibicije tijekom metanske fermentacije i osigurava niže troškove proizvodnje u odnosu na druge metode predobrade (Pang i sur., 2008; Fan i sur., 1987; Kumar i sur., 2009). Posebno je značajna obrada s NaOH i nakon toga dodatak istog u proces. pH u procesu anaerobne digestije ovisi o udjelu ugljikovog dioksida pa se stabilnost povećava dodavanjem alkalnog sadržaja u proces. (Chandra i sur., 2012).

2.4.2.2 Kiselinski predtretman

Za kiselinski predtretman koriste se koncentrirane kiselinu pri niskim temperaturama, ili razrijeđene kiselinu pri visokim temperaturama. od razrijeđenih kiselina najčešće sekoriste sumporna, nitratna, dušična, klorovodična, octena i jabučna kiselina, s time da je korištenje sumporne kiseline najučestalije.

Iako je koncentrirana kiselina vrlo učinkovita u procesu hidrolize, ona je otrovna, korozivna i opasna, zahtjeva specijalizirane materijale kao što su nemetalni materijali ili legure za konstrukciju reaktora. Nadalje, kiselina se mora prikupiti nakon tretmana biomase, što je

ekonomski vrlo neisplativ proces. Prema tome, razrijeđena kiselina ima prednost na odnosu na koncentriranu u predobradi lignoceluloze.

Ovim načinom predobrade moguće je u potpunosti razgraditi hemicelulozu, a lignin djelomično. Glavni cilj kiselinske predobrade je povećanje dostupnosti celuloze na mikrobno i enzimatsko djelovanje (Zheng i sur.,2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 ZADATAK

Cilj ovoga diplomskog rada bio je provesti proces anaerobne kodigestije stajske gnojnice i kukuruzne silaže u pilot postrojenju.

3.2 MATERIJALI I METODE

Proces anaerobne kodigestije proveden je u pilot postrojenju Centra za Ekotehnologije (Brodarski institut d.o.o., Zagreb), smještenom u tvrtki Bovis d.o.o. koja je članica Osatina grupe d.o.o. (Ivankovo, Hrvatska).

3.2.1 Inokulum za anaerobnu kodigestiju

Kao inokulum za postizanje metanogenih uvjeta u procesu anaerobne kodigestije korišten je digestat iz glavnog fermentora industrijskog procesa anaerobne kodigestije tvrtke Bovis d.o.o. (Ivankovo, Hrvatska).

3.2.2 Supstrati za anaerobnu kodigestiju

Kao tekući supstrati za proces anaerobne kodigestije korišteni su:

- goveđa gnojovka (sabirna jama, Bovis d.o.o., Ivankovo, Hrvatska)
- digestat iz postfermentora (Bovis d.o.o., Ivankovo, Hrvatska) koji je služio za razrjeđivanje supstrata do odgovarajućeg udjela suhe tvari za provođenje procesa anaerobne kodigestije

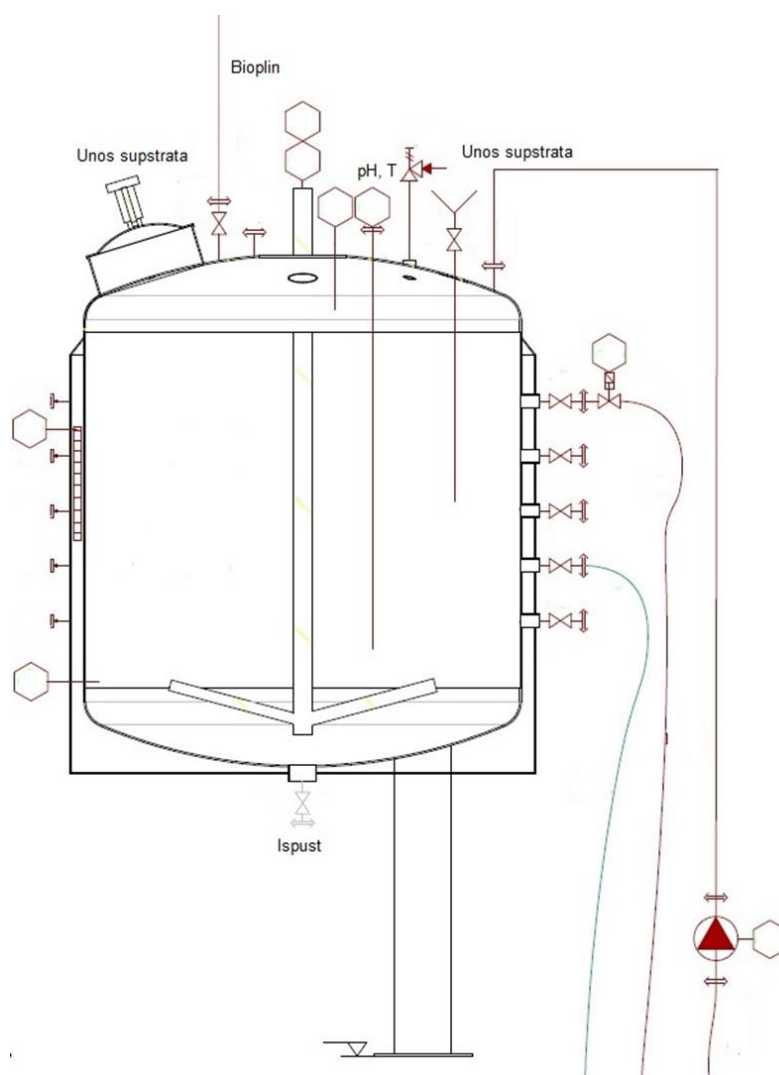
Kao kruti supstrati za proces anaerobne kodigestije korišteni su:

- kukuruzna silaža (Bovis d.o.o., Ivankovo, Hrvatska)
- kukuruzni šrot (Bovis d.o.o., Ivankovo, Hrvatska)

3.2.3 Pokretanje procesa anaerobne kodigestije

Proces anaerobne kodigestije provodio se polukontinuirano u reaktoru s mješalom radnog volumena 300 L (**Slika 4**). U reaktor je postavljena sonda za praćenje temperature i pH

vrijednosti koja je prethodno kalibrirana. Kroz glavni otvor za unos supstrata u reaktor je dodano 185 L digestata iz glavnog fermentora industrijskog procesa proizvodnje bioplina tvrtke „Bovis d.o.o.“ koji je služio kao inokulum kako bi se ubrzao proces postizanja metanogenih uvjeta. U smjesu inokuluma s postignutim metanogenim uvjetima dodano je 7,5 L svježeg gnojovke iz sabirne jame i 7,5 L digestata iz postfermentora. Smjesa tekućih supstrata u reaktoru homogenizirana je pomoću mješala te je uključena automatska regulacija temperature na 37 °C. Smjesi supstrata u reaktor je prilikom homogenizacije dodano 2,5 kg kukuruznog šrota (Bovis d.o.o., Ivankovo). Nakon homogenizacije, kada je postignuta željena temperatura od 37 °C zabilježeno je stanje na brojaču protoka bioplina te je otvoren glavni ventil za odvod bioplina na reaktoru. Glavni otvor za dodavanje supstrata na reaktoru bio je zatvoren s ciljem postizanja anaerobnih uvjeta. Reakcija smjesa kontinuirano je miješana.



Slika 4 Shematski prikaz bioreaktora

3.2.4 Provođenje polukontinuiranog procesa anaerobne kodigestije

Proces anaerobne kodigestije trajao je 30 dana. Svakodnevno su praćeni procesni parametri (pH vrijednost, temperatura i volumni protok nastalog bioplina). Sukladno očitanim procesnim parametrima kroz otvor za dotok supstrata na vrhu reaktora dodavala se smjesa supstrata, a preko ventila za odvod digestata na dnu reaktora ispuštan je digestat u istoj količini u kojoj je dodana smjesa supstrata.

3.2.5 pH vrijednost i temperatura

Prije početka procesa anaerobne kodigestije u reaktor je postavljena prethodno kalibrirana sonda za mjerenje pH vrijednosti i temperature (Hach Lange, Düsseldorf, Njemačka).

Za praćenje parametara pH vrijednost i temperature u reaktoru korištena je pH/ORP procesna sonda (Hach-Lange, Njemačka). To je posebna sonda koja kontinuirano tijekom procesa u reaktoru mjeri vrijednosti pH i temperature te je putem PLC sustava povezana s upravljačkim programom pilot postrojenja. Na taj način bilježene su vrijednosti navedenih parametara tijekom čitavog trajanja procesa. Sondu je prije svakog pokretanja procesa potrebno kalibrirati. Kalibracija se obavlja u dvije točke pomoću pufera poznatih pH vrijednosti. Za potrebe procesa AD kukuruzovine i gnojnice, pH sonda je kalibrirana pomoću pufera pH = 4,00 i pufera pH = 7,00.



Slika 5 pH / ORP procesna sonda

3.2.6 Mjerenje volumnog protoka bioplina

Volumen nastalog bioplina svakodnevno je očitavan na brojaču protoka TG 05 Model 5 (Ritter GmbH, Schwabmünchen, Njemačka) (Slika 6).



Slika 6 Mjerač protoka bioplina TG 05 Model 5
(Ritter GmbH, Schwabmünchen, Njemačka)

Ritter mjerači protoka plina, bubnjastog tipa, imaju općenitu primjenu za mjerenje volumena protoka plina i posebno su učinkoviti kada mjerenja zahtjeva najvišu preciznost.

Princip mjerenja Ritter mjerača protoka se bazira na dispoziciji fluida. Tok plina uzrokuje rotaciju mjernog kućišta u kojem se nalazi tekućina (najčešće voda ili ulje niskog viskoziteta). Mjerno kućište mjeri volumen plina periodično puneći i prazneći čvrste mjerne komore.

3.2.7 Određivanje udjela vlage termogravimetrijskom metodom

Udio vlage u uzorcima određen je termogravimetrijskom metodom. U prethodno osušenu (105 °C / 1 h), u eksikatoru ohlađenu i odvagano aluminijsku posudicu s poklopcem, izvagano je 25 g ($\pm 0,0001$ mg) uzorka. Posuda s uzorkom prethodno je zagrijana na 105 °C te stavljena u sušionik s koso postavljenim poklopcem. Nakon 4 h sušenja, uzorak je stavljen u eksikator na hlađenje te izvagan nakon hlađenja kroz jedan sat. Ponovno je stavljen u sušionik kroz jedan sat, ohlađen i izvagan na analitičkoj vagi. Postupak je ponavljan do postizanja konstantne mase.

Udio vlage izračunat je prema sljedećoj **formuli (6)**:

$$w = \frac{b-a}{b} \cdot 100 (\%) \quad (6)$$

gdje su:

a – masa uzorka nakon sušenja (g),

b – masa uzorka prije sušenja (g),

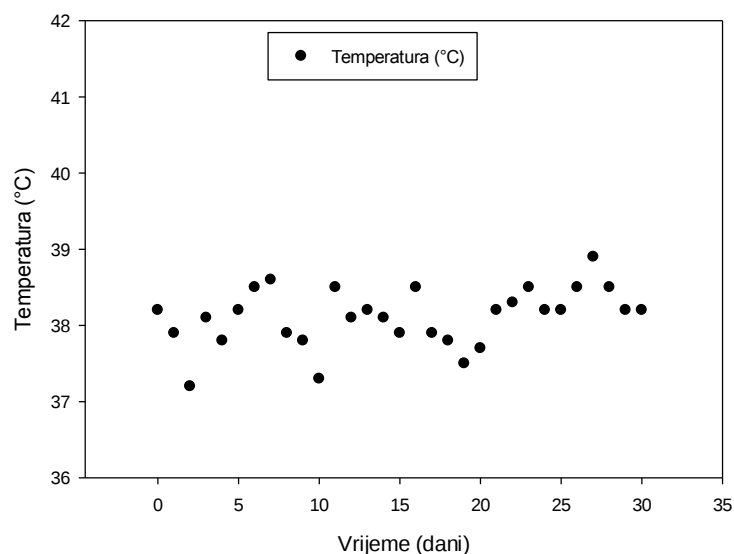
w – udio vlage u uzorku (%).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom procesa anerobne kodigestije proizvodnje bioplina svakodnevno su praćeni procesni parametri (pH vrijednost, temperatura i volumni protok nastalog bioplina). U uzorcima supstrata koji su dodavani u reaktor te digestata koji je ispuštan iz reaktora određen je udio suhe tvari. Rezultati su prikazani grafički.

4.1 TEMPERATURA PROCESA

Sustav je tijekom procesa pokazivao blage temperaturne oscilacije od cca ± 2 °C (**Slika 7**). Bioreaktor je imao ugrađen sustav automatske regulacije temperature. Mezofilne bakterije korištene za produkciju bioplina podnose temperaturne oscilacije od oko ± 3 °C pa blage oscilacije nisu utjecale na produkciju bioplina. Najniža temperatura je iznosila 37,2 °C, a najviša 38,9 °C.



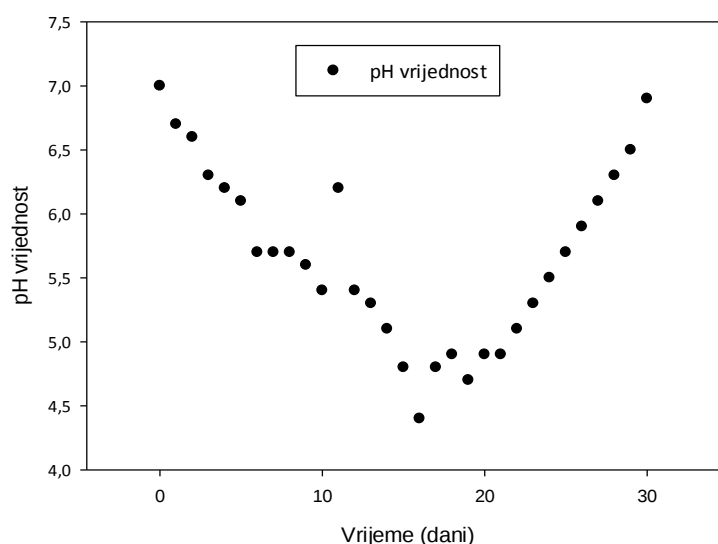
Slika 7 Temperaturne oscilacije tijekom procesa anaerobne digestije

4.2 UTJECAJ DODATKA SILAŽE NA pH VRIJEDNOST I VOLUMEN NASTALOG BIOPLINA

U kodigestiji biljnih materijala (silaže) i gnojnice, gnojnica osigurava puferski kapacitet i širok raspon hranjivih tvari (nutrijenata), dok dodatak biljnih materijala s visokim udjelom ugljika balansira odnos ugljika i dušika (C/N) u sirovini, čime se smanjuje rizik inhibicije amonijakom.

Pozitivni učinci sinergije se često vide u kodigestiji, zbog balansiranja nekoliko parametara u mješavini kosupstrata te oni pripomažu višem prinosu metana (Lehtoämkki i sur., 2006). Samim postupkom siliranja se može spriječiti razgradnju celuloze do glukoze i na taj način se šećeri topivi u vodi mogu zadržati u kukuruzovini, što za rezultat ima olakšanu proizvodnju bioplina. Udio i sastav šećera ovisi o metodama siliranja (Wang i sur., 2012). Primarna zadaća siliranja je smanjenje skladišnog prostora, ali kao nuspojavu ima pozitivne efekte na zadržavanje hranjivih tvari. Općenito, u supstratima s vlaknastim materijalima slabe topivosti s visokim sadržajem suhe tvari (40 – 50 % ukupne suhe tvari) kao što je stajska gnojnica, dolazi do niske produktivnosti bioplina. Zbog toga je teško voditi postrojenje za bioplin a da je ekonomski isplativo. Rješenja se traže u strategijama kodigestije i predtretmanima supstrata da bi se poboljšala razgradivost biomaterijala i prema tome, povećao prinos bioplina (Castrillón i sur., 2011).

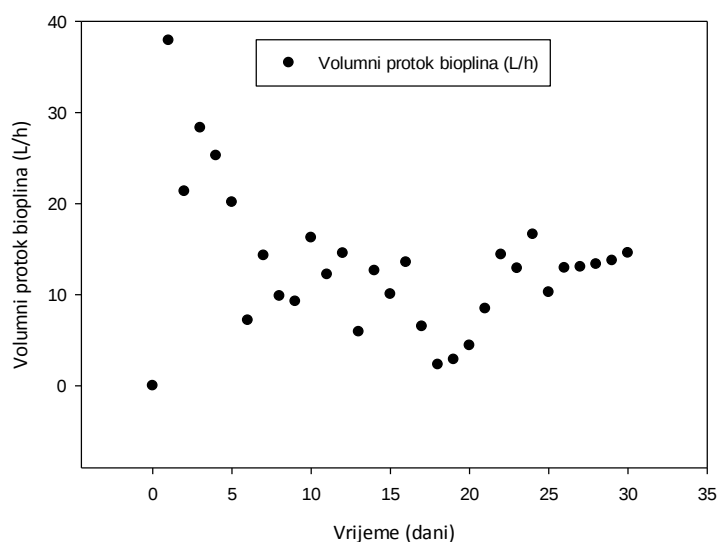
Na **Slici 8** grafički su prikazane zabilježene pH vrijednosti tijekom provedbe procesa anaerobne kodigestije. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da tijekom procesa pH vrijednost nije bila konstantna u rasponu od 6,8 do 8,2 (Chandra i sur., 2012), što su optimalne vrijednosti za proces anaerobne kodigestije.



Slika 8 Promjena pH vrijednosti tijekom procesa anaerobne kodigestije

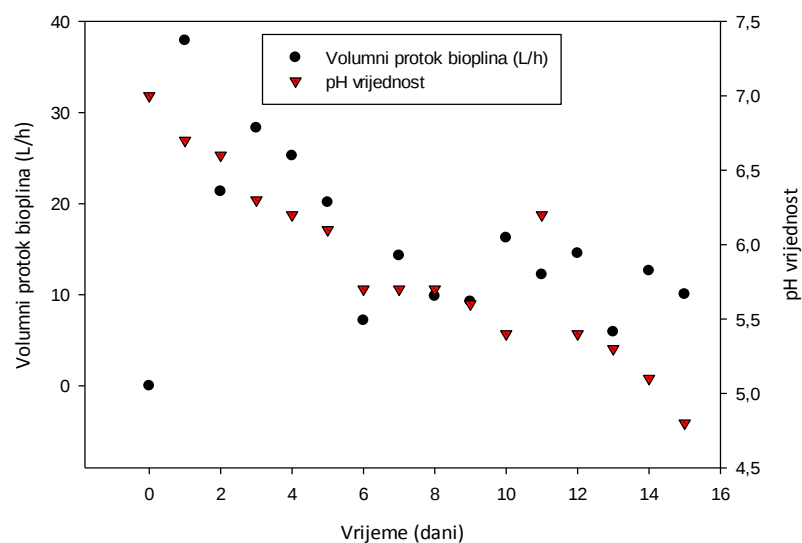
Tijekom prvih 15 dana procesa zbog dodavanja silaže i gnojnice u omjeru koji je predstavljao veće organsko opterećenje procesa došlo je do smanjenja pH vrijednosti s početnih pH 7,0 na pH 4,8 koji je postignut petnaestog dana procesa.

U drugom dijelu eksperimenta s ciljem postizanja neutralnog pH, promijenjen je omjer supstrata kruto – tekuće čime se smanjilo organsko opterećenje. Iz rezultata prikazanih na **Slici 5** vidljivo je da je pH vrijednost porasla sa pH 4,8 (16. dan procesa) na pH 6,9 (30. dan procesa). **Slika 9** grafički prikazuje volumni protok nastalog bioplina izražen u L/h. Iz rezultata je vidljivo da je volumni protok bioplina varirao tijekom 30 dana procesa što se može povezati sa nestabilnim pH vrijednostima budući da su optimalne pH vrijednosti pri kojima nastaje najveća količina bioplina između 6,8 i 8,2. (Chandra i sur., 2012).



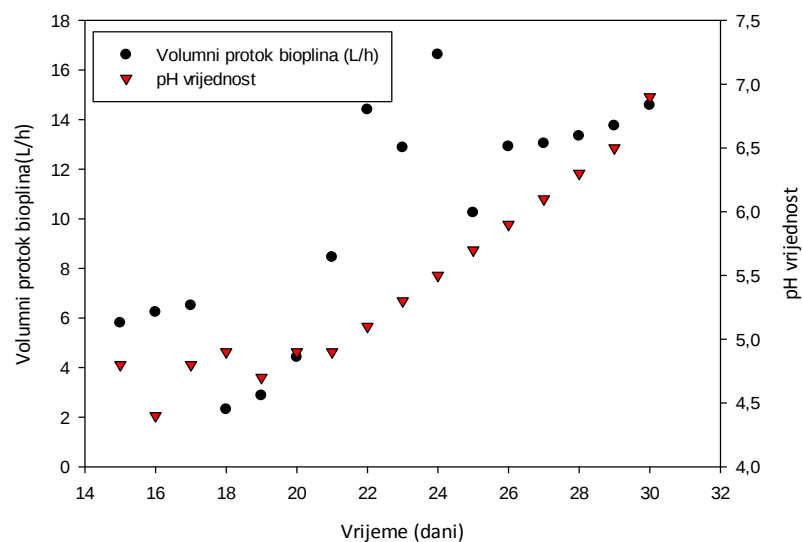
Slika 9 Volumni protok nastalog bioplina

Tijekom prvih 15 dana procesa anaerobne kodigestije nepravilan omjer kukuruzne silaže i goveđe gnojovke koji je dodavan u reaktor, odnosno preveliko organsko opterećenje, rezultiralo je smanjenjem pH vrijednosti. Na **Slici 10** grafički je prikazan odnos pH vrijednosti i volumnog protoka bioplina za prvih 15 dana procesa.



Slika 10 Odnos pH vrijednosti i volumnog protoka bioplina tijekom prvih petnaest dana anaerobne digestije

U periodu od petnaestog do tridesetog dana procesa anaerobne kodigestije smanjenje organskog opterećenja uzrokovalo je povišenje pH vrijednosti. Porastom pH vrijednosti došlo je do povećanja volumnog protoka bioplina što je vidljivo na **Slici 11**.

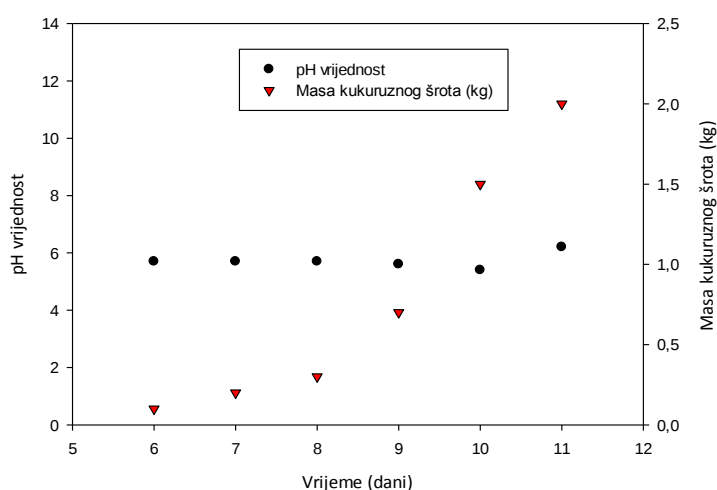


Slika 11 Odnos pH vrijednosti i volumnog protoka bioplina tijekom drugih petnaest dana anaerobne digestije

4.3 UTJECAJ DODATKA KUKURUZNOG ŠROTA NA pH VRIJEDNOST I VOLUMNI PROTOK NASTALOG BIOPLINA

Stajska gnojnica sadrži topive i netopive organske tvari (Parawia i sur., 2005.) i radi svoga sastava nije lako razgradiva (Vavilin i sur., 1996) u anaerobnim uvjetima. Kodigestijom gnojnice s kukuruznim šrotom povećava se prinos bioplina jer kukuruzni šrot sadrži dodatne nutrijente za rast anaerobnih bakterija. Prinos je veći nego kad se upotrebljava monosupstrat. Glavni izvor metana u supstratu su šećeri i male molekule. U biljnim supstratima koji su po kemijskom sastavu lignocelulozni supstrati, ove male molekule potječu od razgrađenog škroba, celuloze i hemiceluloze. Škrob (α -1,4-glikozidnom vezom povezane jedinice D-glukoze) se relativno brzo cijepa tj. razgrađuje, za razliku od celuloze i hemiceluloze (Montgomerery i sur., 2014). Upravo je šrot sirovina na bazi škroba. Također, kodigestija stajske gnojnice s kukuruzovinom daje prikladniji C/N omjer i uravnotežuje nutrijente. Nadalje, pokazano je da alkalnost stajske gnojnice iznosi $4,2 \text{ g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, pa može povećati puferski kapacitet digestata i spriječiti smanjenje pH tijekom digestije (Xiujin i sur., 2009).

U periodu od šestog do jedanaestog dana procesa anaerobne kodigestije ispitan je utjecaj dodatka kukuruznog šrota na pH vrijednost. Dodatak kukuruznog šrota u svim ispitanim koncentracijama nije utjecao na promjenu pH vrijednosti (**Slika 12**).



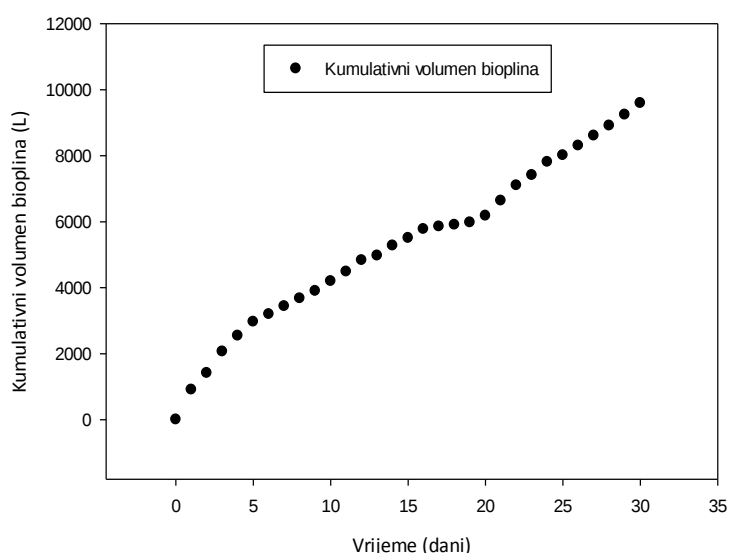
Slika 12 Utjecaj kukuruznog šrota na pH vrijednost procesa anaerobne kodigestije

Utjecaj dodatka šrota ispitan je i na prinos bioplina s ciljem dokazivanja povećanja prinosa bioplina. Ovi pokusi provedeni su u periodu od osmog do jedanaestog dana procesa. Na **Slici 12** grafički je prikazan utjecaj dodatka kukuruznog šrota kao supstrata bogatog ugljikohidratima na volumen nastalog bioplina. Iz rezultata je vidljivo da se povećanjem mase kukuruznog šrota od 300 g do 2,0 kg povećava volumni protok bioplina sa 9,25 L/h na 16,25 L/h.

4.4 KUMULATIVNI VOLUMEN BIOPLINA

Tijekom 30 dana, koliko je proces trajao, kumulativni volumen bioplina je imao konstantan rast (**Slika 13**). Sukladno s prethodnim rezultatima, u periodu od prvih 15 dana, kumulativni volumen bioplina je imao nešto niži porast. Oscilacije pH vrijednosti su, uslijed previsokog organskog opterećenja, uzrokovale smanjenu efikasnost procesa proizvodnje bioplina.

Nakon promjene recepture procesa, tj. primjene povoljnijeg omjera krute i tekuće sirovine (smanjenje udjela silaže i povećanje udjela šrota), pH vrijednost se približavala neutralnoj i time su se stvorili povoljniji uvjeti za metanogene bakterije te se i prinos bioplina sukladno tome povećavao.



Slika 13 Prinos kumulativnog volumena bioplina

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Temperatura je tijekom procesa bila relativno konstantna. Bioreaktor je imao automatsku regulaciju temperature postavljenu na 37 °C te ona u procesu nije varirala više od +/- 2 °C. Taj raspon temperature pogoduje mezofilnim bakterijama za optimalnu aktivnost.
2. Omjer gnojnice i silaže direktno utječe na pH vrijednost sustava.
Silaža balansira omjer C/N u sustavu te sprečava povišenje pH, ali dodana u prevelikoj količini u odnosu na gnojnicu može uzrokovati pad pH u sustavu.
Nakon smanjenja udjela silaže (do 16. dana procesa), pH sustava se normalizirao i posljedično se stvorila povoljna klima za aktivnost mikroorganizama i proizvodnju bioplina.
3. Kukuruzni šrot je sirovina na bazi škroba koja se zbog svog kemijskog sastava relativno brzo razgrađuje tj. lako je dostupna bakterijama anaerobne digestije.
Prinos bioplina u direktnom je odnosu sa količinom dodanog kukuruznog šrota.
pH vrijednost sustava se nije mijenjala dodatkom šrota u različitim koncentracijama.
4. Tijekom trajanja procesa, kumulativni volumen bioplina je bilježio konstantni rast.
Prinos bioplina je bio viši u periodu od 16. dana trajanja pokusa jer su se stabilizirali parametri procesa i stvorila se povoljna klima za aktivnost metanogenih bakterija te proizvodnju bioplina.

6. LITERATURA

- Ademark P, Varga A, Medve J, Harjunpaa V, Drakenberg T, Tjerneld F: Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a beta-mannanase.. *Biotechnology* 63:199-210, 1998.
- Álvarez JA, Otero L, Lema JM: A methodology for optimising feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. *Bioresource Technology* 101:1153-1158, 2010.
- Al Seadi T, Rutz D, Prassl H, Kottner M, Finsterwalder T, Volk S, Janssen R: *Priručnik za bioplin*, Energetski institut Hrvoje Požar, Zagreb, 2009.
- Atalla RH, Van der Hart DL: Native cellulose. A composite of two distinct crystalline forms. *Science* 223:283-285, 1984.
- Badshah M, Lam DM, Liu J, Mattiasson B: Use of an automatic methane potential test system for evaluating the biomethane potential of sugarcane bagasse after different treatments. *Bioresource Technology* 114:262-269, 2012.
- Batstone DJ, Keller J, Newell RB, Newland M: Modelling anaerobic degradation of complex wastewater. *Bioresource Technology* 75: 67-74, 2000.
- Bernatoviciute R, Juodeikiene G: Effect of some extrusion variables on the swelling properties of rye extrudates. U *Proceedings of the 4th international congress on flour-bread 2007*, str 411-417, 2007.
- Bobleter O: Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science* 19:797-841, 1994.
- Boe K: Online monitoring and control of the biogas process. *Doktorska disertacija*, Institute of Environment & Resources, Technical University of Denmark, Lyngby, 2006.
- Brandon SK, Eiteman MA, Patel K, Richbourg MM, Miller DJ, Anderson WF: Hydrolysis of Tifton 85 bermudagrass in a pressurized batch hot water reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83:505-512, 2008.
- Camire ME: Chemical changes during extrusion cooking: recent advances: U Shahidi F, Ho C-T, van Chuyen N: *Process-induced chemical changes in food*, str. 109-21. Plenum Press, New York, 1998.
- Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, Spera A, Alfani F: Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. *Biotechnology Progress* 20:200-206, 2004.
- Castrillón L, Fernández-Nava Y, Ormaechea P, Marañón E: Optimization of biogas production from cattle manure by pre-treatment with ultrasound and co-digestion with crude glycerin. *Bioresource Technology* 102:7845-7849, 2011.
- Chandra R, Takeuchi H, Hasegawa T, Kumar R: Improving biodegradability and biogas production of wheat straw substrates using sodium hydroxide and hydrothermal pretreatments. *Energy* 43:273-281, 2012.

- Chang YK, El-Dash AA: Extrusion-cooking of cassava starch as a pretreatment for its simultaneous saccharification and fermentation for ethanol production. *Acta Alimentaria* 32:219-235, 2003.
- Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS: Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99:4044-4064, 2008.
- Comino E, Rosso M, Riggio V: Investigation of increasing organic loading rate in the co-digestion of energy crops and cow manure mix. *Bioresource Technology* 101:3013-3019, 2010.
- Deublein D, Steinhauser A: *Biogas from waste and renewable resources: an introduction*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2011.
- Dien BS, Li XL, Iten LB, Jordan DB, Nichols NN, O'Bryan PJ: Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of mono-saccharides. *Enzyme and Microbial Technology* 2006;39:1137-44.
- Fan LT, Gharpuray MM, Lee YH. *Cellulose hydrolysis biotechnology monographs*. Springer, Berlin, 1987.
- Fengel D, Wegener G: *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, Berlin, 1984.
- Fey A, Conrad R: Effect of Temperature on Carbon and Electron Flow and on the Archaeal Community in Methanogenic Rice Field Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4790-4797, 2000.
- Frigon JC, Guiot SR: Biomethane production from starch and lignocellulosic crops: a review. *Biofuels Bioproducts and Biorefinin* 4:447-458, 2010.
- Garcia-Aparicio MP, Ballesteros I, Gonzalez A, Oliva JM, Ballesteros M, Negro MJ: Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129:278-288, 2006.
- Garcia-Ochoa F, Santos VE, Naval L, E. Guardiola E, López B: Kinetic model for anaerobic digestion of livestock manure. *Enzyme and Microbial Technology* 25:55-60, 1999.
- Garrote G, Domínguez H, Parajó JC: Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Roh Werkst* 57:191-202, 1999.
- Grabber JH: How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science* 45:820-31, 2005.
- González-Fernández C, Sialv B, Bernet N, Steyer JP: Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresource Technology* 129:219-223, 2013.
- Gunaseelan VN: Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. *Biomass and Bioenergy* 13:83-114, 1997.

- Ha MA, Apperley DC, Evans BW, Huxham IM, Jardine WG, Viëtor RJ I sur.: Fine structure in cellulose microfibrils: NMR evidence from onion and quince. *The Plant Journal* 16:183-190, 1998.
- Handajani: Degradation of Whey in an Anaerobic Fixed Bed (AnFB) Reactor. *Doktorska disertacija*, Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Bauingenieur-, Geo- und Umweltwissenschaften, Karlsruhe, 2004.
- Hsu T-A. Pretreatment of biomass. U Wyman CE: *Handbook on bioethanol, production and utilization*, str. 179-212. DC: Taylor and Francis, Washington, 1996.
- Hublin A: Razvoj procesa i modeliranje anaerobne razgradnje sirutke. *Doktorska disertacija*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2012.
- Imamović N: Istraživanje prinosa plina u procesu anaerobne digestije čvrstog otpada iz mesne industrije. *Doktorska disertacija*. Mašinski fakultet u Zenici, Zenica, 2014.
- Karunanithy C, Muthukumarappan K: Influence of extruder temperature and screw speed on pretreatment of corn stover while varying enzymes and their ratios. *Applied Biochemistry Biotechnology* 162:264-279, 2010.
- Kavacik B, Topaloglu B: Biogas production from co-digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure. *Biomass and Bioenergy* 34:1321-1329, 2010.
- Kothari R, Tyagi VV, Pathak A: Waste-to-energy: A way from renewable energy sources to sustainable development. *Renewable Sustainable Energy Review* 14:3164-3170, 2010.
- Kratky L, Jirout T: Biomass size reduction machines for enhancing biogas production. *Chemical Engineering Technology* 34:391-399, 2011.
- Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P: Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 48:3713-3729, 2009.
- Lehtomäki A, Huzzunen S, Rintala JA: Laboratory investigations on co-digestion of energy crops and crop residues with cow manure for methane production: effect of crop to manure ratio. *Resources, Conservation and recycling* 51:591-609, 2007.
- Li L, Kong X, Yang F, Li D, Yuan Z, Sun Y: Biogas production potential and kinetics of microwave and conventional thermal pretreatment of grass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166:1183-1191, 2012.
- Ivan Majcen: Prednosti i nedostaci bioreaktorskih odlagališta otpada, *Diplomski rad*, Geotehnički fakultet, Varaždin, 2012.
- McHugh S, Carton M, Mahony T, O'Flaherty V: Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiology Letters* 219:297-304, 2003.
- Møller HB, Sommer SG, Ahring BK: Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and Bioenergy* 26:485-495, 2004.

- Monlau F, Barakat A, Steyer JP, Carrere H: Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresource Technology* 102:241e7, 2012.
- Montgomery LFR, Bochmann G: *Pretreatment of feedstock for enhanced biogas production*. IEA Bioenergy, 2014.
- Morohoshi N: Chemical characterization of wood and its components. U Hon DNS, Shiraishi N: *Wood and cellulosic chemistry*, str. 331-392 Marcel Dekker, New York, 1991.
- Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros I, Oliva JM, Cabanas A, Ballesteros M. Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105:87-100, 2003.
- Nielsen HB, Uellendahl H, Ahring BK: Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter. *Biomass and Bioenergy* 31:820-830, 2007.
- Nielsen HB: Control parameters for understanding and preventing process imbalances in biogas plants: Emphasis on VFA dynamics. *Doktorska disertacija*, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Denmark, 2006.
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates, II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource. Technology* 74:25-33, 2000.
- Pang YZ, Liu KS, Yuan HR. Improving biodegradability and biogas production of corn stover trough NaOH solid state pretreatment. *Energy and Fuels* 22:2761-2766, 2008.
- Parawira W, Murto M, Read JS, Mattiasson B: Profile of hydrolases and biogas production during two-stage mesophilic anaerobic digestion of solid potato waste. *Process Biochemistry* 40:2945-2952, 2005.
- Rico C, García H, Rico JL: Physical-anaerobic-chemical process for treatment of dairy cattle manure. *Bioresource Technology* 102:2143-2150, 2011.
- Rogalinski T, Ingram T, Brunner GJ: Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *Supercritical Fluids* 47:54-63, 2008.
- Rutz D, Janssen R: *Biofuel technology handbook*. WIP Renewable Energies; München, Germany 2008.
- M. Schön: Numerical modeling of anaerobic digestion processes in agricultural biogas plants. *Doktorska disertacija*. Leopold Franzens Universität Innsbruck, Fakultät für Bauingenieurwissenschaften, Innsbruck, 2009.
- Stamatelatou K, Antonopoulou G, Ntaikou I, Lyberatos G: The effect of physical, chemical, and biological pretreatments of biomass on its anaerobic digestibility and biogas production. U *Mudhoo: Biogas production: pretreatment methods in anaerobic digestion*, str. 55-90. John Wiley & Sons, NJ Hoboken, 2012.

- Sun Y, Cheng JJ: Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83:1-11, 2002.
- Sung S, Liu T: Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere*. 53:43-52, 2003.
- Templer J, Lalman JA, Jing N, Ndegwa PM: Influence of C18 long chain fatty acids on hydrogen metabolism. *Biotechnology Progress* 22:199-207, 2006.
- Yang B, Wyman CE: Pretreatment: the key to unlocking low cost cellulosic ethanol. *Biofuel, Bioproducts and Biorefining* 2:26-40, 2008.
- VanWalsum GP, Allen SG, Spenser MJ, Laser MS, Antal MJ, Lynd LR: Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57/58:157-170, 1996.
- Vavilin VA, Rytov SV, Lokshina LY: A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresource Technology* 56:229-237, 1996.
- Vieitez ER, Ghosh S: Biogasification of solid waste by two phase anaerobic fermentation. *Biomass and bioenergy* 16(5):299-309, 1999.
- Vranić M, Knežević M, Perčulija G, Grbeša D, Leto J, Bošnjak K, Rupiće I: Kvaliteta kukuruzne silaže na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. *Mljekarstvo* 54(3):175-186, 2004.
- Ward AJ, Hobbs PJ, Holliman PJ, D.L. Jones: Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology* 99:7928-7940, 2008.
- Wang R, Sun Y, Zhang S, Lu X: Two-step pretreatment of corn stalk silage for increasing sugars production and decreasing the amount of catalyst. *Bioresource Technology* 120:290-294, 2012.
- Weil J, Sarikaya A, Rau S-L, Goetz J, Ladisch C, Brewer M i sur.: Pretreatment of yellow poplar sawdust by pressure cooking in water. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 68:21e40, 1997.
- Weiland: Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:849-860, 2012.
- Wilkie AC, Castro HF, Cubinski KR, Owens JM, Yan SC: Fixed-film Anaerobic Digestion of Flushed Dairy Manure After Primary Treatment: Wastewater Production and Characterisation. *Biosystems Engineering* 89:457-471, 2004.
- Zheng Y, Zhao J, Xu F, Li Y: Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science* xxx:1-19, 2014.