

**Openbaar Eindrapport**  
**1 september 2000 – 1 september 2003**

*Biologische Waterstofproductie*  
*(BWP project)*

EETK99116/398610-0710  
Februari 2004

Dr. ir. P.A.M. Claassen  
Dr. T. de Vrije

## Colophon

### **economieecologietechnologie**

Het project is uitgevoerd met subsidie van het Programma E.E.T. (Economie, Ecologie en Technologie) een gezamenlijk initiatief van de Ministeries van Economische Zaken, Onderwijs, Cultuur en Wetenschappen en Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer. Het programma wordt uitgevoerd door het Programmabureau E.E.T., een samenwerkingsverband van Senter en Novem.

This project is supported with a grant of the Dutch Programme EET (Economy, Ecology, Technology) a joint initiative of the Ministries of Economic Affairs, Education, Culture and Sciences and of Housing, Spatial Planning and the Environment. The programme is run by the EET Programme Office, a partnership of Senter and Novem.

Title	Biologische Waterstofproductie - Openbaar Eindrapport
Author(s)	P.A.M. Claassen, T. de Vrije
A&F number	Report nr. 043
ISBN-number	90-6754-753-0
Date of publication	Februari 2004
Confidentiality	None
Project code.	EETK99116/398610-0710
Price	0 Euro

Agrotechnology and Food Innovations B.V.  
P.O. Box 17  
NL-6700 AA Wageningen  
Tel: +31 317 475 024  
E-mail: [info.agrotechnologyandfood@wur.nl](mailto:info.agrotechnologyandfood@wur.nl)  
Internet: [www.agrotechnologyandfood.wur.nl](http://www.agrotechnologyandfood.wur.nl)

© 2004 Agrotechnology & Food Innovations B.V

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, hetzij mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

De uitgever aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten of onvolkomenheden.

*All right reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system of any nature, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publisher.  
The publisher does not accept any liability for the inaccuracies in this report.*

## Inhoudsopgave

<b>1</b>	<b>Samenvatting</b>	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Doelstelling</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>Gevolgde werkwijze</b>	<b>5</b>
1.2.1	<i>Biologische conversie</i>	5
1.2.2	<i>Reactorontwerp</i>	5
1.2.3	<i>Ontwikkeling van geschikt substraat</i>	5
1.2.4	<i>Techno-economische evaluatie</i>	6
<b>1.3</b>	<b>Samenwerkende partijen</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Summary</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Objective</b>	<b>7</b>
<b>2.2</b>	<b>Outline of workplan</b>	<b>8</b>
2.2.1	<i>Biological conversion</i>	8
2.2.2	<i>Reactor design</i>	8
2.2.3	<i>Production of suitable substrates</i>	8
2.2.4	<i>Techno-economical evaluation</i>	9
<b>2.3</b>	<b>Description of the consortium</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Resultaten</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Biologische conversie</b>	<b>10</b>
<b>3.2</b>	<b>Reactorontwerp</b>	<b>14</b>
3.2.1	<i>Thermoreactor</i>	14
3.2.2	<i>Fotobioreactor</i>	16
<b>3.3</b>	<b>Ontwikkeling van geschikt substraat</b>	<b>18</b>
3.3.1	<i>Miscanthus</i>	18
3.3.2	<i>Aardappelstoomschillen</i>	21
3.3.3	<i>Volledige omzetting van aardappelstoomschillen naar waterstof en CO<sub>2</sub></i>	22
<b>3.4</b>	<b>Techno-economische evaluatie</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>Perspectief voor toepassing</b>	<b>25</b>
<b>5.</b>	<b>Bijdrage aan EET doelstellingen</b>	<b>25</b>
<b>6.</b>	<b>Trefwoordenlijst/Keywords</b>	<b>26</b>
<b>7.</b>	<b>Publicaties</b>	<b>26</b>

## 1 Samenvatting

### 1.1 Doelstelling

Waterstof wordt steeds vaker genoemd als energiedrager van de toekomst. De redenen hiervoor zijn het ontbreken van CO<sub>2</sub> emissie bij verbranden van waterstof én de ontwikkelingen op het gebied van brandstofcellen die voor het hoogste rendement met waterstof gevoed moeten worden.

In het kader van de maatschappelijke ontwikkelingen naar duurzame energieproductie, is het van belang een duurzaam productiesysteem voor waterstof te ontwerpen. De huidige productiesystemen zijn gebaseerd op fossiele grondstoffen en dientengevolge niet duurzaam. Een aantal nieuwe technologieën zijn gebaseerd op het gebruik van hernieuwbare grondstoffen, zoals zonne- en windenergie en energie uit biomassa. Een ontwikkeling van een proces voor waterstofproductie uit biomassa sluit aan bij het streven van de Nederlandse overheid om een steeds groter aandeel duurzame energie uit biomassa te betrekken.

Voor de productie van waterstof uit biomassa zijn er twee opties: de thermochemische en de biologische conversie, waarvan de geschiktheid min of meer bepaald wordt door het droge stof gehalte van de grondstof. Beide opties zijn, zowel nationaal als internationaal, onderwerp van uitgebreide studies. In vergelijking met de thermochemische conversie biedt de biologische conversie als belangrijkste voordeel dat natte biomassa in zeer zuivere waterstof omgezet kan worden. Een biologisch proces is bovendien geschikt voor toepassing op kleine schaal dus bijv. in de nabijheid van de locatie waar biomassa geproduceerd wordt.

De doelstelling van het project 'Biologische waterstofproductie' is de ontwikkeling van een bioproces waarin door microorganismen waterstof uit biomassa geproduceerd wordt (Fig.1) zoals beschreven in onderstaande reactievergelijkingen. Hiernaast bestrijkt dit project de gehele keten van voorbehandeling van biomassa tot fermentatie, opwerken van het geproduceerde gas en een techno-economische evaluatie.



In deze reactie fungeert glucose als modelsubstraat. Voor andere suikers gelden overeenkomstige reactievergelijkingen. Deze reactie is exotherm, d.w.z. dat er energie vrijkomt ( $\Delta G'_0 = -206 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). De vrijgekomen energie is voldoende voor groei van de bacteriën zodat aangenomen kan worden dat deze reactie in een natuurlijke omgeving zonder problemen verloopt. Dat dit inderdaad het geval is blijkt uit vergistingsprocessen waarin deze energie door de bacteriën wordt gebruikt om te groeien.



Deze reactie is endotherm ( $\Delta G'_0 = +104.6 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). Dit betekent dat onder standaardcondities deze reactie geen energie levert voor groei van micro-organismen en dat deze reactie dus niet zal plaatsvinden. Fotoheterotrofe bacteriën zijn in staat om energie uit licht te benutten. Op deze manier wordt deze reactie door hen wel uitgevoerd.

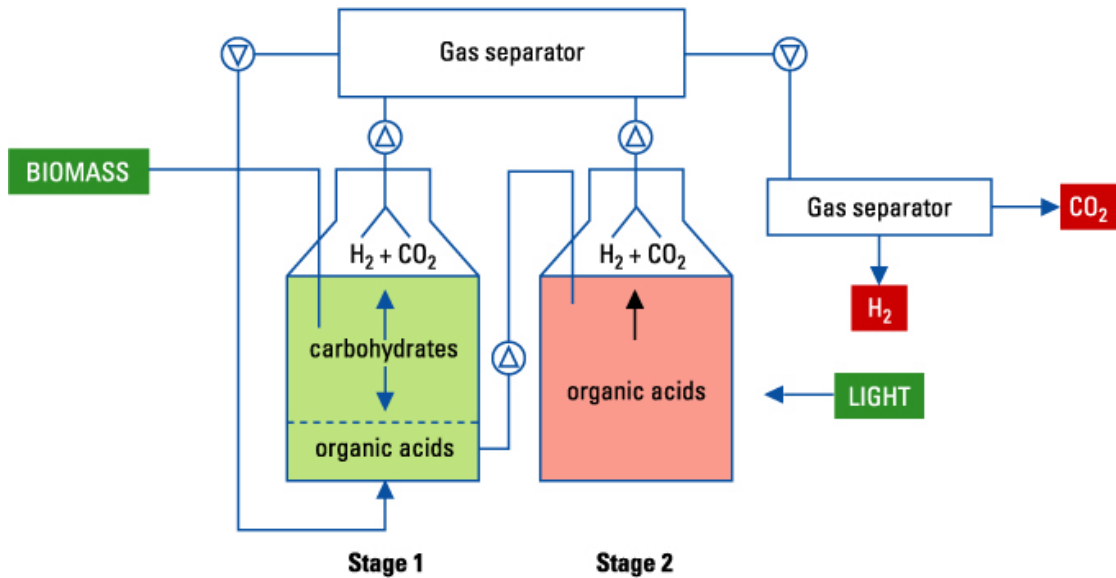


Fig. 1. Schema van het bioproces voor waterstofproductie van biomassa in een 2-traps fermentatie. De eerste fase is de heterotrofe fermentatie van koolhydraten tot waterstof, CO<sub>2</sub> en organische zuren. In de tweede fase vindt de ftoheterotrofe fermentatie van organische zuren tot waterstof en CO<sub>2</sub> plaats.

## 1.2 Gevolgde werkwijze

### 1.2.1 Biologische conversie

Dit project is allereerst gericht geweest op de microbiologische aspecten van de twee opeenvolgende fermentaties. In de eerste fermentatie worden suikers uit biomassa door thermofiele bacteriën bij ongeveer 70 °C omgezet in waterstof, CO<sub>2</sub> en organische zuren. In de hieropvolgende fermentatie worden de geproduceerde organische zuren verder omgezet in waterstof en CO<sub>2</sub>. De bacteriën die deze tweede omzetting uitvoeren zijn voor een gedeelte afhankelijk van lichtenergie en behoren daarom tot de zgn. ftoheterotrofe micro-organismen. Beide fermentaties vinden plaats onder anaërobe omstandigheden, d.w.z. onder uitsluiting van zuurstof.

### 1.2.2 Reactorontwerp

Voor optimalisatie van beide fermentaties is gewerkt aan de ontwikkeling van bioreactoren waarin de gewenste procesomstandigheden heersen. Bij het ontwerpen van de thermo-bioreactor is het belangrijk dat voor een optimaal actieve fermentatie de waterstof goed en snel wordt afgevoerd. Het ontwerp voor de fotobioreactor is gericht op een efficiënte wijze van inbreng van licht.

### 1.2.3 Ontwikkeling van geschikt substraat

Aan de hand van experimenten met zuivere voedingsstoffen is een traject voor de voorbehandeling van de te gebruiken biomassa door procestechnologen ontworpen zodanig dat een fermenteerbaar substraat ontstaat waarmee de eerste fermentatie gevoed kan worden.

#### 1.2.4 *Techno-economische evaluatie*

Voor het uiteindelijke productieproces is een techno-economische evaluatie gemaakt van een productieproces met een capaciteit van ongeveer 50 kg waterstof per uur met als grondstof aardappelstoomschillen.

### 1.3 **Samenwerkende partijen**

Het project is uitgevoerd door een consortium van de hieronder volgende partijen.

- Wageningen UR, Agrotechnology & Food Innovations, voorheen ATO-DLO (pervoerder). In de business unit 'Bio-based Products' worden diverse biologische conversies bestudeerd met het oog op valorisatie van hernieuwbare grondstoffen. Naast expertise op het gebied van producten voor industriële toepassingen is er eveneens belangstelling voor productie van energiedragers zoals waterstof.
- Wageningen UR, Laboratorium voor Microbiologie. Op dit universitair departement is de fysiologie van anaerobe micro-organismen een belangrijk onderwerp. De waterstof producerende bacteriën vertegenwoordigen één van de bestudeerde groepen.
- Wageningen UR, Food & Bioprocess Engineering. Dit, eveneens universitaire, departement heeft een uitgebreide kennis op het gebied van de ontwikkeling van fotobioreactoren voor het optimaal kweken van fototrofe micro-organismen.
- TNO-MEP. Deze onderzoeksinstelling heeft o.a. expertise betreffende diverse vormen van conversie van hernieuwbare grondstoffen tot energiedragers en het ontwerpen van bioreactoren.
- Agromiscanthus b.v. Dit bedrijf houdt zich bezig met het inzetten van nieuwe gewassen, waaronder *Miscanthus*, die geschikt zijn voor energieproductie.
- B.V. Duynie. Dit bedrijf verhandelt vochtrijke diervoeders uit de organisch natte fractie afkomstig van de agro-food industrie.
- ECN. In deze onderzoeksinstelling worden vrijwel alle onderwerpen die met energie te maken hebben onder de loupe genomen.
- Techno Invent. Dit is een ingenieursbureau voor milieutechniek dat gespecialiseerd is in het modelleren van energieconversiesystemen, vooral waar het nieuwe duurzame technologische ontwikkelingen betreft.
- Shell. De dochter Shell Hydrogen voert onderzoek uit naar alle facetten die een rol gaan spelen bij de omschakeling naar het gebruik van waterstof als een nieuwe brandstof.

## 2 Summary

### 2.1 Objective

Hydrogen is often mentioned as the energy carrier of the future because i) hydrogen is non-carbonaceous so no CO<sub>2</sub> is produced during its conversion and ii) hydrogen is required to feed the fuel cells of which a large contribution in future energy provision is expected. Because of the increasing societal interest in the use of energy obtained from renewable resources, the development of renewable hydrogen production technologies is needed as hydrogen is presently produced from fossil fuels. New technologies are based on the use of renewable sources, such as solar and wind energy and energy from biomass. The development of a process for hydrogen production from biomass complies with the policy of the Dutch government to obtain more renewable energy from biomass.

There are two distinctly different options for the production of hydrogen from biomass: thermochemical and biological conversion. The dry weight content of the raw material is more or less decisive for which option is suited best. Both options are, nationally and internationally, subject of extensive studies. In comparison to thermochemical conversion, biological conversion offers the advantage of yielding very pure hydrogen from wet biomass. Furthermore, a biological process can be economically feasible at a small scale, e.g. enabling hydrogen production near the site of biomass production.

The main objective of the project “Biological hydrogen production” is the development of a bioprocess for hydrogen production from biomass by micro-organisms (Fig. 1) as described by the equations below. Additionally, this project covers the whole chain of pretreatment of biomass to fermentation and up-grading of the produced gas and a techno-economic evaluation.



This equation is based on glucose and for other sugars the equations are quite similar. The reaction is exotherm which means that energy is generated ( $\Delta G'_0 = -206 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). This energy is sufficient for growth of the bacteria indicating that this reaction occurs freely in a natural environment. This is supported by the occurrence of these bacteria in natural anaerobic environments such as swamps or biogas installations.



This reaction is endotherm ( $\Delta G'_0 = +104.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). This means that under standard conditions no energy becomes available for growth of micro-organisms and therefore this reaction will not take place. However, photoheterotrophic bacteria are able to obtain their energy from light whilst growing on organic acids. This enables the complete oxidation of acetic acid as described in equation 2.

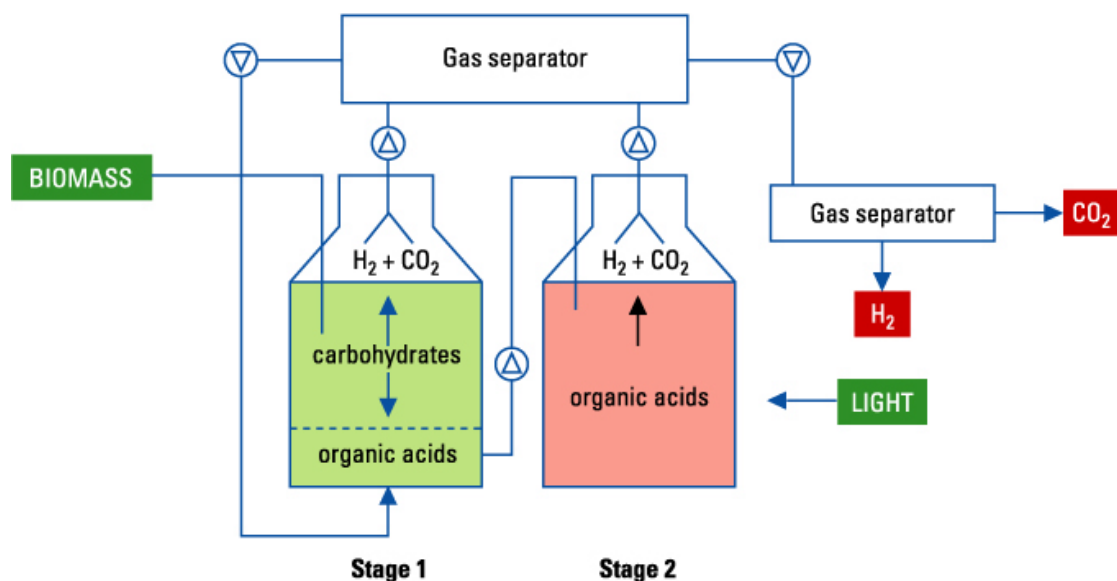


Fig. 1. Outline of the bioprocess for production of hydrogen from biomass in a 2-stage fermentation. Stage 1 is for heterotrophic fermentation of carbohydrates to hydrogen, carbon dioxide and organic acids. In stage 2 the photoheterotrophic fermentation of organic acids to hydrogen and carbon dioxide takes place.

## 2.2 Outline of workplan

### 2.2.1 Biological conversion

This project has firstly addressed the microbiological aspects of the two consecutive fermentations. In the first fermentation sugars from biomass are converted to hydrogen, CO<sub>2</sub> and organic acids by thermophilic bacteria at approx. 70 °C. In the following fermentation the produced organic acids are converted to hydrogen and CO<sub>2</sub> at 30 °C. The bacteria involved in the second fermentation are partly dependent on light energy and belong to the so-called photoheterotrophic micro-organisms. Both fermentations take place under anaerobic conditions, that is with exclusion of oxygen.

### 2.2.2 Bioreactor design

For optimization of the two fermentations the development of bioreactors has been aimed at creating the desired process conditions. For the design of the thermo-bioreactor adequate and fast removal of hydrogen is essential for an optimal performance of the fermentation. The design of the photo-bioreactor is aimed at efficiently introducing light into the system.

### 2.2.3 Production of suitable substrates

From experiments with pure substrates, a scheme for pretreatment of relevant biomass has been developed by process engineers in such a way that a fermentable substrate is produced which can be used for the first fermentation.



#### 2.2.4 Techno-economical evaluation

For the design of a fullfledged production process a techno-economical evaluation has been carried out assuming a capacity of approx. 50 kg hydrogen per hour with potato steam peels as the feedstock.

### 2.3 Description of the consortium

The project has been carried out by a consortium of the following participants:

- Wageningen UR, Agrotechnology & Food Innovations, formerly ATO-DLO (co-ordinator). In the business unit 'Bio-based Products' various biological conversions are being studied aimed at valorisation of renewable resources. Besides expertise in the field of products for industrial applications, there is profound interest in the production of energy carriers such as hydrogen.
- Wageningen UR, Laboratory of Microbiology. The participating group in this university department focusses on the physiology of anaerobic micro-organisms, amongst which are the hydrogen producing micro-organisms.
- Wageningen UR, Food & Bioprocess Engineering. The involved group has ample experience in the field of photo-bioreactor design and development for optimum performance of phototrophic micro-organisms.
- TNO-MEP. This research institute has a.o. expertise in thermochemical processes of conversion of renewable resources in energy carriers and the design of bioreactors.
- Agromiscanthus. This company is involved in culturing and application of new crops like *Miscanthus*, suitable for energy production.
- Duynie. This company deals in moisture-rich feed from organic wet fractions of the agro-food industry.
- ECN. At this research institute almost all subjects on energy are addressed.
- Techno Invent. This is a company specialized in modelling of energy conversion systems, especially concerning new sustainable technological developments.
- Shell. Shell Hydrogen does research on all aspects related to the transition to a hydrogen economy.

### 3 Resultaten

#### 3.1 Biologische conversie

Voor de productie van waterstof uit biomassa in de eerste fermentatie van het bioproces zijn twee commercieel verkrijgbare micro-organismen, *Thermotoga elfii* en *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Fig. 2) geselecteerd die bij een temperatuur van circa 70 °C de conversie van glucose naar waterstof en azijnzuur bewerkstelligen (Tabel 1). De maximaal theoretisch haalbare efficiëntie is een productie van 4 mol waterstof uit 1 mol glucose. Omdat de waterstofproductie echter nauw samenhangt met groei van de bacteriën is de werkelijke waterstofproductie bijna 3 mol waterstof per mol glucose. Dit is een hoog rendement en betekent een belangrijke doorbraak in het veld van biologische waterstofproductie waar voorheen rendementen van 1 tot iets meer dan 2 mol waterstof per mol glucose zijn bereikt bij temperaturen van circa 35 °C (de Vrije en Claassen, 2003). Naast het bereiken van deze hoge efficiëntie in de conversie van suikers naar waterstof is ook het gelijktijdig gebruik van glucose en xylose (een C<sub>6</sub> en een C<sub>5</sub> suiker, respectievelijk) een belangrijke doorbraak (Fig. 3). Dit resultaat opent de weg naar een succesvol gebruik van substraten die voor een aanzienlijk deel bestaan uit lignocellulose, zoals energiegewassen als *Miscanthus* of afvalstromen als GFT (Groenten Fruit en Tuinafval). Zowel *T. elfii* als *C. saccharolyticus* groeien, bij respectievelijk 65 en 70 °C, op een groot aantal mono- en disachariden en op hydrolysaten van *Miscanthus* en aardappelstoomschillen en produceren daarbij waterstof.

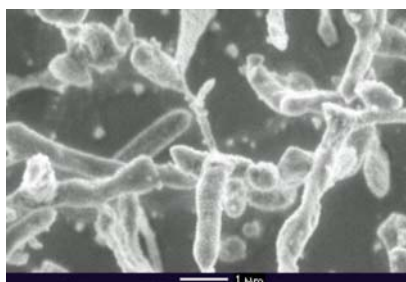


Fig. 2. Elektronmicroscopische opname van *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* tijdens groei op glucose. De lengte van de balk komt overeen met 1 μm.

Tabel 1. Conversie van glucose en/of xylose naar waterstof, CO<sub>2</sub> en organische zuren door *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* in 1 L batch cultures. De hoeveelheden glucose en xylose zijn geconsumeerd, H<sub>2</sub>, acetaat, lactaat, CO<sub>2</sub> en biomassa zijn geproduceerd.

Glucose [mM]	Xylose [mM]	H <sub>2</sub> [mM]	Acetaat [mM]	CO <sub>2</sub> [mM]	Lactaat [mM]	Biomassa [g/l]
53.6	-	142.9	81.0	81.3	2.3	1.6
-	61.7	138.1	72.7	79.3	5.6	1.6
34.3	14.5	113.3	63.2	64.8	15.0	1.0

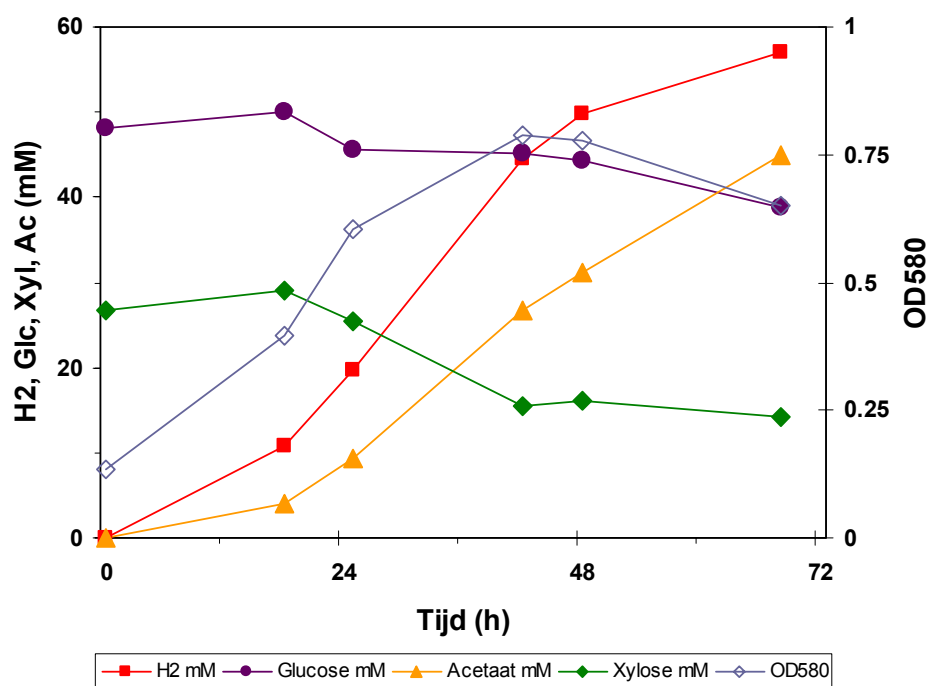


Fig. 3. Waterstofproductie tijdens groei van *Thermotoga elfii* op *Miscanthus* hydrolysaat met glucose en xylose. De monosachariden worden simultaan gebruikt voor groei en waterstofproductie.

Met een opstelling bestaande uit een kleine fermentor, 3 wasflessen met daarin loog en een brandstofcel die gekoppeld is aan een lampje of ventilator (Fig. 4) is het eerste deel van het beoogde proces gedemonstreerd.

In een fermentor met 2 L werkvolume is een cultuur van *C. saccharolyticus* in continu modus gekweekt. Dit betekent dat het micro-organisme net zo hard groeit als er substraat aan de cultuur wordt toegevoegd. Doordat er tevens een afvoer is blijft het aantal bacteriën in de cultuur constant en dientengevolge ook de waterstofproductiesnelheid. Deze situatie kan gedurende meerdere weken gehandhaafd worden en is dus van belang in industriële praktijken waar een ‘down-time’ geminimaliseerd moet worden.

Door ‘strippen’ met CO<sub>2</sub> of een ander gas zoals bijv. stikstof, is de verwijdering van waterstof uit de cultuur gerealiseerd. Dit is van belang omdat vastgesteld is dat bij 10-20% waterstof in de gasfase, er bij thermofiele bacteriën remming van de waterstofproductie optreedt. Het geproduceerde gas is grotendeels ontdaan van CO<sub>2</sub> door wassen met loog en vervolgens naar een brandstofcel geleid. De geproduceerde elektriciteit tenslotte was voldoende om een ventilator te laten draaien.

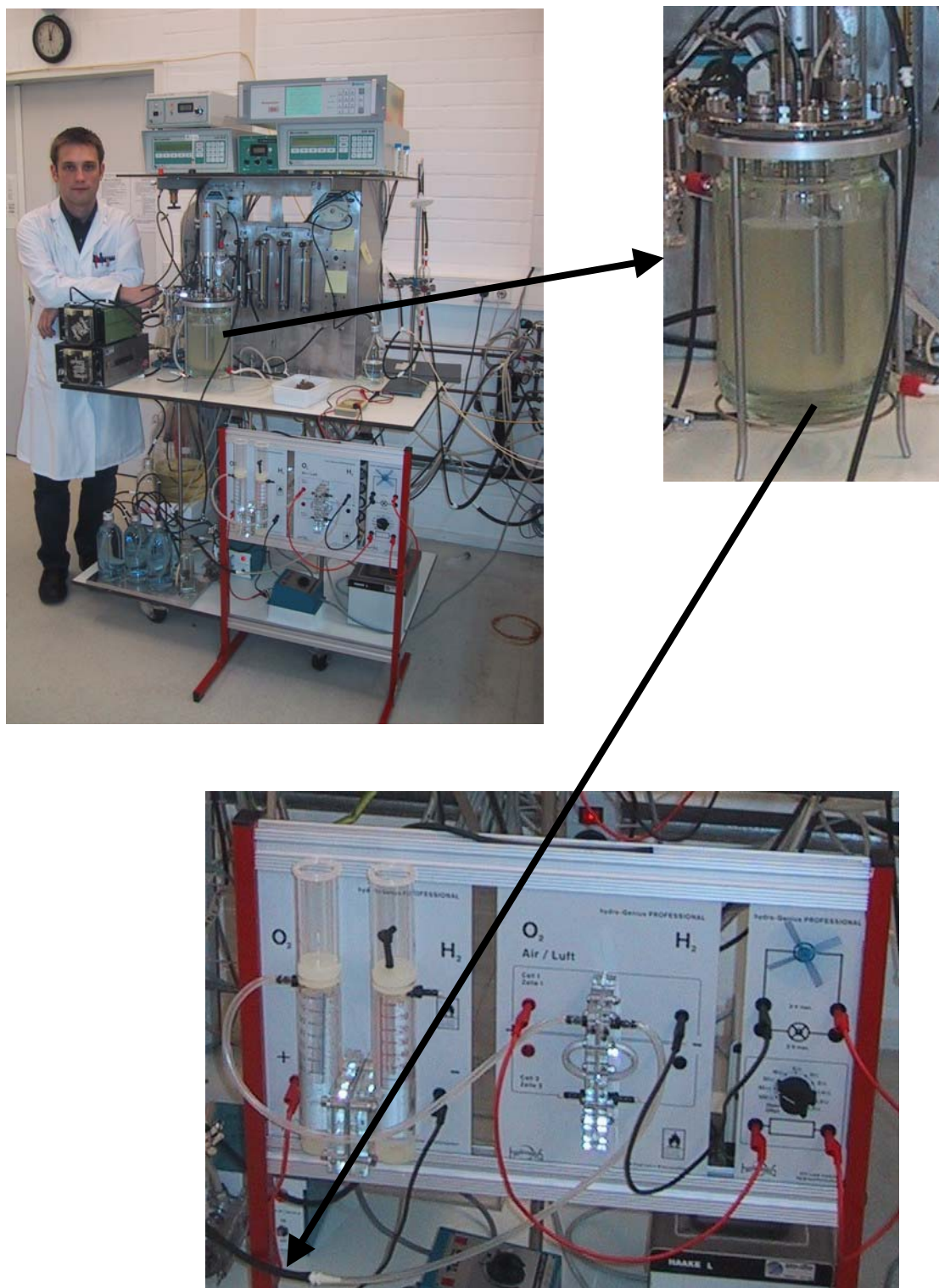


Fig. 4. Waterstofproductie door *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* tijdens groei op sucrose. Het geproduceerde waterstof wordt uit de cultuurvloeistof gestript en daarna gewassen met loog. Vervolgens wordt het gas naar een brandstofcel geleid waar de waterstof met zuurstof reageert onder productie van elektriciteit.

Voor de fotoheterotrofe omzetting van de organische zuren die geproduceerd worden in de eerste thermofiele fermentatie zijn *Rhodospseudomonas* MM22711 en *Rhodobacter capsulatus* geselecteerd waarbij de laatste de meest veelbelovende lijkt. In eerste instantie is een cilindrische fotobioreactor gebruikt om de fysiologie van deze bacteriën te bestuderen (Fig. 5). Deze bioreactor is gevuld met bacteriën die geïmmobiliseerd waren om een maximale waterstofproductie te bewerkstelligen. Uit Fig. 6 blijkt dat gedurende lange tijd waterstofproductie gerealiseerd is. De efficiëntie van de omzetting van acetaat in waterstof is echter teleurstellend: 30% van de theoretisch maximaal haalbare efficiëntie. Er is daarom voor het onderdeel fotoheterotrofe waterstofproductie veel aandacht besteed aan het ontwerpen van een fotobioreactor die hogere efficiënties mogelijk maakt zodat betrouwbaardere fysiologische waarnemingen gedaan kunnen worden (zie onder 2.2.2). Een groot voordeel van fotoheterotrofe bacteriën is de ongevoeligheid voor waterstof. Omdat het CO<sub>2</sub> oplost in het medium zijn concentraties van 90% waterstof in het geproduceerde gas niet ongebruikelijk.

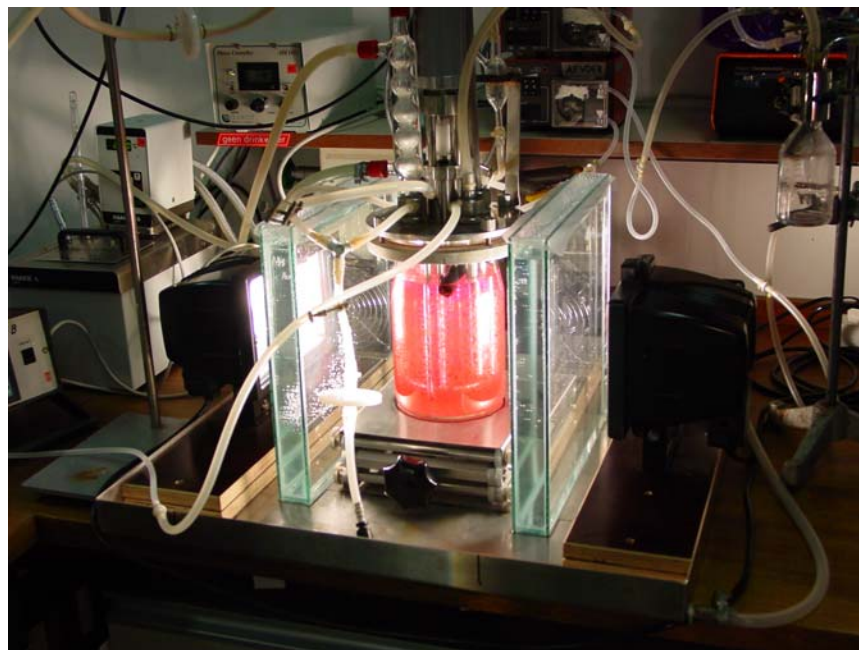


Fig. 5. Cultuur van *Rhodospseudomonas* MM22711 cellen geïmmobiliseerd in  $\kappa$ -carrageen bollen. Als lichtbron is een halogeenlamp gebruikt.

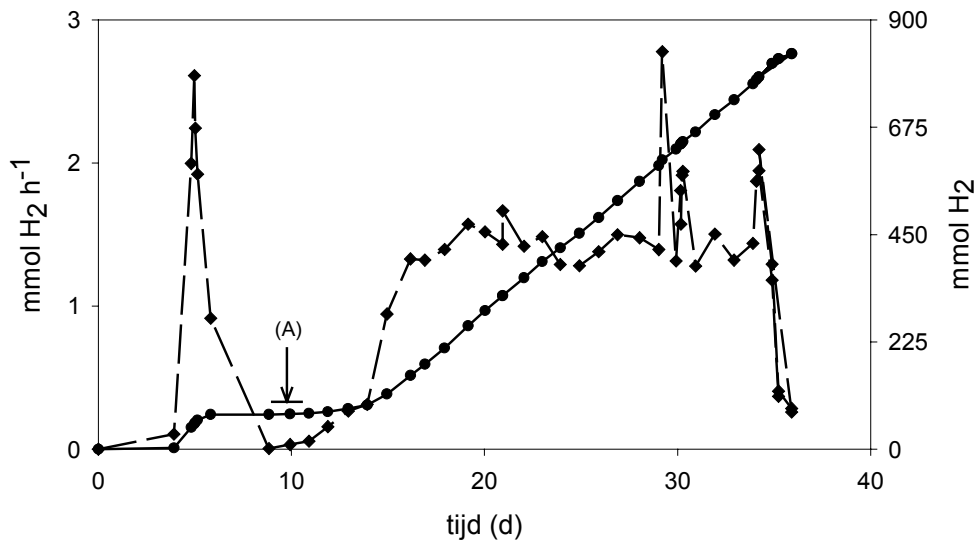


Fig. 6. Verloop van een continu fermentatie met geïmmobiliseerde *Rhodospseudomonas* MM22711 op acetaat. Cumulatieve H<sub>2</sub> productie ●; H<sub>2</sub> productiesnelheid (mmol H<sub>2</sub>.h<sup>-1</sup>) ◆. Bij 'A' is een lek in het gas opvangsysteem opgetreden.

## 3.2 Reactorontwerp

### 3.2.1 Thermoreactor

Voor het ontwerp van een reactor voor de thermofiele fermentatie is gekozen voor een zgn. gepakt bed reactor type. In een dergelijke reactor zijn de micro-organismen geïmmobiliseerd in een biofilm op een pakking van bijv. kunststof. In dit geval wordt de substraatoplossing van bovenaf over de biofilm geleid. Op hetzelfde moment wordt als tegenstroom een gasstroom door de reactor geleid die het geproduceerde waterstof verwijdert. Dit is van belang aangezien de thermofiele bacteriën geremd worden door waterstof. Doordat gas de continue fase is wordt voorkomen dat het strippen van waterstof uit een vloeistof belemmerd wordt door een hoge hydraulische druk zoals op zou treden in een bellenkolom.

De ontworpen reactor heeft een volume van 400 L met daarin een pakking met een hoogte van 1.2 m, een diameter van 0.45 m en een inhoud van 190 L. De reactor is van roestvast staal gemaakt. Dit is nodig gebleken omdat als stripgas stoom is gebruikt dat bij 70 °C bij een gehandhaafde onderdruk van ongeveer 0.4 bar gevormd wordt. Bovenin de reactor wordt de voedingsoplossing verdeeld en valt vervolgens naar beneden over de pakking. Onderin wordt vloeistof opgevangen en teruggepompt na menging met nieuwe nutriënten. De reactor wordt vacuüm gezogen en van het afgas wordt de waterdamp gecondenseerd. Deze reactor (Fig. 7 en 8) heeft gedurende circa 4 maanden waterstofgas geproduceerd na enten met *C. saccharolyticus* bij 70°C, onder niet-steriele condities. Tot dusver is een maximale productiviteit bereikt van 10 mol H<sub>2</sub> per dag en een maximale concentratie van 55% H<sub>2</sub> in het gedroogde gas.

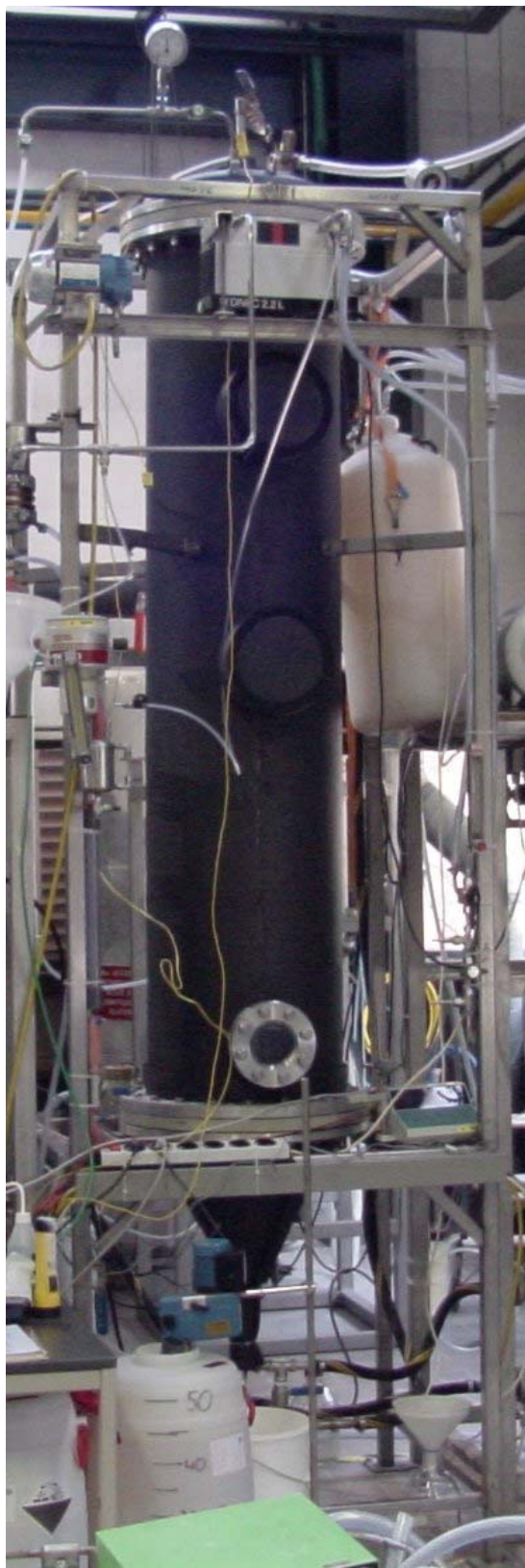


Fig. 7. Gepakt bed reactor voor continu productie van waterstof door *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*.  
Conditie: sucrose als voeding bij 70°C en 0.4 bar.

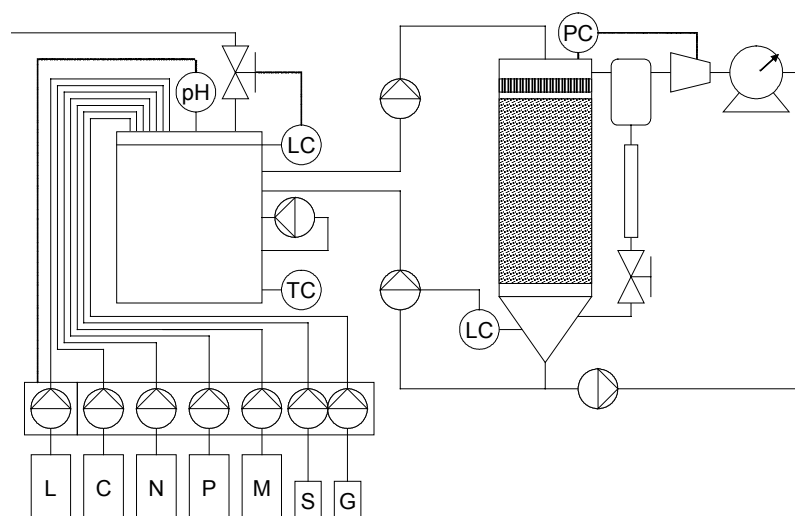


Fig. 8. Schematische weergave van een gepakt bed thermoreactor voor waterstofproductie. In het thermostaatvat worden alle substraten toegevoegd en gemengd (C: sucrose; N:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; P:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; M:  $\text{MgCl}_2$ ; S: sporen en G: gistextract). De temperatuur in het thermostaatbad wordt constant gehouden door een elektrisch verwarmingselement en de pH door dosering van NaOH (L) (op 6.5). LC, TC en PC staan voor vloeistofniveau-, temperatuur- en drukcontrole, respectievelijk.

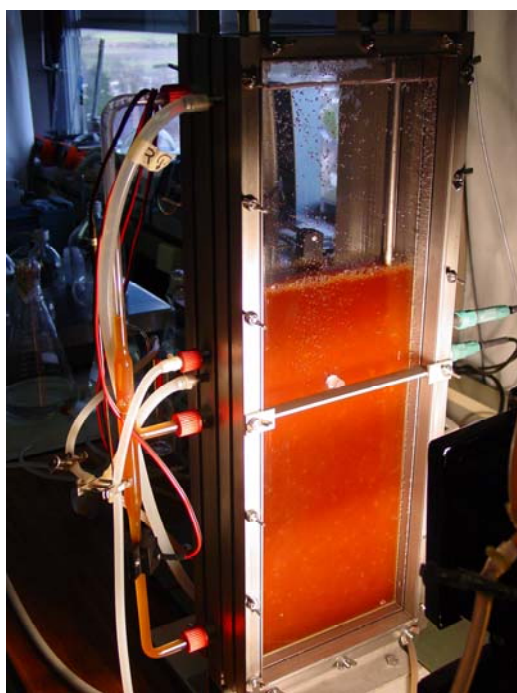
### 3.2.2 Fotobioreactor

De efficiëntie van lichtgebruik in een ronde, glazen bioreactor met een diameter van 12 cm (Fig. 5) ligt bij hoge lichtintensiteit rond de 1 à 3 % (400 – 950 nm), terwijl de maximaal haalbare lichtefficiëntie bij gebruikmaking van halogeenlicht 10% bedraagt. Vlakbij het oppervlak van de reactor treedt lichtoververzadiging op, waardoor een relatief grote fractie licht als warmte wordt verspild. Meer naar het midden van de reactor is geen licht meer beschikbaar. De bacteriën die geen licht ontvangen kunnen niet actief aan het waterstofproductieproces deelnemen.

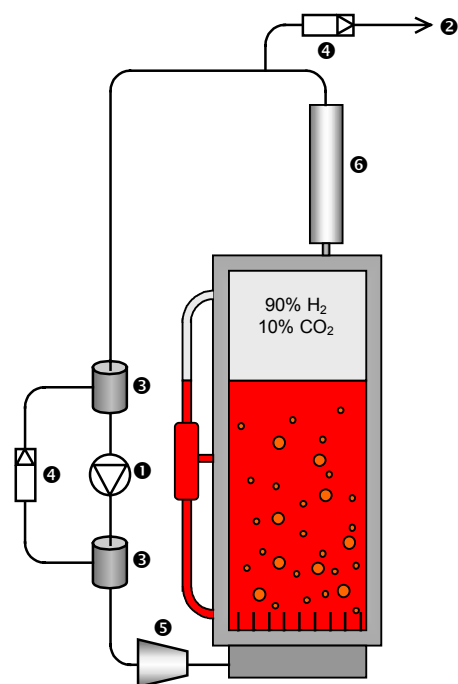
Op basis van het bovenstaande is een vlakke plaat geometrie voor de hand liggend door het grote oppervlak per volume en de korte lichtweg. De ontwikkelde vlakke plaat fotobioreactor heeft een lichtweg van 3 cm en een volume van 2.4 L. Een foto van de reactor is weergegeven in Fig. 9A. De reactor is volledig steriliseerbaar. In deze reactor is een fotochemische lichtefficiëntie van 3.7% bereikt. Voor verdere verhoging van deze efficiëntie moet een concentratie bacteriën van 5.2 g/L in de reactor gerealiseerd worden. In de eerste experimenten is 4.1 g/L bereikt en de verhoging tot 5 g/L lijkt nu haalbaar door een nauwkeuriger debietcontrole.

Omdat de mate van menging een belangrijke factor is in de efficiëntie waarmee de substraten door een fototroof organisme kunnen worden gebruikt is gekozen voor pneumatische menging met gas-recirculatie. Een schema van de opstelling met gas-recirculatie is weergegeven in Fig. 9B. Het gasdebiet door de mass flow controller bepaalt de mate van menging.





A



B

Fig. 9. A) Foto van een fermentatie in de 2.4 L vlakke plaat fotobioreactor. B) Schematische weergave van de reactor met gasrecirculatie systeem (1 gaspomp; 2 gasafvoer; 3 drukvaten; 4 overdrukventiel; 5 mass flow controller; 6 condensor).

### 3.3 Ontwikkeling van geschikt substraat

De biomassa, die geselecteerd is als uitgangsmateriaal voor de eerste fermentatie, is afkomstig van het energiegewas *Miscanthus* en de industriële bijproducten aardappelstoomschillen.

#### 3.3.1 *Miscanthus*

*Miscanthus* is een lignocellulose gewas en bestaat voornamelijk uit (hemi)cellulose en lignine. *Miscanthus* wordt in Nederland verbouwd en heeft een hoge productiviteit, circa 15 ton ds/ha. Voor verbouwing van *Miscanthus* is relatief weinig kunstmest nodig. Het fermenteerbare deel van *Miscanthus* is de (hemi)cellulose, rijk aan glucose en xylose (Tabel 2).

Tabel 2. Chemische samenstelling van *Miscanthus* weergegeven als percentage van de totale droge stof.

Component	Hoeveelheid %
Cellulose	38.2
Hemicellulose	24.3
Lignine	
zuur-onoplosbaar	24.1
zuur-oplosbaar	0.9
Eiwit	1.3
Oplosmiddel extract	4.2
Heet water extract	1.4
As	2.0

Droge stof gehalte = 86%

Voor het beschikbaar maken van een fermenteerbaar substraat uit *Miscanthus* is een voorbehandeling van het materiaal noodzakelijk bijv. met een co-roterende dubbele schroefextruder (Fig. 10). Deze mechanische voorbehandeling is gecombineerd met een chemische behandeling (NaOH) (Fig. 11), waardoor enzymatische hydrolyse van polysacchariden mogelijk werd. Enzymatische hydrolyse van voorbehandeld *Miscanthus* vindt plaats met commercieel verkrijgbare enzympreparaten zodanig dat een hydrolysaat ontstaat met daarin vnl. glucose en xylose.



Fig. 10. Clextral BC45 dubbele schroefextruder gebruikt voor voorbehandeling van *Miscanthus*. Productiesnelheid, 15 – 30 kg droge stof per uur, energieverbruik, 300 kWh per ton droge stof .



Fig. 11. A) *Miscanthus* en B) Gedelignificeerde *Miscanthus*. Geëxtrudeerde *Miscanthus* is gedelignificeerd door incubatie met NaOH (12% w/w droge stof) bij 70 °C gedurende 4 uur.

De massabalans van het gecombineerde proces van extrusie en NaOH voorbehandeling, gevolgd door enzymatische hydrolyse, is weergegeven in een blokschema (Fig.12). Van de totale biomassa, die bestaat uit 62.5% (hemi)cellulose, wordt 33% omgezet tot monosachariden. Voor de omzettingen van cellulose en hemicellulose geldt een omzetting van 69% en 57%, respectievelijk.

Er ontstaan twee restfracties, t.w. de alkalische ‘black liquor’ met oplosbare lignine producten en gehydrolyseerd hemicellulose, en een residu na de enzymatische hydrolyse met nog 24% van de initiële (hemi)cellulose. De black liquor kan na concentratie van de vaste stof gebruikt worden voor opwekking van energie en terugwinnen van de chemicaliën. Het residu kan gerecycled worden naar de voorbehandelingsstap. Het uiteindelijke product, het hydrolysaat, bevat suikers in een concentratie (32 g/L) die geschikt is voor anaerobe thermofiele fermentaties. Op het moment geldt voor *Miscanthus* als energiegewas een hoge prijs van 50 tot 100 Euro per ton. Wanneer echter restfracties van dit gewas, die ontstaan bij hoogwaardiger toepassingen, worden gebruikt dan daalt deze prijs tot 25 tot 30 Euro per ton. De bijdrage van *Miscanthus* aan de productiekosten van waterstof zijn op het moment nog onzeker omdat de voorbewerking nog verbetering behoeft en vooral ook omdat de kosten van de gebruikte enzymen vooralsnog veel te hoog zijn om een kosteneffectieve enzymatische hydrolyse te realiseren.

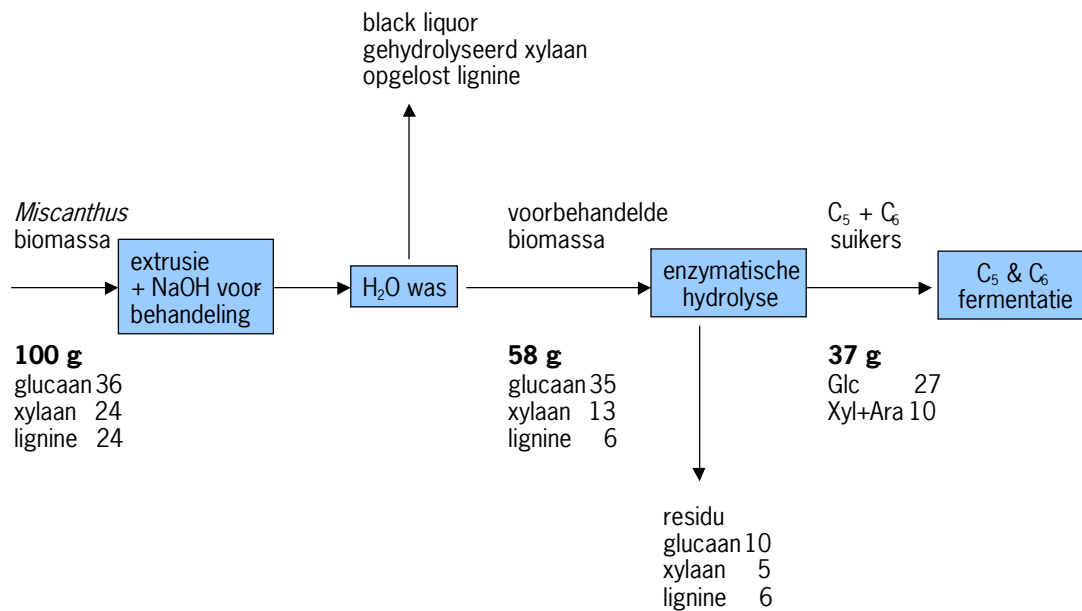


Fig. 12. Blokschema van voorbehandeling en hydrolyse van *Miscanthus*. Conversie en hydrolyse efficiënties van glucaan en xylaan en opbrengsten aan oplosbare suikers uitgaande van 100 gram droge stof.

### 3.3.2 *Aardappelstoomschillen*

In de aardappelverwerkende industrie wordt tijdens het proces van het verwijderen van de schil van aardappelen een hoge temperatuur toegepast (200°C). De hittebehandeling is voldoende om het aanwezige zetmeel in de aardappelstoomschillenfractie beschikbaar te maken voor enzymatische hydrolyse. Een voorbehandelingsstap is dus niet nodig. Enzymatische hydrolyse van aardappelstoomschillen vindt plaats met commercieel verkrijgbare en goedkope enzympreparaten (Fig. 13). Aardappelstoomschillen bestaan voor de helft uit zetmeel dat voor meer dan 95% gehydrolyseerd kan worden (Tabel 3).

Tabel 3. Chemische samenstelling van aardappelstoomschillen weergegeven als percentage van de totale droge stof.

Component	Hoeveelheid %
Zetmeel	50.7
Glucose	1.2
Eiwit	13.3
Organische zuren	13.6
As	8.2
Lipiden en celwandmateriaal	niet bepaald

Droge stof gehalte = 12.6%



Fig. 13. Aardappelstoomschillen worden geproduceerd als bijproduct in de aardappelverwerkende industrie. In Nederland bedraagt de jaarlijkse productie ongeveer 600 kton (natte fractie).



Fig. 14. Enzymatische hydrolyse van aardappelstoomschillen. Incubatie vindt plaats bij 70 °C met  $\alpha$ -amylase en bij 60 °C met amyloglucosidase gedurende enkele uren.

Na hydrolyse (Fig. 14) wordt gecentrifugeerd voor scheiden in hydrolysaat en restfractie. Het hydrolysaat bevat 68 g glucose/L en 17 g organische zuren/L en moet verdund worden voor de thermofiele fermentatie. De restfractie bevat 35% van de initiële droge stof waarin het relatieve eiwitgehalte is toegenomen tot 30% van de resterende droge stof.

Aardappelstoomschillen zijn een bijproduct dat gevormd wordt in de aardappelverwerkende industrie. Een gangbare prijs die deze industrie ontvangt voor dit bijproduct met een droge stof percentage van 17-18%, is ongeveer 50 euro per ton aardappelstoomschillen (droge stof). Dit zou een bijdrage van ongeveer 20% aan de productiekosten van waterstof betekenen. Op het moment zijn er alternatieve, meer winstgevende, toepassingen voor aardappelstoomschillen dan als grondstof voor waterstofproductie, zoals de toepassing in de veevoeder industrie.

### 3.3.3 Volledige omzetting van aardappelstoomschillen naar waterstof en $CO_2$ .

Na hydrolyse van aardappelstoomschillen zijn de suikers in het hydrolysaat omgezet door *C. saccharolyticus* in een thermoreactor bij 70 °C (Fig. 15). Het effluent van deze reactor, waarin vnl. acetaat en lactaat aanwezig zijn, is als substraat gebruikt in een fotofermentatie (Fig. 16). De overall efficiëntie van de omzetting van suikers naar waterstof is 47%, terwijl de uiteindelijke doelstelling 69% bedraagt.

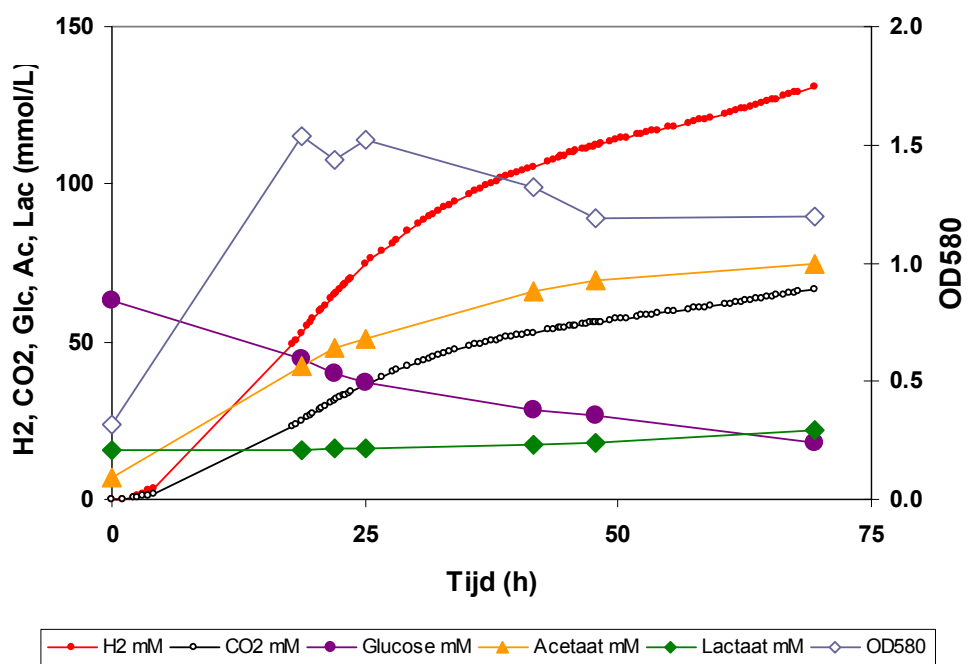


Fig. 15. Thermofiele fermentatie van aardappelstoomschillen hydrolysaat door *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*.

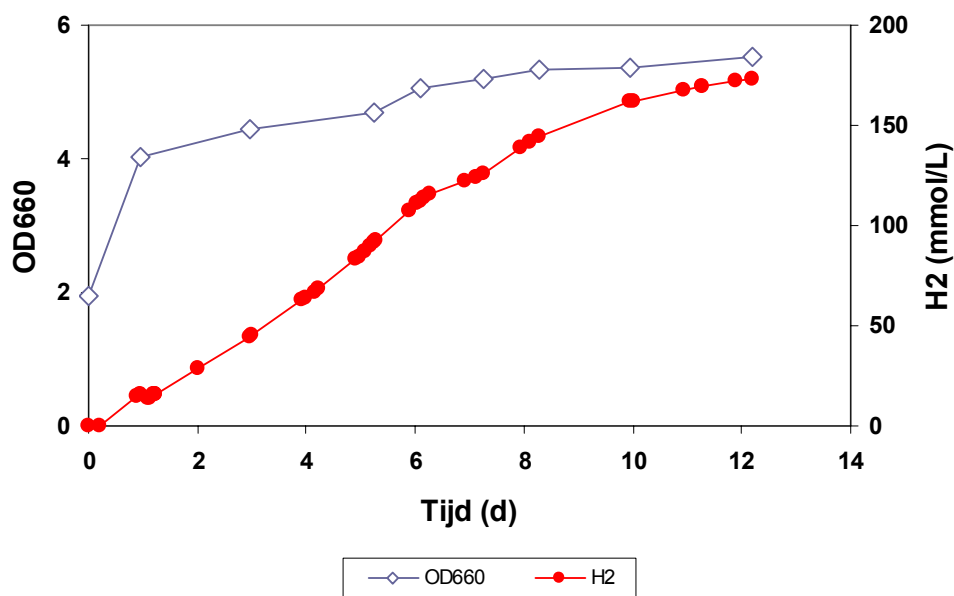


Fig. 16. Groei en waterstofproductie tijdens fotoheterotrofe fermentatie van het 1.6 maal verdunde effluent uit de thermoreactor door *Rhodobacter capsulatus*.

### 3.4 Techno-economische evaluatie

Op basis van de verkregen resultaten in dit project is een schatting gemaakt van de productiekosten van waterstof via een bioproces dat technisch en economisch haalbaar is en bovendien eenvoudig van opzet is.

Als grondstof is gebruik gemaakt van aardappelstoomschillen aangezien de voorbewerking van *Miscanthus* nog niet economisch realiseerbaar is. De capaciteit van de thermoreactor is 17 kg H<sub>2</sub>/uur, die van de fotoreactor 40 kg H<sub>2</sub>/uur zodat de totale productiviteit 57 kg H<sub>2</sub>/uur bedraagt. De thermoreactor heeft een volume van 450 m<sup>3</sup> en wordt bedreven bij 0.5 bar onderdruk en 70 °C. De fotoreactor heeft een oppervlak van 12 ha en werkt bij 2.5 bar en 35 °C. Het droge afgas uit de thermoreactor bevat 50% H<sub>2</sub>, het afgas uit de fotoreactor >85% H<sub>2</sub>.

De meeste apparatuur is commercieel verkrijgbaar met uitzondering van de fotobioreactor. De kosten van de gangbare apparaten zijn ontleend aan het Prijzenboek NAP van DACE (Dutch Association of Cost Engineers). Voor de fotobioreactor is een schatting gemaakt aan de hand van op termijn realistisch geachte kosten. Voor de thermoreactor is een Lang factor van 4 gebruikt. De installatie is ontworpen voor automatisch bedrijf gedurende 8000 uur per jaar. Voor de bediening volstaan 2 operators in dagdienst (€ 40.000 per operator). De berekende productiekosten per kg H<sub>2</sub> en bedrijfskosten per uur zijn weergegeven in Tabel 4.

Tabel 4. Productiekosten van waterstof voor een 2-traps bioproces met een capaciteit van 57 kg H<sub>2</sub> per uur.

kosten	€/kg H <sub>2</sub>	€/uur
Afschrijving, onderhoud, verzekeringen, overhead	2.01	114.94
Bediening	0.17	10.00
Aardappelstoomschillen	0.68	39.37
Enzymen	0.00	0.02
Loog	0.11	6.27
Elektriciteit	0.13	7.33
<b>Totale kosten</b>	<b>3.10</b>	<b>177.93</b>

Voor afschrijving, onderhoud en verzekering is 15% van de investeringskosten per jaar in rekening gebracht. Tijdens de enzymatische voorbewerking van aardappelstoomschillen wordt een eiwitrijk residu gevormd. Indien dit tegen dezelfde prijs wordt afgezet als betaald moet worden voor aardappelstoomschillen, dan kunnen de kosten voor het verkrijgen van aardappelstoomschillen lager worden.



#### **4 Perspectief voor toepassing**

De resultaten die behaald zijn demonstreren de mogelijkheid om via een 2-traps bioproces waterstof uit biomassa te produceren dat geschikt is om een brandstofcel te voeden.

De naar verwachting realiseerbare productiekosten (20 €/GJ H<sub>2</sub>) zijn evenwel nog te hoog om een competitief waterstofproductieproces aan de markt aan te bieden. Allereerst zijn er aanzienlijke procestechnologische verbeteringen nodig op het gebied van voorbereiding van de te gebruiken grondstoffen, m.n. daar waar het uit lignocellulose bestaande grondstoffen betreft. Dit is een onderzoeksveld dat gedeeld wordt met andere productiemethoden voor biobrandstoffen zoals bijv. ethanolproductie. Gezien de wereldwijde belangstelling hiervoor zijn de research-inspanningen dermate uitgebreid dat een doorbraak op dit gebied realistisch geacht mag worden.

Om het bioproces zelf meer kosteneffectief te maken is het zaak vooral ook de 'microbiologie' te optimaliseren. De waterstofproducerende bacteriën zijn in staat diverse suikers tegelijkertijd aan te wenden voor waterstofproductie. Dit is een belangrijk voordeel. De productiviteit (kg H<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> reactorvolume) laat evenwel nog te wensen over. Hier moeten verbeteringen op het gebied van dichtheid van bacteriecultuur, specifieke omzettingssnelheid en/of de toepassing van mengpopulaties een uitkomst kunnen bieden. Hiernaast is een verdere optimalisatie van reactorconfiguraties op het gebied van enerzijds waterstofverwijdering (thermoreactor) en anderzijds lichtpenetratie (fotoreactor) van belang. Samen met de vorderingen in systeemintegratie en systeemrendement lijken hiervoor nog voldoende mogelijkheden aanwezig, zodat een concurrerende productieprijs van 10 €/GJ H<sub>2</sub> haalbaar lijkt.

Biologische waterstofproductie lijkt op het moment een reële optie om op de middellange termijn met relatief kleine installaties lokale gemeenschappen, industrieën of fijnmazig wegtransport van waterstof te voorzien. Als eerste grondstof is m.n. zetmeelrijk industrieel afvalwater, met een geschat energiepotentieel van 2-5 PJ H<sub>2</sub>/j, bij uitstek geschikt, vooral ook omdat daar extra inkomsten gegenereerd kunnen worden door uitsparing van, naar verwachting, steeds verder toenemende zuiveringslasten.

#### **5 Bijdrage aan EET doelstellingen**

Dit project is de eerste fase van een meerjarig traject 'Biologische waterstofproductie'. De bijdragen van dit project zijn dan ook een eerste aanzet tot de beoogde doorbraak op het gebied van 'substantieel gebruik van hernieuwbare grondstoffen' wat in dit geval het inzetten van een energiegewas of een agro-industrieel bijproduct voor productie van waterstof betekent.

De samenwerking van de partijen in dit consortium heeft mogelijk gemaakt dat de hele keten die aan het bioproces ten grondslag ligt, betrokken is in het concept. Hierdoor heeft de technologische innovatie rondom 'Biologische Waterstofproductie' een duidelijke gestalte gekregen die reikt van biomassaproductie via conversie tot en met een schatting van de productiekosten. Deze benadering met dit samenwerkingsverband heeft in zeer grote mate bijgedragen tot het profileren van de deelnemende partijen maar ook van Nederland als kennis- en innovatiecentrum op het gebied van biologische waterstofproductie. Belangrijke indicaties hiervoor zijn de internationale belangstelling tijdens het BioHydrogen 2002 congres in Ede, uitingen door de IEA en

door diverse spelers in het veld tijdens voorbereidingen voor EU projecten op het gebied van Sustainable Energy Systems.

Voor wat betreft de economische doelstellingen van het EET programma kan op dit moment slechts verwezen worden naar de omvang van de markt die met de haalbaar geachte systeemefficiëntie en de potentieel beschikbare biomassa bediend zal kunnen worden met de geproduceerde waterstof. Uit de huidige beschikbare biomassa, geschat op 5.3 tot 12 miljoen ton/j, zou 0.24 tot 0.53 miljoen ton H<sub>2</sub>/j in 700-1500 installaties geproduceerd kunnen worden. Met de 'target' productiekosten van 10 €/GJ H<sub>2</sub> wordt de te verwachten omzet in Nederland dan 340-750 miljoen €/j. Deze inzet van biomassa voor waterstofproductie leidt dan tevens tot ecologische voordelen op het gebied van CO<sub>2</sub>-emissie. Naar verwachting zal het inzetten van waterstof uit biomassa in Nederland een reductie van de CO<sub>2</sub>-emissie verwezenlijken die ligt tussen 4 en 10% van de huidige emissie. Deze bijdrage, door in feite 17- 38 PJ<sub>e</sub> te genereren via brandstofcellen, kan nog groter worden indien er gebruik gemaakt gaat worden van het sequestreren van het CO<sub>2</sub> dat tijdens het bioproces geproduceerd wordt. In tegenstelling tot ander waterstofproductietechnologieën is hier sprake van een zuivere CO<sub>2</sub>-stroom, die on-site en relatief geconcentreerd voorhanden komt en dus kosteneffectief ingevangen en verwijderd kan worden.

## 6 Trefwoordenlijst

Waterstof, duurzame energie, biomassa, fermentatie, bioproces, *Miscanthus*, aardappelstoomschillen, CO<sub>2</sub> sequestratie, brandstofcel

### Keywords

Hydrogen, renewable energy, biomass, fermentation, bioprocess, *Miscanthus*, potato steam peels, CO<sub>2</sub> sequestration, fuel cell

## 7 Publicaties

E.W.J. van Niel, M.A.W. Budde, G.G. de Haas, F.J. van der Wal, P.A.M. Claassen, A.J.M. Stams. Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. International Journal of Hydrogen Energy 27, 2002, 1391-1398

T. de Vrije, G.G. de Haas, G.B. Tan, E.R.P. Keijsers, P.A.M. Claassen. Pretreatment of *Miscanthus* for hydrogen production by *Thermotoga elfii*. International Journal of Hydrogen Energy 27, 2002, 1381-1390

P.A.M. Claassen, M.A.W. Budde, F.J. van der Wal, Zs. Kádár, G. E. van Noorden, T. de Vrije. Biological hydrogen production from biomass by thermophilic bacteria. In: Proceedings of 12<sup>th</sup> European Conference and Technology Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection, 17-21 June 2002, Amsterdam, eds. W. Palz et al., p529-532

J.W. van Groenestijn, J.H.O. Hazewinkel, M. Nienoord, P.J.T. Bussmann. Energy aspects of biological hydrogen production in high rate bioreactors operated in the thermophilic temperature range. *International Journal of Hydrogen Energy* 27, 2002, 1141-1147

S. Hoekema, M. Bijmans, M. Janssen, J. Tramper, R. H. Wijffels. A pneumatically agitated flat-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic photoheterotrophic growth of a purple non-sulfur bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy* 27, 2002, 1331 – 1338

Z. Kádár, T. de Vrije, M.A.W. Budde, Z. Szengyel, K. Réczey, P.A.M. Claassen. Hydrogen production from paper sludge. *Appl Biochem Biotechnol* 107, 2003, 557-566

Z. Kádár, T. de Vrije, G.E. van Noorden, M.A.W. Budde, Z. Szengyel, K. Réczey, P.A.M. Claassen. Yields from glucose, xylose and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2004, in press

T.Z.D. de Mes, A.J.M. Stams, J.H. Reith, G. Zeeman. Methane production by anaerobic digestion of wastewater and solid wastes (2003). *In: Reith J.H., Wijffels R.H., Barten H. Bio-methane & Bio-hydrogen: status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Novem, pp. 58-102. ISBN: 90-9017165-7*

T. de Vrije, P.A.M. Claassen. Dark hydrogen fermentations (2003). *In: Reith J.H., Wijffels R.H., Barten H. Bio-methane & Bio-hydrogen: status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Novem, pp. 103-121 ISBN: 90-9017165-7.*

A. de Groot. Methane and hydrogen: on the role of end-use technologies in shaping the infrastructure (2003). *In: Reith J.H., Wijffels R.H., Barten H. Bio-methane & Bio-hydrogen: status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Novem, pp. 29-58 ISBN: 90-9017165-7.*