

Piotr RYBARCZYK*, Karolina KUCHARSKA, Roman PAWŁOWICZ, Marian KAMIŃSKI

Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Polska

*Autor do korespondencji, e-mail: markamin@pg.gda.pl

Analiza składu fazy gazowej wytwarzanej podczas fermentacji ciemnej

Streszczenie: Fermentacja ciemna umożliwia otrzymywanie bio-wodoru z substratów pochodzenia biologicznego, np. z biomasy ligno-celulozowej. Kontrola i właściwe sterowanie przebiegiem procesu fermentacji ciemnej wymaga bieżącego monitoringu składu powstającej fazy gazowej. W niniejszej pracy przedstawiono metodykę analizy składu fazy gazowej z wykorzystaniem techniki GC-TCD-FID. Zaproponowana metodyka umożliwia oznaczenie następujących gazów w analizowanej mieszaninie: H_2 , O_2 , CH_4 i CO_2 . W pracy zwięźle omówiono metodę fermentacyjnego otrzymywania biopaliw gazowych z surowców ligno-celulozowych. Przedstawiono przykładowe wyniki analizy chromatograficznej próbek gazowych, pobieranych w trakcie fermentacji ciemnej z hydrolizatu ze zmielonej i wysuszonej wierzby energetycznej po wcześniejszej obróbce alkalicznej i hydrolizie enzymatycznej.

Słowa kluczowe: hydrolizaty, biomasa ligno-celulozowa, fermentacja ciemna, bio-wodór, produkty gazowe, GC-TCD-FID, analityka procesowa

Analysis of the composition of gas phase formed during dark fermentation

Abstract: Dark fermentation allows the production of biohydrogen from substrates of biological origin, e.g. from lignocellulosic biomass. The proper control of the course of the dark fermentation process requires the need of monitoring of the composition of the generated gas phase. This paper presents the methodology of gas phase composition analysis using the GC-TCD-FID technique. The proposed methodology makes it possible to determine the following gases in the analyzed mixture: H_2 , O_2 , CH_4 and CO_2 . The work discusses briefly the method of fermentative production of gaseous biofuels from lignocellulosic raw materials. Exemplary results of the GC-FID-TCD analysis carried out on gas samples collected during dark fermentation from milled and dried energetic willow, previously alkaline pre-treated and enzymatically hydrolysed, are presented.

Key words: hydrolysates, lignocellulosic biomass, dark fermentation, biohydrogen, gaseous products, GC-TCD-FID, process analytics

1. Wstęp (Introduction)

Biopaliwa drugiej generacji wytwarzane są z surowców niekonsumpcyjnych m.in. odpadów ligno-celulozowych. Korzyści płynące z bio-konwersji ligno-celulozy odpadowej to nie tylko pozyskiwanie energii, ale również zmniejszenie ilości składowanych odpadów organicznych. W przyszłości ważne znaczenie będą też miały procesy bio-rafinacji, sprzężone z otrzymywaniem biopaliw. Jedną z możliwości przetwarzania biomasy w celu otrzymania z niej biopaliw jest ciemna fermentacja beztlenowa. Mikroorganizmy biorące udział w fermentacji metabolizują łatwiej proste cząsteczki. Cząsteczki te można otrzymać prowadząc, przed etapem fermentacji, degradację złożonych związków biopolimerowych, będących głównym składnikiem biomasy ligno-celulozowej [1]. W tym celu stosuje się różne metody wstępnej obróbki surowca ligno-celulozowego, takie jak, rozdrabnianie, oddziaływanie promieniami mikrofalowymi czy obróbkę chemiczną lub fizykochemiczną. Przeprowadzenie wstępnej obróbki surowca tworzy warunki ułatwiające uwalnianie cukrów prostych podczas kolejnego etapu przetwarzania biomasy, tj. podczas hydrolizy enzymatycznej albo kwaśnej.

Technologie fermentacyjne to procesy wieloetapowe, w których właściwa fermentacja poprzedzona jest, jak wspomniano, m.in. hydrolizą enzymatyczną, mającą na celu degradację organicznej struktury związków polimerowych do prostych cząsteczek (monosacharydów, lotnych kwasów tłuszczowych, hydroksykwasów, aminokwasów), które są metabolizowane przez mikroorganizmy biorące udział w fermentacji.

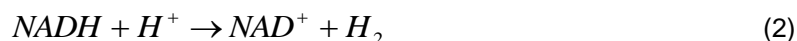
Hydroliza enzymatyczna [2] ma kluczowy wpływ na przebieg fermentacji i jej końcową wydajność. Jest też najdroższym etapem i limituje koszt całej technologii. Etap obróbki wstępnej surowca istotnie wpływa na szybkość hydrolizy enzymatycznej, obniżenie toksyczności produktów pośrednich, a także na stężenie produktów końcowych [3]. Właściwie przeprowadzona obróbka wstępna powinna zatem skutkować wzrostem wydajności całego procesu przy jednoczesnym obniżeniu jego kosztów. Wydajność procesu jest przy tym tożsama z zawartością bio-wodoru w gazie pofermentacyjnym, ale także z obecnością cennych biokomponentów w brzeczkach pofermentacyjnych.

Wiele prac badawczych w zakresie fermentacji ciemnej opisuje wpływ takich czynników jak rodzaj użytych mikroorganizmów [4, 5], czas hodowli, skład i sposób preparowania substratu czy sposób utrzymania warunków beztlenowych [5, 6]. Niewiele jest prac omawiających wpływ różnych czynników na przebieg fermentacji wodorowej dla substratów innych niż glukoza. W przypadku biomasy ligno-celulozowej badania dotyczą przede wszystkim możliwości jej fermentacji ciemnej do wodoru bez wstępnej obróbki [4, 7, 8], otrzymywania wodoru z biomasy po hydrolizie kwasowej [9–11], produkcji wodoru z wycieków z trzciny cukrowej wcześniej poddanej podgrzaniu do 100°C i zhydrolizowanej enzymatycznie [12], fermentacji ciemnej do wodoru słomy pszennej poddanej wstępnej obróbce w warunkach hydrotermalnych [13]. W niniejszej pracy fermentacji ciemnej poddawano rzeczywiste hydrolizaty otrzymane z wierzby energetycznej.

Podczas fermentacji ciemnej prowadzonej przez szczepy *Enterobacter aerogenes*, mogą powstać produkty gazowe, wynikające z metabolizmu bakterii. Reakcja biotransformacji glukozy jest pierwszym krokiem wszystkich szlaków metabolicznych zachodzących wewnątrzkomórkowo. Metabolizm glukozy do pirogronianu zachodzi zgodnie z reakcją (1) [14]:



Podczas reakcji (1) powstaje NADH (Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy), który w efekcie dalszego metabolizmu staje się źródłem wodoru, wg reakcji (2):



Beztlenowe i fakultatywnie beztlenowe bakterie wykorzystują oksydoreduktazę ferredoksynową Fd_{ox} do produkcji acetylokoenzymu A (reakcja (3)), która może być dalej metabolizowana do kwasów octowego lub masłowego [15]:



Maksymalna wydajność wodoru zależy od mikrobiologicznego układu enzymatycznego [16–19] i może wynosić 4 lub 2 mol H_2 / mol glukozy.

Enterobacter aerogenes i *Escherichia coli* w warunkach beztlenowych używają liazy pirogronianowo-mrówczanowej do generowania acetyloCoA, jak podano w reakcji (4) [20, 21]:



W zależności od szlaków metabolicznych jakie mogą zachodzić w komórkach bakteryjnych, do brzeczek pofermentacyjnych może przechodzić szereg substancji chemicznych, będących ubocznymi produktami metabolizmu. Substancje te podano w Tabeli 1. Zdolność wytwarzania wymienionych substancji wpływa dwójako na ocenę postępów i wydajności fermentacji. Z jednej strony substancje te mogą być izolowane i stanowić wartość dodaną, z drugiej strony obniżają wydajność wodoru i wpływają na przebieg procesu.

Tabela 1. Produkty uboczne fermentacji ciemnej.

Table 1. By-products formed during dark fermentation.

| Składnik brzeczek (Broth component) | Odnosićnik (Reference) | Mikroorganizmy (Microorganisms) |
|--|---------------------------|-------------------------------------|
| Lotne kwasy tłuszczowe | [22,23] | <i>Enterobacter, Rhodobacter</i> |
| kwas octowy | [22,23] | <i>Enterobacter, Rhodobacter</i> |
| kwas propionowy | [22,23] | <i>Enterobacter Rhodobacter</i> |
| kwas masłowy | [22,23] | <i>Enterobacter Rhodobacter</i> |

| | | |
|-------------------|---------------|--|
| kwask maleinowy | [23] | <i>Rhodobacter</i> |
| kwask bursztynowy | [23] | <i>Rhodobacter</i> |
| kwask mlekowy | [23, 24] [25] | <i>Rhodobacter, Lactobacillus</i> |
| d-mannitol | [23] | <i>Rhodobacter</i> |
| 1,3-propanodiol | [22,26] | <i>Clostridium</i> |
| etanol | [27] | <i>Escherichia coli, Klebsiella, Erwinia, Lactobacillus, Bacillus, Clostridia</i> |
| kwask cytrynowy | [28] | <i>Mucor piriformis, Citromyces pfefferianus, Paecilomyces divaricatum, Trichoderma viride</i> |

Do analizy składu fazy gazowej powszechnie wykorzystywana jest technika chromatografii gazowej, a najczęściej stosowanymi detektorami są: ciepłno-przewodnościowy tzn. termokonduktometryczny (TCD), uniwersalny, o niezbyt wysokiej czułości oraz o wysokiej czułości, w odniesieniu do związków organicznych, a szczególnie węglowodorów – płomieniowo-jonizacyjny (FID) [29]. W niniejszej pracy wykorzystano obydwie wymienione detektory, mając na uwadze możliwość oznaczania następujących składników fazy gazowej: H₂, O₂, CO₂, CH₄. Wybór wskazanych składników podyktowany jest możliwościami do wystąpienia produktami gazowymi podczas fermentacji ciemnej z badanym szczepem bakterii (*E. aerogenes* ATCC 35029). Należy przy tym podkreślić, że oznaczanie CH₄ wynika z potrzeby zapewnienia kontroli właściwego przygotowania wsadu i przebiegu procesu fermentacji. Jeżeli bowiem do prowadzenia fermentacji ciemnej nie używa się czystych kultur *E. aerogenes*, a np. osad czynny, należy sprawdzić czy procedura usuwania metanogenów, opisana przez Faloye [30] okazała się skuteczna, tj. czy w procesie fermentacji nie powstaje CH₄. Celem pracy jest ocena przydatności zastosowania techniki chromatografii gazowej z detektorami TCD i FID do analizy składu fazy gazowej powstającej podczas fermentacji ciemnej prowadzonej na przetworzonej wierzbie energetycznej.

Należy zaznaczyć, że w celu rozdzielania (i rozróżnienia) CO₂ i O₂, konieczne jest zastosowanie albo odpowiednio długiej kolumny wypełnionej sorbentem Porapak Q, albo krótkiej kolumny wypełnionej granulowanym zeolitem, np. typu 5A lub 3A. Wadą takiego rozwiązania jest konieczność stosowania programowania temperatury kolumny w celu skrócenia czasu retencji CO₂, a także konieczność okresowego aktywowania sorbentów typu zeolit ze względu na dezaktywację powodowaną przez parę wodną, którą gazy fermentacyjne są zawsze nasycone. Inną wadą takiego rozwiązania jest systematycznie obniżanie się wartości czasu retencji, szczególnie CO₂, w miarę dezaktywacji kolumny, powodowanej adsorpcją pary wodnej na powierzchni sorpcyjnej aktywowanych zeolitów.

W konsekwencji powyższego, w celu oznaczania składu gazów fermentacyjnych, optymalnym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie w opisywanych tu badaniach następujących warunków: długiej kolumny GC, wypełnionej względnie drobnoporowatym polimerowym sorbentem typu Porapak Q, izotermicznych warunków elucji w celu eliminacji dryfu detektora TCD, taniego azotu jako fazy ruchomej.

2. Część eksperymentalna (Experimental part)

2.1. Materiały (Materials)

W pracy wykorzystano następujące materiały:

- ditlenek węgla (butla),
- tlen (butla),
- metan jako gaz ziemny z sieci miejskiej w Gdańsku,
- wodór (5,5N, z generatora wodoru)
- NaOH cz.d.a. (POCH S.A.),
- H₂SO₄ cz.d.a. (Fluka),
- HCl cz.d.a. (POCH S.A.),
- viscozyme L z *Aspergillus sp.* Novozyme Corp. (Sigma Aldrich),
- glukozydaza ≥ 750 U/g z *Aspergillus sp.* Novozyme Corp. (Sigma Aldrich),
- bufor fosforanowy 0,1 mol/dm³, pH 5,7 (13,9 g NaH₂PO₄ + 35,85 g Na₂HPO₄ x 12H₂O, 500 ml wody),
- bufor McIlvaine'a, pH 4,5 (44,1 ml 0,02 mol/dm³ Na₂HPO₄ + 55,9 ml 0,01 mol/dm³ kwas octowy, 1000 ml wody),
- szczep bakterii *E. aerogenes* ATCC 35029,
- woda dejonizowana (kondensat z turbiny z Grupy LOTOS S.A.), filtrowana przez filtr 0,45 µm,
- gazy techniczne: azot (99,98%, Linde Gas)
- surowiec pochodzenia lignocelulozowego: wierzba energetyczna (*Salix viminalis L.* z okolic Wejherowa, Polska), susz zmielony o granulacji 0,75 mm.

2.2. Aparatura i wyposażenie (Instruments and equipment)

- Ogrodowy rozdrabniacz do gałęzi Meec Tools Garden Shredder 425,
- młynek ultraodśrodkowy RETSCH Ultra Centrifugal Mill ZM200,
- wytrząsarka termostatowana model GSL 1083,
- wirówka Biofuge 28RS,
- suszarka laboratoryjna WAMED,
- generator wodoru (Packard 9400 Hydrogen Generator),
- chromatograf gazowy AutoSystem XL z detektorami TCD i FID i z oprogramowaniem TurboChrom (Perkin Elmer),
- kolumna Porapak Q 100-120 mesh (6,5m x 1/8”),
- bioreaktor własnej konstrukcji o pojemności 1dm³ z pomiarem pH, stężenia tlenu, układami ogrzewania i regulacji temperatury oraz pomiaru i rejestracji objętości wytwarzanego gazu, wyposażony w króćce do pobierania próbek ciekłych i gazowych,
- pH metr PH-100ATC Voltcraft,
- tlenomierz z czujnikiem tlenu (VWR pHenomenal OX 4100H),
- układ ogrzewania i regulacji temperatury z mieszadłem magnetycznym (Yellow MAG HS 7),
- układ do pomiaru i rejestracji objętości wytwarzanego gazu (Universal Gas Flowmeter ADM2000, Agilent Technologies),
- strzykawka gazoszczelna, Hamilton,
- ekcykator,
- szkło laboratoryjne.

2.3. Metodyka badań (Methods)

Biomasę lignocelulozową rozdrobniono wstępnie za pomocą ogrodowego rozdrabniacza do gałęzi, a następnie zmielono w młynku ultradźwiękowym do otrzymania ziaren o średniej wielkości 0,75 mm.

Hydroлизę alkaliczną prowadzono w termostatowanej wytrząsarce, w szczelnie zamkniętej kolbie o objętości 250 ml. Do kolby wprowadzano 3 g rozdrobnionej biomasy (średnia wielkość ziaren 0,75 mm) i dodawano 60 ml roztworu zasady sodowej (6% NaOH). Kolbę umieszczano w termostatowanej wytrząsarce, pracującej w 65°C przez czas 4 godzin. Po zakończeniu hydroлизy alkalicznej, mieszaninę reakcyjną zobojętniano roztworem HCl, a następnie odwirowywano i filtrowano w celu oddzielenia osadu.

Osad powstały po hydroлизie chemicznej trzykrotnie przemywano wodą oraz dwukrotnie acetonem. Osad suszono przez 24 h w temperaturze 105°C i umieszczano w ekcykatorze. Tak przygotowany osad po hydroлизie chemicznej, poddawano następnie hydroлизie enzymatycznej. 0,2 g hydroлизatu po hydroлизie chemicznej umieszczano w kolbie o objętości 100 ml i dodawano 10 ml zawiesiny enzymów celulolitycznych immobilizowanych na ziemi okrzemkowej. Kolbę umieszczano w łaźni termostatowanej w temperaturze 42°C na okres 24 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną odwirowywano i filtrowano, oddzielając pozostały osad.

Objętość otrzymanego hydroлизatu poddawano następnie fermentacji ciemnej. Proces prowadzono z wykorzystaniem wstępnie odtlenionej pożywki przez okres 70 godzin, w bioreaktorze własnej konstrukcji. W trakcie pomiarów rejestrowano objętość powstającego gazu oraz pobierano próbki fazy gazowej. Próbki fazy gazowej pobierano z przewodu odprowadzającego gaz z bioreaktora, wyposażonego w króciec do pobierania próbek, zaopatrzony w membranę. Próbki pobierano za pomocą strzykawki gazoszczelnej, uprzednio wygrzewanej przez okres przynajmniej 15 minut w temperaturze 60°C.

Sporządzono mieszaninę wzorcową gazów, którą oznaczano podczas fermentacji ciemnej. Za pomocą detektora TCD oznaczano H₂, O₂ i CO₂, natomiast za pomocą detektora FID – CH₄. Wartości czasów retencji wymienionych gazów podano w Tabeli 2.

Tabela 2. Wartości czasu retencji poszczególnych składników mieszaniny gazowej.

Table 2. Values of Retention time gas mixture components.

| Gaz (Gas) | Czas retencji (Retention time) [min] |
|-----------------|--------------------------------------|
| H ₂ | 3,9 |
| O ₂ | 4,5 |
| CH ₄ | 5,4 |
| CO ₂ | 7,8 |

2.4. Warunki analizy chromatograficznej (Chromatographic conditions)

W Tabeli 3 przedstawiono wykorzystywaną kolumnę oraz warunki analizy chromatograficznej.

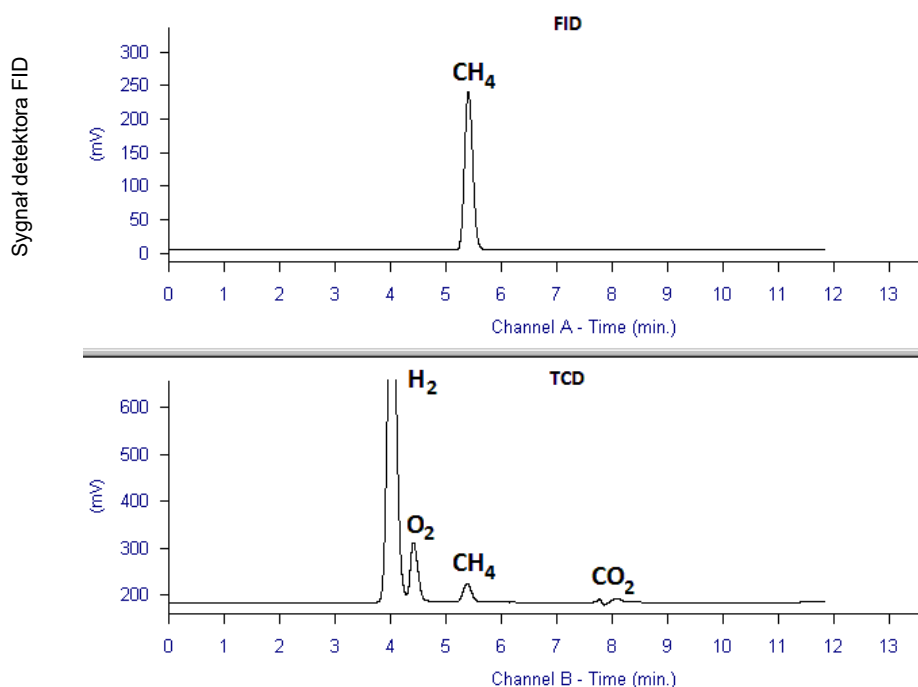
Tabela 3. Warunki analizy chromatograficznej.

Table 3. Chromatographic conditions.

| Parametr | FID | TCD |
|---------------------------------|---|-------------------|
| Kolumna | Porapak Q 100-120 mesh (6,5 m x 1/8") | |
| Gaz nośny | Azot | |
| Ciśnienie gazu nośnego | 200 kPa | |
| Podział strumienia gazu (split) | 15:1 | |
| Temperatura dozownika | 100°C | |
| Temperatura kolumny | 60°C | |
| Czas analizy | 15 min | |
| Warunki detekcji | Temperatura 100°C, przepływ H ₂ 30 ml/min, przepływ powietrza 300 ml/min | Temperatura 200°C |
| Objętość dozowanej próbki | 0,2 ml | |

3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

Przykład chromatogramu dla mieszaniny wzorcowej, zarejestrowany w trakcie analizy GC-TCD-FID, przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Przykład chromatogramu dla wzorcowej mieszaniny gazów. Warunki rozdzielania i analizy podano w Tabeli 3.

Fig. 1. Exemplary chromatogram of model gas mixture. Chromatographic conditions as given in Table 3.

W celu przeprowadzenia kalibracji, sporządzono mieszaniny gazowe o składzie podanym w Tabeli 4. Azot jako gaz nośny nie był oznaczany. Mieszaniny dozowano do chromatografu w objętościach od 0,05 ml do 0,25 ml, otrzymując w ten sposób krzywą kalibracyjną dla zakresów objętości gazów wyszczególnionych w Tabeli 5.

Tabela 4. Składy mieszanin gazowych do kalibracji.
Table 4. Composition of gas mixtures for calibration.

| Mieszanina (Mixture) | H ₂ | O ₂ | CH ₄ | CO ₂ | N ₂ |
|-------------------------|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | % objętościowy (volume %) | | | | |
| 1 | 20 | 40 | 10 | 0 | 30 |
| 2 | 10 | 25 | 25 | 0 | 40 |
| 3 | 5 | 10 | 40 | 0 | 45 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 35 | 65 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |

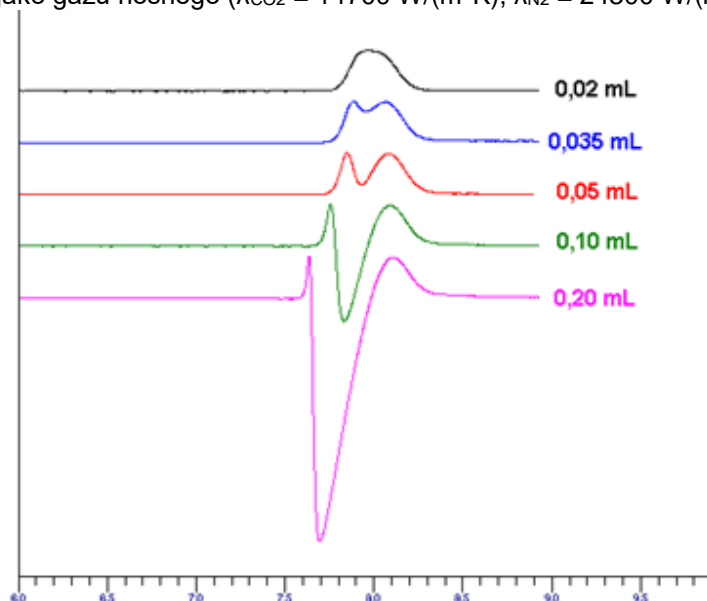
Wyniki kalibracji przeprowadzonej wg Tabeli 4 wskazują, że krzywe kalibracyjne dla poszczególnych gazów można z dobrą dokładnością opisać równaniem linii prostej (wartości współczynnika determinacji R² powyżej 0,99). Kalibracja umożliwiła wyznaczenie współczynników nachylenia tej linii prostej w układzie współrzędnych, gdzie na osi odciętych przedstawiono objętość gazu [ml], a na osi rzędnych powierzchnię otrzymanego pików [mV s] (*powierzchnia pików = f(objętość gazu)*). Wartości ww. współczynników zebrano w Tabeli 5.

Tabela 5. Wartości współczynników kierunkowych linii prostej w układzie *powierzchnia pików = f(objętość gazu)* – detektor TCD.

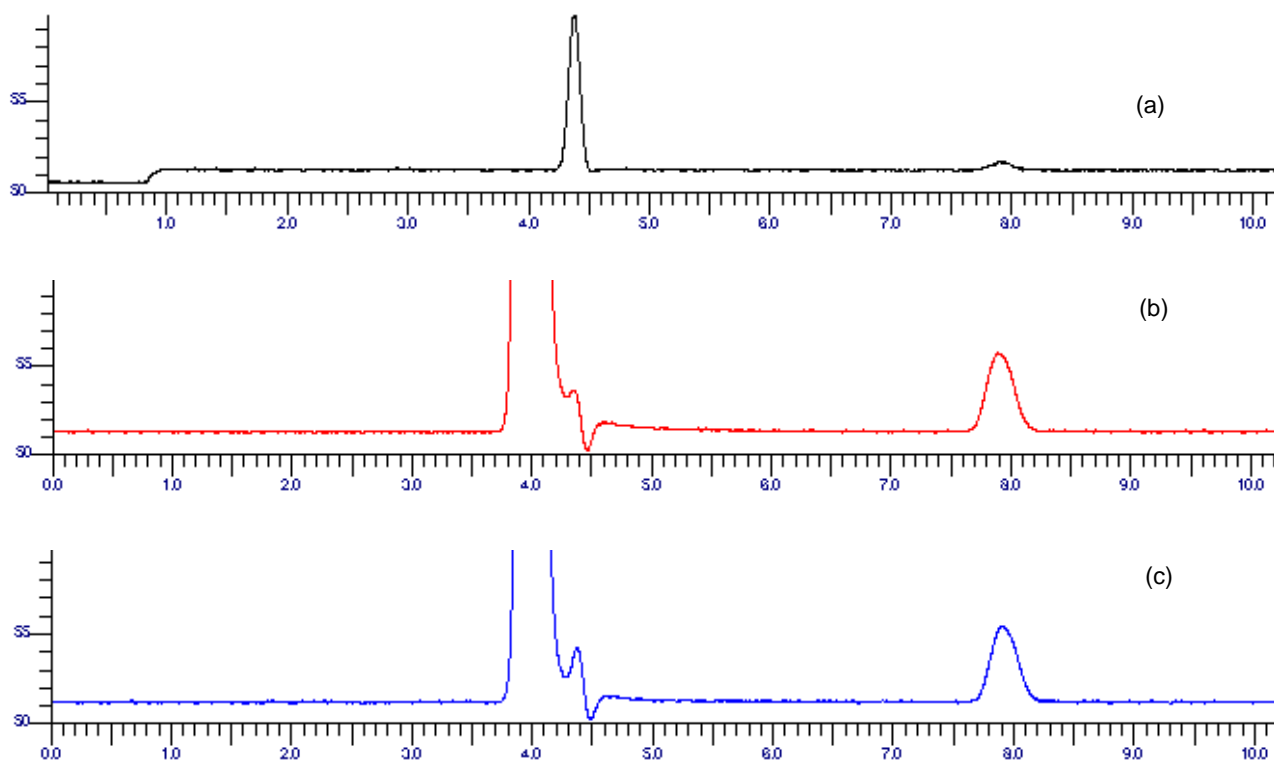
Table 5. Values of gradients of a straight line (*peak area = f(gas volume)*) – TCD detector.

| Gaz (Gas) | Współczynnik kierunkowy (line gradient) | R ² |
|-----------------|--|----------------|
| H ₂ | 109094,0 | 0,998 |
| O ₂ | 3575,5 | 0,998 |
| CH ₄ | 27855,0 | 0,995 |
| CO ₂ | 4663,7 | 0,996 |

Jak przedstawiono na rysunku 2, odpowiedź detektora TCD w przypadku ditlenku węgla, dla dozowanych objętości CO₂ powyżej 0,05 ml, jest ujemna tzn. wychylenie od linii podstawowej jest w przeciwną stronę niż dla innych gazów. Niejasna jest przyczyna tworzenia się swego rodzaju podwójnych pików w przypadku elucji bardzo małych objętości CO₂, a następnie ujemnych pików o nietypowym kształcie, dla większych objętości CO₂ eluowanego azotem z kolumny Porapak Q oraz z wykorzystaniem stosowanego tu detektora konduktometrycznego TCD. Podobnych efektów nie obserwuje się z zastosowaniem kolumny Porapak Q, detektora TCD oraz helu lub wodoru jako gazu nośnego. Wówczas w całym zakresie objętości eluowanego CO₂ piki chromatograficzne mają charakter zwykłych pików dodatnich o kształcie gaussowskim [31]. Wyjaśnienie opisanych anomalii wymaga dalszych badań, których rezultaty będą przedmiotem kolejnej publikacji. Ujemne piki otrzymywane dla dużych objętości CO₂ wynikają z niższego przewodnictwa cieplnego ditlenku węgla niż azotu jako gazu nośnego ($\lambda_{\text{CO}_2} = 14700 \text{ W}/(\text{m}^*\text{K})$, $\lambda_{\text{N}_2} = 24300 \text{ W}/(\text{m}^*\text{K})$) [32].



Rys. 2. Wpływ dozowanej objętości CO₂ na odpowiedź detektora TCD.
 Fig. 2. Influence of CO₂ dosage volume on response of TCD detector.



Rys. 3. Chromatogramy zarejestrowane podczas fermentacji ciemnej: a) po pierwszej godzinie of uruchomienia procesu; b) po 50 godzinach fermentacji; c) po 70 godzinach fermentacji (detektor TCD).

Fig. 3. Chromatograms obtained during dark fermentation: a) after first hour of process; b) after 50 hours of fermentation, c) after 70 hours of fermentation.

Na rysunku 3 przedstawiono chromatogramy uzyskane dla próbek pobieranych podczas fermentacji ciemnej, prowadzonej z wykorzystaniem wierzby energetycznej, poddanej uprzednio obróbce alkalicznej i hydrolizie enzymatycznej. Załączono chromatogramy uzyskane dla detektora TCD, ponieważ detektor FID nie wykazał obecności CH_4 w badanych próbkach gazowych. Jak widać na załączonych chromatogramach, w początkowym etapie fermentacji ciemnej obserwuje się bardzo niewielki pik pochodzący od tlenu (Rys. 3a). W dalszym przebiegu fermentacji można zaobserwować wzrost stężenia wodoru oraz niewielki wzrost stężenia CO_2 (produkty metabolizmu bakterii; Rys. 3b). W końcowej fazie procesu stężenie wodoru obniża się (Rys. 3c). W wyniku omawianej fermentacji ciemnej z przetworzonej wierzby energetycznej uzyskano w sumie ok. 604,5 ml gazu po 70 h prowadzenia fermentacji, zawierającego w 50 godzinie fermentacji (550 ml wytworzonego gazu) ok. 25,8 % obj. H_2 , a po 70 godzinach od rozpoczęcia fermentacji – ok. 9,7 % obj. H_2 . Oznaczone stężenia objętościowe O_2 i CO_2 wynosiły odpowiednio 2,13 i 0,00, 0,86 i 0,71 oraz 0,00 i 0,92, dla próbek pobranych w 1, 50 i 70 godzinie po rozpoczęciu fermentacji. Podane wartości stężeń określono na podstawie krzywych kalibracyjnych opisanych w Tabeli 5.

4. Podsumowanie

W pracy zaproponowano prostą metodykę badania składu fazy gazowej powstającej w czasie fermentacji ciemnej. Wykorzystano układ chromatograficzny CG-TCD-FID ze stosunkowo długą kolumną pakowaną (6,5 m), z fazą stacjonarną typu Porapak Q (100-120 mesh). Opracowana metodyka umożliwia w pełni skuteczne oznaczanie wodoru, tlenu i metanu. Oznaczanie szacunkowej zawartości ditlenku węgla z azotem jako gazem nośnym i sorbentem Porapak Q jest też możliwe. Jednak w zakresie niskich zawartości CO_2 otrzymywane wyniki mogą budzić wątpliwości, co wymaga dalszych badań. Spośród wymienionych gazów, wodór i ditlenek węgla to typowe gazy otrzymywane podczas fermentacji ciemnej z wykorzystaniem szczepów bakterii *E. aerogenes*. Monitoring tych gazów w czasie trwania fermentacji jest konieczny dla oceny prawidłowości jej przebiegu oraz szacowania wydajności. Proponowana metodyka może być z powodzeniem stosowana do oznaczania wodoru w fermentacyjnych procesach otrzymywania biowodoru z wykorzystaniem różnych kultur bakterii.

Summary

The paper describes a methodology for analysis of gas-phase composition using a CG-TCD-FID chromatographic system with a Porapak Q (100-120 mesh, 6,5 m in length) packed column. The proposed

methodology allows fully effective determination of hydrogen, oxygen and methane. Determination of the approximate content of carbon dioxide with nitrogen as the carrier gas and sorbent Porapak Q is also possible. However, in terms of low CO₂ content, the results obtained may raise doubts, which requires further investigations. Of the gases mentioned, hydrogen and carbon dioxide are typical gases obtained during dark fermentation using *E. aerogenes* strains. Monitoring of these gases during the fermentation is necessary to assess the correctness of the course and the efficiency of the fermentation. The proposed methodology can be successfully applied for the determination of hydrogen in the fermentation processes of obtaining biohydrogen using various bacterial cultures.

Podziękowania (Acknowledgements)

Praca finansowana z grantu NCN, pt. „Badania zasadowej hydrolizy biomasy ligno-celulozowej oraz warunków konwersji produktów do biogazów” [na podstawie umowy nr UMO-2014/13/B/ST8/04258].

This work was supported by the National Science Centre, „Research of alcalic hydrolysis of lignocellulosic biomass and conversion of hydrolysis products to fuel-bio- gases” Poland [grant number 2014/13/B/ST8/04258].

5. Literatura (Literature)

- [1] Y. Sun, J. Cheng, *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*, *Bioresource Technology*, 83 (2002) 1-11. doi:10.1016/S0960-8524(01)00212-7.
- [2] V.S. Chang, M.T. Holtzaple, *Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84 (2000) 5-37. doi:10.1385/ABAB:84-86:1-9:5.
- [3] P. Kumar, D.M. Barrett, M.J. Delwiche, P. Stroeve, *Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production*, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(2009) 13-29. doi:10.1021/ie801542g.
- [4] L. Magnusson, R. Islam, R. Sparling, D. Levin, N. Cicek, *Direct hydrogen production from cellulosic waste materials with a single-step dark fermentation process*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33 (2008) 5398–5403. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.06.018.
- [5] S.M. Kotay, D. Das, *Microbial hydrogen production from sewage sludge bioaugmented with a constructed microbial consortium*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (2010) 10653–10659. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.03.059.
- [6] I. Nopens, L. Benedetti, U. Jeppsson, M.-N. Pons, J. Alex, J.B. Copp, K. V. Gernaey, C. Rosen, J.-P. Steyer, P.A. Vanrolleghem, *Benchmark Simulation Model No 2: finalisation of plant layout and default control strategy*, *Water Science and Technology*, 62 (2010) 1967-1974. doi:10.2166/wst.2010.044.
- [7] M. Gupta, P. Velayutham, E. Elbeshbishy, H. Hafez, E. Khafipour, H. Derakhshani, M.H. El Naggari, D.B. Levin, G. Nakhla, *Co-fermentation of glucose, starch, and cellulose for mesophilic biohydrogen production*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 39 (2014) 20958–20967. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.10.079.
- [8] R.S. Prakasham, T. Sathish, P. Brahmaiah, *Imperative role of neural networks coupled genetic algorithm on optimization of biohydrogen yield*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (2011) 4332–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.01.031.
- [9] N. Qureshi, B.C. Saha, R.E. Hector, B. Dien, S. Hughes, S. Liu, L. Iten, M.J. Bowman, G. Sarath, M.A. Cotta, *Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II - Use of corn stover and switchgrass hydrolysates*, *Biomass and Bioenergy*, 32 (2010) 176–183. doi:10.1016/j.biombioe.2009.12.023.
- [10] G.L. Cao, W.Q. Guo, A.J. Wang, L. Zhao, C.J. Xu, Q.L. Zhao, N.Q. Ren, *Enhanced cellulosic hydrogen production from lime-treated cornstalk wastes using thermophilic anaerobic microflora*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 (2012) 13161–13166. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.03.137.
- [11] S. Chang, J.Z. Li, F. Liu, *Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge*, *Renewable Energy*, 36 (2011) 1517–1522. doi:10.1016/j.renene.2010.11.023.
- [12] P.B.N. Beukes, *Effect of alkaline pre-treatment on enzyme synergy for efficient hemicellulose hydrolysis in sugarcane bagasse*, *Bioresource Technology* 102 (2011) 5207–13. doi:10.1016/j.biortech.2011.01.090.
- [13] P. Kongjan, S. O-Thong, M. Kotay, B. Min, I. Angelidaki, *Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture*, *Biotechnology and Bioengineering*, 105 (2010) 899–908. doi:10.1002/bit.22616.

- [14] R.K. Thauer, K. Jungermann, K. Decker, *Energy Conservation in chemotrophic anaerobic bacteria*, Bacteriological Reviews, 41 (1977) 100-180.
- [15] J.P. Dworzanski, R.M. Buchanan, J.N. Chapman, H.L.C. Meuzelaar, *Characterization of Lignocellulosic Materials and Model Compounds By Combined Tg/(Gc)/Ft Ir/Ms*, Symp. Pyrolysis Nat. Synth. Macromol, 36 (2006) 725–732.
- [16] G. Marbán, T. Valdés-Solís, *Corrigendum to “Towards the hydrogen economy?”*, International Journal of Hydrogen Energy, 32 (2008). doi:10.1016/j.ijhydene.2007.11.002.
- [17] K. Uyeda, J.C. Rabinowitz, *Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase. IV. Studies on the reaction mechanism*, The Journal of Biological Chemistry, 246 (1971) 3120-3125.
- [18] B.B. Buchanan, *Ferredoxin-Linked Carboxylation Reactions*, The Enzymes, 6 (1972) 193-216. doi:10.1016/S1874-6047(08)60041-4.
- [19] H. Bothe, B. Falkenberg, U. Nolteernsting, *Properties and function of the pyruvate: Ferredoxin oxidoreductase from the blue-green alga Anabaena cylindrica*, Archives of Microbiology, 96 (1974) 291-304. doi:10.1007/BF00590185.
- [20] B.J. Bachmann, *Derivations and Genotypes of Some Mutant Derivatives of Escherichia coli K-12, in Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, (1996). doi:http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004(88)90241-1.
- [21] J. Knappe, H.P. Blaschkowski, P. Gröbner, T. Schmitt, *Pyruvate Formate-Lyase of Escherichia coli: the Acetyl-Enzyme Intermediate*, European Journal of Biochemistry, 50 (1974) 253-263. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03894.x.
- [22] P. Muri, I.G. Osojnik-Črnivec, P. Djinovič, A. Pintar, *Biohydrogen Production from Simple Carbohydrates with Optimization of Operating Parameters*, Acta Chimica Slovenica, 63 (2016) 154–164. doi:10.17344/acsi.2015.2085.
- [23] T. Assawamongkholisiri, A. Reungsang, *Photo-fermentational hydrogen production of Rhodobacter sp. KKU-PS1 isolated from an UASB reactor*, Electronic Journal of Biotechnology, 18 (2015) 221–230. doi:10.1016/j.ejbt.2015.03.011.
- [24] S. Sangyoka, A. Reungsang, C.-Y. Lin, *Optimization of biohydrogen production from sugarcane bagasse by mixed cultures using a statistical method*, Sustainable Environment Research, 26 (2016) 235–242. doi:10.1016/j.serj.2016.05.001.
- [25] S.I. Mussatto, M. Fernandes, I.M. Mancilha, I.C. Roberto, *Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain*, Biochemical Engineering Journal, (2008). doi:10.1016/j.bej.2008.01.013.
- [26] V.K. Garlapati, U. Shankar, A. Budhiraja, *Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products*, Biotechnology Reports, 9 (2016) 9–14. doi:10.1016/j.btre.2015.11.002.
- [27] K. Karimi, M.J. Taherzadeh, *A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility*, Bioresource Technology, 203 (2016) 348–356. doi:10.1016/j.biortech.2015.12.035.
- [28] T. Watanabe, A. Suzuki, H. Nakagawa, K. Kirimura, S. Usami, *Citric acid production from cellulose hydrolysate by a 2-deoxyglucose-resistant mutant strain of Aspergillus niger*, Bioresource Technology, 66 (1998) 271-274. doi: 10.1016/S0960-8524(98)80029-1.
- [29] Cooke M, Hill E, Tw S, Poole CF. (Ed.), Encyclopedia of Separation Science, 2000.
- [30] F.D. Faloye, E.B. Gueguim Kana, S. Schmidt, *Optimization of hybrid inoculum development techniques for biohydrogen production and preliminary scale up*, International Journal of Hydrogen Energy, 38 (2013) 11765–11773. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.06.129.
- [31] Kamiński M. Niepublikowane wyniki badań własnych.
- [32] Badyda K., *Skorygowany wzór Sutherlanda do obliczeń przewodności cieplnej gazów*, Biuletyn Instytutu Techniki Ciepłej Politechniki Warszawskiej, 85 (1997) 45-54.