APARATURA
BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Biokonwersja materiałów odpadowych do wodoru na drodze fermentacji ciemnej z wykorzystaniem *Enterobacter aerogenes*

KAROLINA KUCHARSKA, EDYTA SŁUPEK, MARIAN KAMIŃSKI
POLITECHNIKA GDAŃSKA, WYDZIAŁ CHEMICZNY, KATEDRA INŻYNIERII PROCESOWEJ I TECHNOLOGII CHEMICZNEJ

Słowa kluczowe: wodór, biokonwersja, *Enterobacter aerogenes ATCC 13048*, fermentacja ciemna, biomasa

STRESZCZENIE:

W drodze fermentacji ciemnej z wykorzystaniem względnych beztlenowców z gatunku *Enterobacter aerogenes* można otrzymać wodór. Wydajność wytwarzania wodoru technikami fermentacyjnymi jest silnie zależna od zastosowanych warunków w zakresie pH, temperatury, składu brzeczek fermentacyjnych, zawartości tlenu czy nawet obecności substancji o potencjalnie inhibitującym wpływie na hodowlę mikrobiologiczną [1-4]. W pracy opisano badania przebiegu fermentacji ciemnej w czterech wspólnie termostatowanych szklanych bioreaktorach o pojemności roboczej 50 mL. Badania dotyczyły różnic w produktywności wodoru w zależności od rodzaju zastosowanego źródła węgla. Uzyskane przykładowe rezultaty pozwoliły na ocenę efektywności procesu w odniesieniu do wytwarzania wodoru z różnego rodzaju surowców, tj. czystej glukozy, gliceryny odpadowej i hydrolizatów alkalicznych trawy polnej, uzyskanych zgodnie z procedurą opisaną przez autorów w pracy [5].

Bioconversion of waste materials to hydrogen via dark fermentation using *Enterobacter aerogenes*

Keywords: hydrogen, bioconversion, *Enterobacter aerogenes ATCC 13048*, dark fermentation, biomass

ABSTRACT:

Hydrogen can be obtained via dark fermentation with the use of anaerobic *Enterobacter aerogenes*. The efficiency of hydrogen production by fermentation techniques is strongly dependent on the conditions used i.e. the pH range, temperature, composition of fermentation broths, oxygen content, or even the presence of substances with potentially inhibitory effects on the microbiological culture [1-4]. The paper describes the study of dark fermentation in four parallel thermostatic glass bioreactors with a working capacity of 50 mL each. The research concerned differences in hydrogen productivity depending on the type of carbon source used. Obtained exemplary results allowed to evaluate the effectiveness of the process [6] in relation to the production of hydrogen from various types of raw materials, i.e. pure glucose, waste glycerol and alkaline meadow grass hydrolysates, obtained according to the procedure given in [5].

1. WSTĘP

Bioreaktory lub biofermentory są naczyniami reakcyjnymi, w których zachodzą reakcje chemiczne i biochemiczne polegające na przekształceniu substratu w pożądany produkt końcowy. Są one wykorzystywane w produkcji leków i biomasy, biotransformacji konkretnego związku lub degradacji odpadów [7]. W bioreaktorach zachodzą reakcje w obecności biokatalizatorów, tj. enzymów izolowanych z mikroorganizmów, komórek zwierzęcych lub roślinnych bądź z ich części. Bioreaktor zapewnia również odpowiednie środowisko reakcji w warunkach aseptycznych (zwłaszcza przy użyciu mikroorganizmów wrażliwych na inne kultury) i pozwala kontrolować inne warunki środowiskowe, takie jak zawartość tlenu, pH i temperatura. Bioreaktory można stosować do oczyszczania ścieków w browarach, mleczarniach, w produkcji soków lub w gorzelniach, do oczyszczania ścieków komunalnych, do otrzymywania enzymów, kwasów organicznych lub antybiotyków, do produkcji białek terapeutycznych i do produkcji metabolitów wtórnych w zagadnieniach opartych o biotechnologię roślin [7-9].

Zestawy minibioreaktorów są używane w skali laboratoryjnej, aby zapewnić pełną funkcjonalność i tworzyć konfiguracje dla dowolnej aplikacji lub zachować skalę prowadzonego procesu. Ze względu na zmniejszoną skalę hodowli, koszty badań i czas potrzebny na przygotowanie systemu do pracy, minibioreaktory zapewniają powtarzalność i bezpieczeństwo reakcji lub biokonwersji, jednocześnie pozwalając na zaoszczędzenie czasu. Hodowle komórkowe na małą skalę są często wykorzystywane do celów przesiewowych [10]. Bakterie, drożdże i inne kultury można poddawać badaniom przesiewowym jako hodowle okresowe z odżywianiem lub bez, w celu optymalizacji składu pożywek i warunków hodowli.

W celu wytworzenia wodoru poprzez ciemną fermentację przy użyciu kultur *Enterobacter aerogenes* skonstruowano układ czterech równoległych bioreaktorów o objętości roboczej 50 mL. Warunki procesu charakterystyczne dla hodowli mogą być badane w zależności od składu brzeczki. Układ czterech równoległych bioreaktorów umożliwia przeprowadzenie fermentacji kontrolnej równolegle z potrójną hodowlą w powtarzalnych warunkach, co jest kluczowe dla celów statystycznych. Niewielkie rozmiary bioreaktorów znacznie ułatwiają i przyspieszają przygotowywanie naczyń i ich sterylizację, zmniejszając ilość pożywki potrzebnej do prowadzenia procesu, co zmniejsza koszty instalacji i jej eksploatacji [11].

Wodór jest często uważany za paliwo przyszłości ze względu na bardzo wysoką wartość energetyczną równą 10-13 $MJ*m^{-3}$ i ze względu na jego wartości ekologiczne. Stosuje się kilka metod wytwarzania wodoru na skalę przemysłową, tj. elektrolizę wody, katalityczny reforming gazu ziemnego i konwersję tlenku węgla z parą wodną [12-15].

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Zaproponowano zastosowanie odpadowych hydrolizatów gliceryny i biomasy, tj. hydrolizatów trawy polnej, w celu zbadania możliwości wykorzystania zaprojektowanego układu równoległego zestawu bioreaktorów. Produkcja wodoru jest naturalnym szlakiem metabolicznym wielu prokariontów, a proces produkcji wodoru przez mikroorganizmy jest znany od wielu lat. Jednak najczęściej glukoza jest podstawowym surowcem do transformacji energii w komórce, gdyż wchodzi bezpośrednio w cykl glikolizy, zapewniając produkcję energii magazynowanej w ATP. Wygenerowana energia zużywana jest następnie w procesach anabolicznych [16, 17]. Pierwszy etap w szlaku metabolicznym zachodzącym w *Enterobacter aerogenes* stanowi metabolizm glukozy w kierunku pirogronianu, zgodnie z reakcją (1):

$$C_6H_{12}O_6 + 2NAD^+ \rightarrow 2CH_3COCOO^- + 4H^+ + 2NADH \quad \Delta G^0 = -121{,}1\frac{kJ}{mol} \qquad (1)$$

NADH powstający w reakcji (1) jest źródłem wodoru, który powstaje podczas późniejszej regeneracji produkowanego NADH w reakcji (2):

$$NADH + H^+ \rightarrow NAD^+ + H_2 \qquad (2)$$

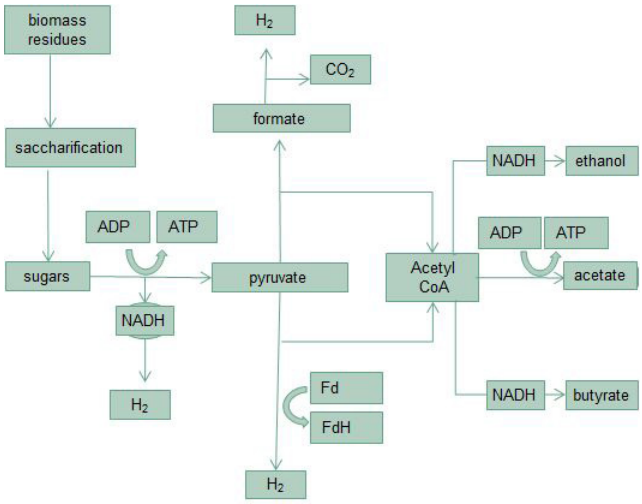
Enterobacter aerogenes wykorzystuje oksydoreduktazę ferredoksyny (3) i liazę pirogronianowo-mrówczanową (4) produkcji acetylokoenzymu A:

$$Pirogronian + CoA + Fd_{ox} \leftrightarrow acetyloCoA + CO_2 + Fd_{red} \qquad \Delta G^0 = -19{,}2\frac{kJ}{mol} \qquad (3)$$

$$Pirogronian + CoA \leftrightarrow acetyloCoA + mrówczan \quad \Delta G^0 = -16{,}3\frac{kJ}{mol} \qquad (4)$$

Istnieje wiele bakterii, które są w stanie wytwarzać wodór z gliceryny, ale dotychczas nie ma opracowanej technologii w skali przemysłowej z powodu pewnych problemów związanych z optymalizacją procedury fermentacji, występujących nawet w skali laboratoryjnej [18]. Glicerol jest substratem do glukoneogenezy, tj. wytwarzania glukozy z substancji niecukrowych. Szlak ten różni się od metabolizmu glukozy, ponieważ glikoliza (konwersja glukozy do pirogronianu) jest preferowana termodynamicznie (ΔG = -20 kcal*mol^{-1}) [1]. Glukoneogenezy nie można połączyć z glikolizą w tym samym czasie, ponieważ działania poszczególnych enzymów obu ścieżek wykluczają współpracę. Ponadto glukoneogeneza nie jest dokładnie odwróceniem produkcji pirogronianu z glukozy. Proces wytwarzania glukozy z substratów niecukrowych, tj. glicerolu, jest korzystny termodynamicznie, chociaż ma wyraźnie mniejszą siłę napędową (ΔG = -9 kcal*mol^{1}) [19]. Możliwość opłacalnego wytwarzania wodoru z gliceryny odpadowej może pomóc w rozwiązaniu zarówno problemów związanych z nadmiarem gliceryny, jak i produkcji ekologicznej i tańszej energii [20-22]. Również biomasa lignocelulozowa ma ogromny potencjał w produkcji wodoru dzięki dużej dostępności, niskim kosztom pozyskania i niskiej emisyjności gazów cieplarnianych [23, 24]. Produkcja wodoru z biomasy lignocelulozowej (skrót BMLC) coraz częściej jest rozważana w wielu zespołach badawczych. Zwraca się uwagę, że dla BMLC nie trzeba rozważać problemów związanych z debatą na temat konkurencji między produkcją żywności i paliw.

Schemat opisujący przebieg obróbki BMLC od substratu do wodoru z uwzględnieniem reakcji 1, 2, 3, 4 przedstawiono na Rysunku 1. Podstawowymi źródłami BMLC są rośliny energetyczne, drewno liściaste, drewno iglaste oraz odpady z przetwarzania zbóż i trawy [1, 25, 26].



Rysunek 1 Możliwe szlaki metaboliczne i ich produkty podczas ciemnej fermentacji anaerobowej (ADP – adenozyno difosforan, ATP – adenozyno trójfosforan, Fd – ferredoksyna, FdH – ferredoksyna, zredukowana, NADH – zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, biomass residues – biomasa, saccharification – scukrzanie, sugars – cukry, formate – kwas mrówkowy, pyruvate – kwas pirogronowy, butyrate – kwas butanowy)

Celem pracy jest opracowanie sprzętu do przeprowadzenia biokonwersji materiałów odpadowych do wodoru poprzez ciemną fermentację w skali laboratoryjnej. Rozważono możliwość prowadzenia procesów biokonwersji w czterech wspólnie termostatowanych równoległych bioreaktorach o małej objętości roboczej 50 mL. Eksperyment zaplanowano w niewielkich objętościach ze względu na wstępny charakter badań. Pod uwagę wzięto także konieczność wskazania parametrów mających istotny wpływ na przebieg procesu, a zastosowanie małych objętości brzeczek pozwala zmniejszyć zarówno koszty ekonomiczne, jak i ekologiczne, związane z przeprowadzanymi procesami. Identyfikacja parametrów istotnych dla procesu może być rozwijającym się wkładem w zwiększanie potencjału metody w skali laboratoryjnej.

2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Wstępną obróbkę alkaliczną i enzymatyczne scukrzanie biomasy lignocelulozowej przeprowadzono zgodnie z [27]. Procedura przygotowania hydrolizatów biomasy lignocelulozowej wymaga wieloetapowej procedury, uwzględniającej fragmentację i kondycjonowanie surowca, hydrolizę alkaliczną i scukrzanie enzymatyczne. Pierwszym etapem obróbki biomasy lignocelulozowej było rozdrobnienie surowca. Mielenie biomasy odbywało się w dwóch etapach, początkowo przy użyciu kruszarki ogrodowej, a następnie młyna laboratoryjnego. Stwierdzono, że największa możliwa fragmentacja jest najkorzystniejsza z punktu widzenia dalszych etapów przetwarzania, jednak ze względu na wysokie koszty procesu rozdrabniania najwyższą możliwą wartość granulacji określono doświadczalnie, co pozwala uzyskać wyniki bliskie optymalnym w kolejnych etapach przetwarzania. Zastosowaną granulację na poziomie 0,75 mm można uzyskać już po dwuetapowym mieleniu. Następnym etapem obróbki była hydroliza alkaliczna, z zastosowaniem katalizatora zasadowego, tj. monoetanoloaminy (skrót MEA), do usuwania ligniny i jej pochodnych. Po początkowej obróbce alkalicznej frakcje stałe i ciekłe oddzielono przez odwirowanie. Stałą pozostałość zastosowano w następnym etapie przetwarzania, tj. podczas hydrolizy enzymatycznej. Wstępna obróbka materiału lignocelulozowego przez hydrolizę alkaliczną jest kluczowym krokiem w ułatwianiu uwalniania cukrów prostych podczas hydrolizy enzymatycznej z celulozy i hemicelulozy, ponieważ poprawia dostępność enzymów do polisacharydów, tj. celulozy i hemicelulozy. W celu skutecznej modyfikacji złożonej struktury materiałów lignocelulozowych konieczne jest określenie optymalnej, zrównoważonej kombinacji mieszanek enzymów celulolitycznych. Optymalizacja warunków hydrolizy została opublikowana z uwzględnieniem różnych rodzajów biomasy [24, 27], a następnie zastosowana w tej publikacji w odniesieniu do trawy polnej. Stwierdzono, że w przypadku BMLC wymagane są obydwa wymienione etapy obróbki wstępnej i scukrzania w celu poprawy skuteczności procesu [27, 28].

Analizę próbek gazowych i ciekłych pobranych podczas procesu przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w publikacji [24]. Obecność i stężenie monosacharydów redukujących i disacharydów (glukozy, ksylozy, arabinozy, mannozy, galaktozy i celobiozy) określono za pomocą HPLC. Frakcję cukrową przesączono kolejno przez kationową i anionową kolumnę jonowymienną, a następnie energicznie wstrząsano (30 min). Procedurę zakończono, wykonując filtrację przez filtr strzykawkowy. Następnie eluent odparowano w strumieniu azotu. Frakcję cukrową rozpuszczono w 200 µl wody i skierowano do analizy HPLC (objętość dozowana 50 µl). Analiza HPLC cukrów: HPLC-RID (Knauer Smartline RID 2300, Berlin, Niemcy); temperatura rozdzielania: 600°C; kolumna: kolumna Rezex Pb^{2+} (300 × 7,8 mm, 8 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA); eluent: woda; przepływ: 0,6 ml/min.

Zmiany w składzie gazu podczas fermentacji ciemnej oznaczano za pomocą chromatografii gazowej. Gazowe produkty fermentacji (H_2 i CO_2) analizowano za pomocą chromatografu gazowego (AutoSystem XL, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) wyposażonego w kolumnę Porapak Q (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Niemcy), o parametrach: 100-120 mesh; długość 6,5 m; średnica 1/8 detektor przewodności cieplnej (TCD). Temperaturę pieca ustawiono na 60°C. Oprogramowanie Turbochrom zostało użyte do zapisu i przetwarzania chromatogramów. Próbki gazowe pobierano z reaktora w fazie opóźnienia, wykładniczej i terminalnej wzrostu hodowli. Wzrost hodowli *E. aerogenes* monitorowano przez pomiar gęstości optycznej hodowli przy długości fali λ = 600 nm [24]. Dla celów porównawczych instalacja do równoległych ciemnych fermentacji w czterech równoległych bioreaktorach została wyposażona w system pomiarowy dla objętości wydzielanego gazu (Rys. 2).

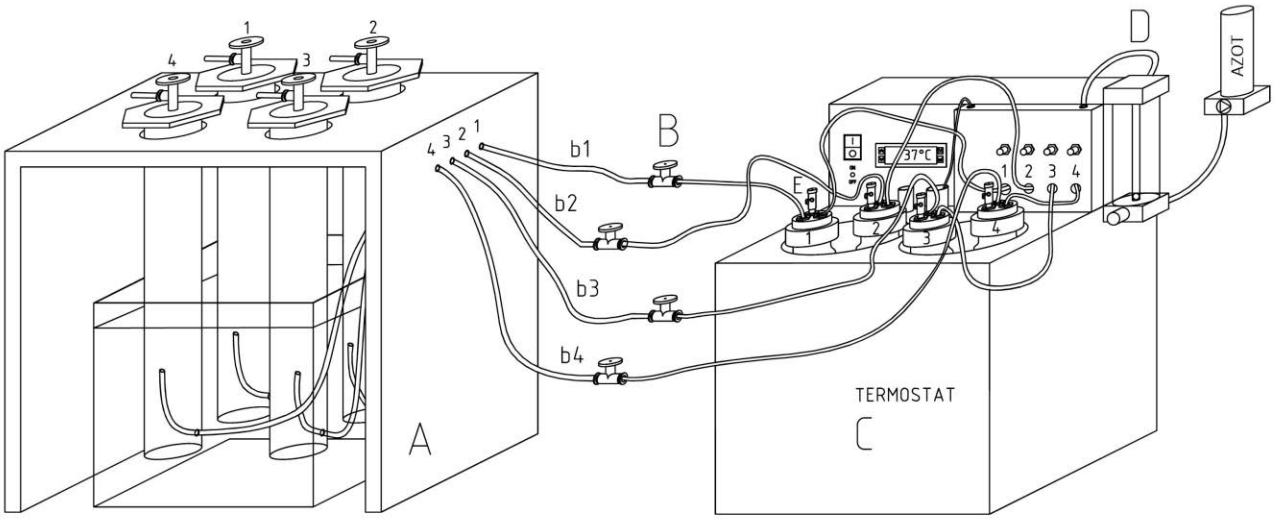
MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Ciemną fermentację przeprowadzono w sterylnych 80-mililitrowych szklanych bioreaktorach o objętości roboczej równej 50 mL z wykorzystaniem *Enterobacter aerogenes* (Selectrol TCS, Biosciences Ltd.). W skład brzeczki fermentacyjnej wchodziła buforowana woda peptonowa (Biomaxima) i źródła węgla, tj. glukoza, hydrolizaty trawy polnej i gliceryna (stężenie źródła węgla równe 10 g na L). Początkowe pH wynosiło 7,00 (regulacja za pomocą 1 M NaOH). Bioreaktory zaszczepiano 5 mL hodowli *Enterobacter aerogenes* w hodowli płynnej przy OD_{600} = 2,40 ±0,13. Nie stosowano mieszania, nastawa temperatury była równa 37,0°C. Zastosowano czas fermentacji 60 h, ponieważ odpowiada on późnej logarytmicznej fazie śmierci hodowli *Enterobacter aerogenes* w warunkach okresowych [24, 29]. Skład brzeczek fermentacyjnych podano w Tabeli 1.

Gaz uzyskiwany podczas fermentacji zbierano w odwróconych, napełnionych wodą, 1000-mililitrowych butlach. Odpływ gazu przeprowadzono za pomocą rury teflonowej pod powierzchnią wody do cylindra, jak pokazano na Rysunku 2. Objętość wytwarzanego gazu jest mierzona z dokładnością do 5 mL. Rysunek 2 przedstawia sprzęt do kontroli ciemnej fermentacji w systemie 4 × 50 mL. Termostatowane (C) bioreaktory szklane (1-4) zawierają 50 ml bulionu fermentacyjnego. W bioreaktorach warunki beztlenowe są ustalane przy użyciu linii D, która jest podłączona do azotu z sieci i do przewodów zasilających każdy bioreaktor.

Dzięki niewielkim rozmiarom bioreaktor zajmuje niewiele miejsca w laboratorium, ponadto hodowla na małą skalę pozwala na obniżenie kosztu pożywek fermentacyjnych, wynikające z małego ich zużycia.

Wytworzone gazy są odprowadzane z bioreaktorów do układu pomiarowego (A) dzięki rurom (b1-b4) – w ten sposób można odczytać całkowitą objętość powstających gazów. Zawór trójdrożny (B) jest umieszczony na przewodzie gazowym, co umożliwia pobieranie próbek gazu za pomocą gazoszczelnej strzykawki (Rys. 3a). Pojedynczy bioreaktor i schemat połączeń systemu zbierania gazu przedstawiono na Rysunku 3b.

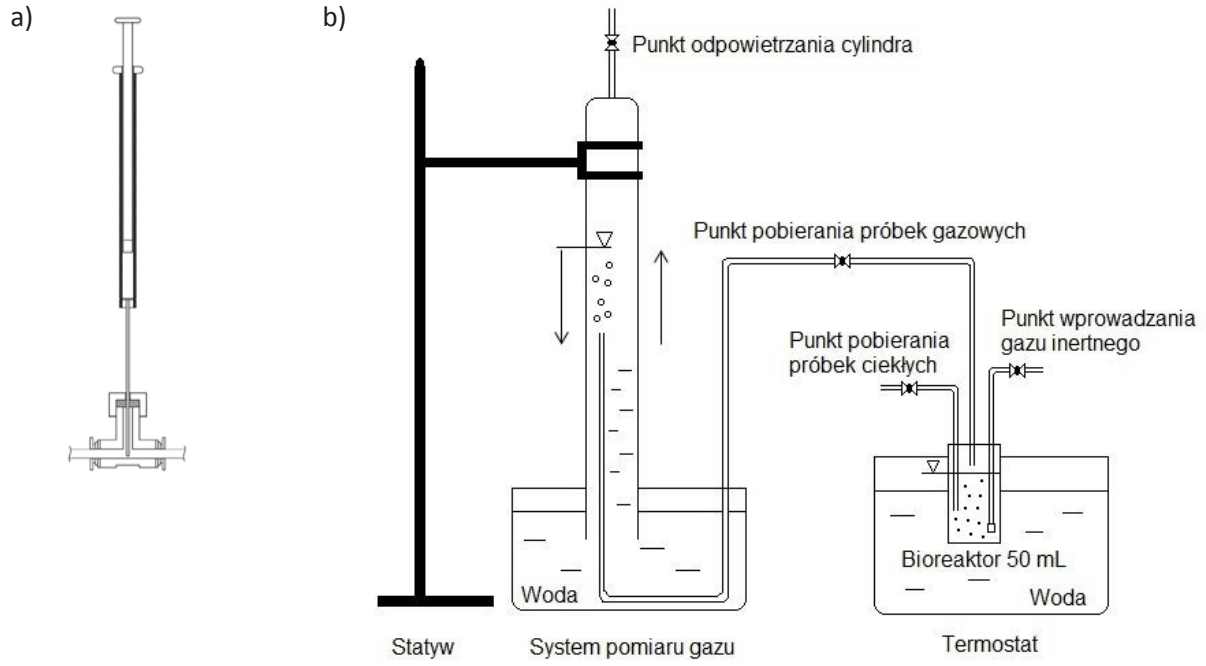


Rysunek 2 Układ czterech bioreaktorów do ciemnej fermentacji zróżnicowanych brzeczek połączony z pomiarem objętości gazu (A – system pomiaru gazu, B – zawór trójdrożny, C – termostat, D – linia azotu, E – bioreaktory 4 × 50 ml)

Tabela 1 Skład brzeczek fermentacyjnych w fermentacji ciemnej

Składnik	Zawartość w brzeczce, mL		
	A	B	C
Pożywka „Buffered peptone water”	40 mL (stężenie = 20 g/L)		
Inokulum – *E. aerogenes ATCC 13048* w OD_{600} = 2,40 ±0,13	5 mL		
Źródło węgla	Glukoza, 10 g/L	Hydrolizat rżniączki pospolitej 10 g/L	Gliceryna, 10 g/L
Woda	Do 50 mL		

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rysunek 3 a) Zawór trójdrożny i gazoszczelna strzykawka do pobierania próbek gazu podczas ciemnej fermentacji, b) Schemat ideowy pojedynczego bioreaktora i połączeń w obrębie systemu zbierania gazu

Próbka gazu jest poddawana analizie metodą chromatografii gazowej (GC). Bioreaktory są również wyposażone w zawór do pobierania płynnego bulionu (E), który poddaje się wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w celu zidentyfikowania i określenia spadku zawartości cukrów redukujących i gliceryny w trakcie procesu fermentacji ciemnej.

3. WYNIKI I DYSKUSJA WYNIKÓW

Fermentacja beztlenowa to wieloetapowy proces przeprowadzany m.in. przez *Enterobacter aerogenes*, który wymaga ściśle beztlenowych warunków. Zastosowanie zestawu 4 × 50 mL pozwala przeprowadzić eksperyment w czterech powtórzeniach (dla kontroli, kontroli pozytywnej z glukozą i dwóch różnych brzeczek lub w trzech powtórzeniach dla jednego rodzaju brzeczki i jednego procesu kontrolnego). Skład trawy polnej i jej hydrolizatu przedstawiono w Tabeli 2.

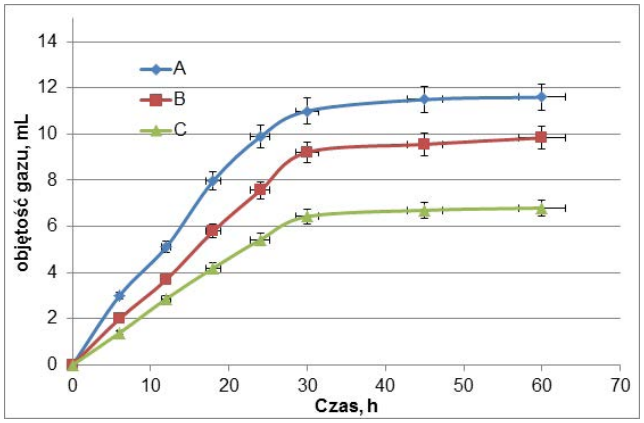
Tabela 2 przedstawia dokładny skład hydrolizatów trawy polnej. Widać wyraźnie, że oprócz glukozy istnieją również inne monosacharydy, które mogą wpływać na przebieg ciemnej fermentacji. W celu porównania wydajności otrzymywania wodoru z brzeczek zawierających glukozę i inne jedyne źródła węgla przeprowadzono procesy fermentacji ciemnej. Przykładowe wyniki dla pierwszego typu badania, tj. dla kontroli i kontroli pozytywnej, przedstawiono na Rysunku 4. Zastosowanie trzech różnych brzeczek, pozwoliło zaobserwować różnice w potencjalnej wydajności fermentacji różnych jedynych źródeł węgla. Zgodnie z oczekiwaniami brzeczka zawierająca glukozę (A) wyróżniała się najwyższą wydajnością otrzymanych gazów. Wydajność gazu fermentacyjnego zmniejsza się, gdy jako medium stosuje się glicerynę destylowaną (C). Hydrolizat biomasy lignocelulozowej, tj. hydrolizat trawy polnej, przedstawia krzywą o najniższej wydajności gazu (B), co odpowiada względnie niskiej zawartości glukozy

Tabela 2 Skład trawy oraz hydrolizatu trawy

Biomasa	Celuloza	Hemiceluloza	Lignina	Popiół i ekstrakty etanolowe	Glukoza	Ksyloza	Galaktoza	Mannoza i arabinoza	Celobioza
	%				mg/g biomasy				
TP	27,1	22,6	16,8	33,5	376	81	48	13	20

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

w tym materiale. Skład gazu fermentacyjnego w odniesieniu do stężenia wodoru podano w Tabeli 4.



Rysunek 4 Zmiany przyrostu całkowitej objętości gazu podczas fermentacji ciemnej
(A – glukoza, B – hydrolizaty trawy polnej, C – gliceryna)

Uzyskane wyniki są dodatnio skorelowane ze wzrostem mikroorganizmów, zgodnie z wartościami przedstawionymi w Tabeli 3 oraz z objętością wodoru wytworzonego w ciemnej fermentacji, zgodnie z Tabelą 4.

Tabela 3 Zmiany w gęstości optycznej hodowli mikroorganizmów podczas wzrostu *E. aerogenes ATCC 13048* w czasie fermentacji ciemnej dla różnych źródeł węgla. (A – glukoza, B – hydrolizat trawy polnej, C – gliceryna)

Czas [h]	Gęstość optyczna, λ = 600 nm		
	Brzeczka fermentacyjna		
	A	B	C
0	0,000	0,000	0,000
6	0,584	0,487	0,463
12	2,200	1,987	1,215
18	2,614	2,164	1,624
24	2,635	2,214	2,226
30	1,542	1,487	1,827
45	1,120	1,021	1,126
60	1,095	0,998	0,954

Średnie stężenie wodoru wytwarzanego podczas ciemnej fermentacji prowadzonej przez *Enterobacter aerogenes* różni się dla zróżnicowanych brzeczek. Można założyć, że uzyskane wyniki mogą stać się dobrym źródłem informacji dla przemysłowej oceny potencjału fermentacyjnego różnych rodzajów brzeczek.

Zrozumienie zmian zachodzących podczas ciemnej fermentacji wybranych materiałów fermentacyjnych (różniących się strukturą wprowadzonego źródła węgla) ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia zależności między składem a produktywnością wodoru w procesie ciemnej fermentacji beztlenowej. Gaz o najwyższej zawartości wodoru uzyskano przy zastosowaniu glukozy w brzeczkach fermentacyjnych. Okazało się, że zastosowanie hydrolizatów trawy polnej i gliceryny powoduje uzyskanie niższego stężenia wodoru. W obecnie dostępnym piśmiennictwie niewiele jest publikacji [30-33], w których kompleksowo przedstawiono wpływ różnych czynników na przebieg fermentacji wodorowej biomasy lignocelulozowej, biorąc pod uwagę wpływ parametrów procesowych, takich jak pH, temperatura, stężenie substratu i skład brzeczki. Uniwersalna metoda nie została przedstawiona i pomimo rosnącego zainteresowania tą kwestią wyniki opublikowanych badań nie dostarczają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób struktura i właściwości surowca wpływają na wydajność danej metody. Ponadto nie ma kompleksowych badań wpływu takich czynników lub obecności i stężenia wytwarzanych produktów ubocznych na szybkość degradacji enzymatycznej i przebieg fermentacji wodorowej. Z tego powodu kwestie związane z produktywnością wodoru są nadal przedmiotem zainteresowania ze względu na możliwe kierunki przygotowania materiału fermentowanego. Wykorzystanie małych objętości jest atutem, ponieważ eksperyment ma na celu dostarczenie informacji o znaczących kierunkach dalszych poszukiwań w dziedzinie brzeczek fermentacyjnych. Niskie ilości składników odżywczych, kompleksowy zestaw badawczy i możliwość ciągłych porów-

Tabela 4 Zmiany stężenia wodoru powstającego podczas ciemnej fermentacji anaerobowej różnych źródeł węgla. (A – glukoza, B – hydrolizat trawy polnej, C – gliceryna)

Czas [h]	Stężenie wodoru mL H_2/mL gas		
	Brzeczka fermentacyjna		
	A	B	C
0	0,000	0,000	0,000
6	0,405	0,032	0,104
12	0,315	0,046	0,096
18	0,306	0,116	0,437
24	0,611	0,351	0,512
30	0,681	0,394	0,514
45	0,596	0,375	0,485
60	0,530	0,328	0,476

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

nań w trakcie eksperymentu powodują, że zestaw może być z łatwością stosowany w skali laboratoryjnej. Skala laboratoryjna nie może być docelową metodą realizowania badań, jednak rozwój możliwości prowadzenia równoległych procesów w powtarzalnych warunkach zdecydowanie ułatwia rozwój metody i skalowanie procesu.
Pozostałość fermentacyjną można ponadto poddać metanizacji w celu wyczerpania możliwości otrzymania produktów gazowych, czyli poferment może posłużyć do wytwarzania biogazu. Podczas ciemnej fermentacji wydajność można zmierzyć tylko w odniesieniu do stężenia wodoru, jednak warto także rozważyć zagospodarowanie brzeczek i ich dalsze przetwarzanie do biogazu. Faza ciekła może również zawierać bogatą matrycę związków chemicznych o niskich stężeniach, które da się rozdzielić głównie metodami ekstrakcji, sorpcji, destylacji, krystalizacji i z zastosowaniem technik membranowych. Zagospodarowanie pofermentu w skali przemysłowej z pewnością stanie się wyzwaniem. Wybór parametrów istotnie wpływających na przebieg procesu prowadzony jest w skali laboratoryjnej również ze względu na minimalizację powstających strumieni odpadowych oraz możliwość udoskonalenia stosowanych metod analizy technicznej.

4. WNIOSKI

Proponowany układ czterech równoległych bioreaktorów pozwala na precyzyjne porównanie szybkości i wydajności procesów biokonwersji w równolegle prowadzonych procesach fermentacji beztlenowych. Proces fermentacji jest monitorowany na podstawie dokładnych pomiarów w odniesieniu do próbek bulionu fermentacyjnego i produktów gazowych w ściśle kontrolowanych warunkach wzrostu temperatury i początkowego pH. Wytwarzanie wodoru jest stechiometrycznie związane z transformacją jedynego źródła węgla. Proponowany zestaw może być stosowany do badań przesiewowych mikroorganizmów, do optymalizacji parametrów istotnie wpływających na proces fermentacji ciemnej i do definiowania statystycznie istotnych zmiennych, które mają być monitorowane podczas zwiększania skali. Wśród prezentowanych zalet warto wymienić także możliwość jednoczesnego uruchomienia czterech niezależnych procesów fermentacji z uwzględnieniem dokładnej kontroli krytycznych parametrów procesu.

Finansowanie: Prace zostały sfinansowane w ramach projektu „Badania alkalicznej hydrolizy biomasy lignocelulozowej i warunków konwersji produktów do biogazów", finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu UMO-2014/13/B /ST8/04258.

Konflikt interesów: Autorzy nie zgłaszają żadnych konfliktów interesów. Organizacja finansująca nie miała wpływu na przebieg, analizę i interpretację danych i na decyzję o opublikowaniu wyników.

LITERATURA

[1] Kucharska K., Hołowacz I., Konopacka-Łyskawa D., Rybarczyk P., Kamiński M., Key issues in modeling and optimization of lignocellulosic biomass fermentative conversion to gaseous biofuels. Renew Energy 2018;129:384–408. doi:10.1016/j.renene.2018.06.018.

[2] Łukajtis R., Kucharska K., Hołowacz I., Rybarczyk P., Wychodnik K., Słupek E., et al. Comparison and Optimization of Saccharification Conditions of Alkaline Pre-Treated Triticale Straw for Acid and Enzymatic Hydrolysis Followed by Ethanol Fermentation. Energies 2018. doi:10.3390/en11030639.

[3] Chen W.-H., Chen S.-Y., Kumar Khanal S., Sung S., Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. Int J Hydrogen Energy 2006;31:2170–8. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.02.020.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

[4] Azwar M. Y., Hussain M. A., Abdul-Wahab A. K., Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. Renew Sustain Energy Rev 2014;31. doi:10.1016/j.rser.2013.11.022.
[5] Kucharska K., Łukajtis R., Słupek E., Cieśliński H., Rybarczyk P., Kamiński M., Hydrogen Production from Energy Poplar Preceded by MEA Pre-Treatment and Enzymatic Hydrolysis. Molecules 2018; 23:1–21. doi:10.3390/molecules23113029.
[6] Mussatto S. I., Dragone G. M., Biomass Pretreatment, Biorefineries, and Potential Products for a Bioeconomy Development. In: S. I. Mussatto, editor. Biomass Fractionation Technol. Lignocellul. Feed. Based Biorefinery, Amsterdam: Elsevier Inc.; 2016, p. 1-22.
[7] Couto S. R., Sanromán M. Á., Application of solid-state fermentation to food industry – A review. J Food Eng 2006. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022.
[8] Singh R., White D., Demirel Y., Kelly R., Noll K., Blum P., Uncoupling fermentative synthesis of molecular hydrogen from biomass formation in Thermotoga maritima. Appl Environ Microbiol 2018; 84:1–16. doi:10.1128/AEM.00998-18.
[9] Chou C. H., Wang C. W., Huang C. C., Lay J. J., Pilot study of the influence of stirring and pH on anaerobes converting high-solid organic wastes to hydrogen. Int J Hydrogen Energy 2008;33: 1550-8. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.09.031.
[10] Zhang D., Zhu W., Tang C., Suo Y., Gao L., Yuan X., et al. Bioreactor performance and methanogenic population dynamics in a low-temperature (5-18°C) anaerobic fixed-bed reactor. Bioresour Technol 2012;104:136–43. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.086.
[11] Kossatz H. L., Rose S. H., Viljoen-Bloom M., van Zyl W. H., Production of ethanol from steam exploded triticale straw in a simultaneous saccharification and fermentation process. Process Biochem 2017;53:10–6. doi:10.1016/j.procbio.2016.11.023.
[12] Mohd Yasin N. H., Rahman N. A., Man H. C., Mohd Yusoff M. Z., Hassan M. A., Microbial characterization of hydrogen-producing bacteria in fermented food waste at different pH values. Int J Hydrogen Energy 2011;36:9571–80. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.05.048.
[13] Chen G., Yao J., Liu J., Yan B., Shan R., Biomass to hydrogen-rich syngas via catalytic steam reforming of bio-oil. Renew Energy 2016. doi:10.1016/j.renene.2016.01.073.
[14] Dabrock B., Bahl H., Gottschalk G., Parameters Affecting Solvent Production by Clostridium pasteurianum. Appl Environ Microbiol 1992;58:1233–9. doi:0099-2240/92/041233-07$02.00/0.
[15] Lu L., Ren N. Q., Zhao X., Wang H. A., Wu D., Xing D. F., Hydrogen production, methanogen inhibition and microbial community structures in psychrophilic single-chamber microbial electrolysis cells. Energy Environ Sci 2011;4:1329–36. doi:10.1039/c0ee00588f.
[16] Temudo M. F., Kleerebezem R., van Loosdrecht M., Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: a chemostat study. Biotechnol Bioeng 2007;98:69–79. doi:10.1002/bit.21412.
[17] Mu Y., Yu H. Q., Wang G., Evaluation of three methods for enriching H2-producing cultures from anaerobic sludge. Enzyme Microb Technol 2007;40:947–53. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.07.033.
[18] Pachapur V. L., Sarma S. J., Brar S. K., Le Bihan Y., Buelna G., Verma M., Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of Enterobacter aerogenes and clostridium butyricum. Bioresour Technol 2015;193:297–306. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.095.
[19] Mu J., Li S., Chen D., Xu H., Han F., Feng B., et al. Enhanced biomass and oil production from sugarcane bagasse hydrolysate (SBH) by heterotrophic oleaginous microalga Chlorella protothecoides. Bioresour Technol 2015;185:99–105. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.082.
[20] Fernandes B. S., Peixoto G., Albrecht F. R., Saavedra del Aguila N. K., Zaiat M., Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. Energy Sustain Dev 2010;14:143–8. doi:10.1016/j.esd.2010.03.004.
[21] Lin C. Y., Lay C. H., Sen B., Chu C. Y., Kumar G., Chen C. C., et al. Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. Int J Hydrogen Energy 2012;37:15632–42. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.02.072.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

[22] Guo P., Mochidzuki K., Cheng W., Zhou M., Gao H., Zheng D., et al. Effects of different pretreatment strategies on corn stalk acidogenic fermentation using a microbial consortium. Bioresour Technol 2011;102:7526–31. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.083.
[23] Kucharska K., Rybarczyk P., Hołowacz I., Łukajtis R., Glinka M., Kamiński M., Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. Molecules 2018;23:2937. doi: 10.3390/molecules23112937.
[24] Kucharska K., Łukajtis R., Słupek E., Cieśliński H., Rybarczyk P., Kamiński M., Hydrogen Production from Energy Poplar Preceded by MEA Pre-Treatment and Enzymatic Hydrolysis. Molecules 2018; 23:1–21. doi:10.3390/molecules23113029.
[25] Jones P. R., Akhtar M. K., Insurmountable Hurdles for Fermentative H2 Production? vol. #volume#. 1st ed. Elsevier B.V.; 2013. doi:10.1016/B978-0-444-59555-3.00004-0.
[26] Binod P., Pusztahelyi T., Nagy V., Sandhya C., Szakács G., Pócsi I., et al. Production and purification of extracellular chitinases from Penicillium aculeatum NRRL 2129 under solid-state fermentation. Enzyme Microb Technol 2005. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.12.031.
[27] Łukajtis R., Rybarczyk P., Kucharska K., Konopacka-Łyskawa D., Słupek E., Wychodnik K., et al. Optimization of saccharification conditions of lignocellulosic biomass under alkaline pre-treatment and enzymatic hydrolysis. Energies 2018;11. doi:10.3390/en11040886.
[28] Song C., Liu Q., Ji N., Deng S., Zhao J., Kitamura Y., Natural gas purification by heat pump assisted MEA absorption process. Appl Energy 2017;204:353–61. doi:10.1016/j.apenergy.2017.07.052.
[29] Yokoi H., Ohkawara T., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y., Characteristics of hydrogen production by aciduric Enterobacter aerogenes strain HO-39. J Ferment Bioeng 1995;80:571–4. doi:10.1016/0922-338X(96)87733-6.
[30] Khaleb N., Jahim J., Kamal S., Biohydrogen production using hydrolysates of palm oil mill effluent (POME). J Asian Sci … 2012;2:705-10.
[31] Trchounian K., Sawers R. G., Trchounian A., Improving biohydrogen productivity by microbial dark- and photo-fermentations: Novel data and future approaches. Renew Sustain Energy Rev 2017;80: 1201–16. doi:10.1016/j.rser.2017.05.149.
[32] Balachandar G., Khanna N., Das D., Biohydrogen Production from Organic Wastes by Dark Fermentation. 1st ed. Elsevier B.V.; 2013. doi:10.1016/B978-0-444-59555-3.00006-4.
[33] Boni M. R., Sbaffoni S., Tuccinardi L., Viotti P., Development and calibration of a model for biohydrogen production from organic waste. Waste Manag 2013;33:1128–35. doi:10.1016/j.wasman.2013.01.019.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl