

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Laboratoryjny bioreaktor z systemem kontroli pH do badań nad wytwarzaniem wodoru w procesie ciemnej fermentacji

BARTOSZ SZULCZYŃSKI, KAROLINA KUCHARSKA, MARIAN KAMIŃSKI
POLITECHNIKA GDAŃSKA, WYDZIAŁ CHEMICZNY, KATEDRA INŻYNIERII PROCESOWEJ
I TECHNOLOGII CHEMICZNEJ

Słowa kluczowe: wodór, bioreaktor, fermentacja ciemna, system regulacji pH, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

STRESZCZENIE:

W pracy przedstawiono konstrukcję niskokosztowego bioreaktora badawczego wyposażonego w system kontroli i regulacji pH. Zaprezentowano jego wykorzystanie do badania produkcji wodoru w procesie fermentacji ciemnej z zastosowaniem *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. W pracy porównano wyniki uzyskane przy prowadzeniu procesu bez i z regulacją pH dla różnych materiałów wsadowych: glukozy, hydrolizatów topoli energetycznej, serwatki kwaśnej i glicerolu. Wykazano, że wykorzystanie zaproponowanej konstrukcji bioreaktora do badania procesu fermentacji ciemnej jest w pełni zasadne i celowe. Zaobserwowano również, że zastosowanie regulacji pH powoduje wydłużenie fazy wzrostu wykładniczego o około 12 godzin, co pozwala na zwiększenie ilości wytworzonego wodoru.

Laboratory bioreactor with pH control system for investigations of hydrogen production in the dark fermentation process

Keywords: hydrogen, bioreactor, dark fermentation, pH control system, *Enterobacter aerogenes*

ABSTRACT:

The work presents the construction of a low-cost research bioreactor equipped with a pH control system. Its use was presented for the study of hydrogen production in the dark fermentation process using *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Presented paper compares the results obtained during the process without and with pH regulation for different fees materials: glucose, energetic poplar hydrolysates, acid whey and glycerol. It has been shown that the use of the proposed bioreactor design to study the dark fermentation process is fully justified and purposeful. It has also been observed that the use of pH regulation resulted in a longer log phase of about 12 hours, which increased the amount of hydrogen produced.

1. WSTĘP

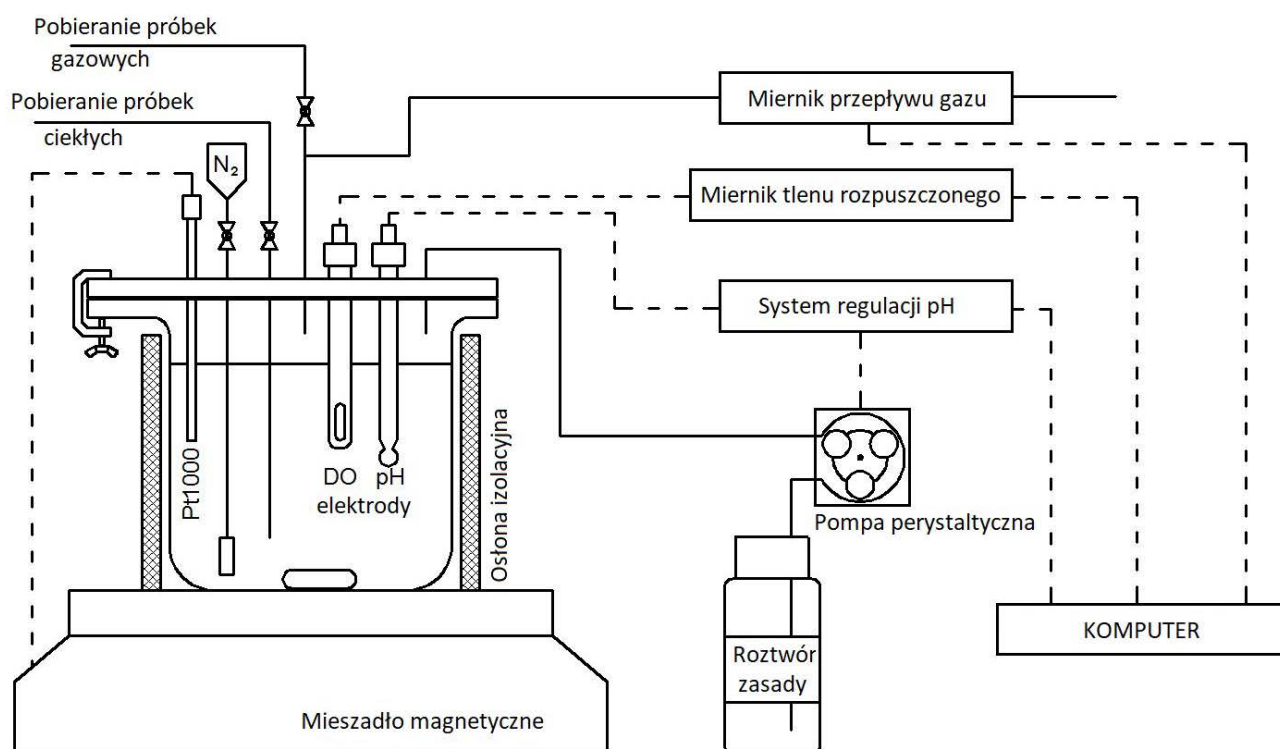
Wodór jest powszechnie uważany za nośnik energii przyszłości [1]. Czysty wodór nie występuje naturalnie na Ziemi w dużych ilościach. W związku z tym jego produkcja na skalę przemysłową zwykle wymaga dużego wkładu energii pierwotnej. Obecnie stosowane metody produkcji wodoru obejmują reforming paliw kopalnych (np. metanu), zgazowanie węgla, elektrolizę wody, fotokatalizę lub fermentację ciemną, która umożliwia produkcję wodoru z surowców odnawialnych, przy niskim zużyciu energii [2-6]. Różne materiały mogą służyć jako substraty do produkcji wodoru, w tym na przykład: glukoza, serwatka, glicerol, topola energetyczna, łodygi kukurydzy lub słoma ryżowa. Jednakże wydajne wytwarzanie wodoru w procesie fermentacji z wyżej wymienionych substratów jest procesem wrażliwym na warunki jego prowadzenia. Wydajność procesu zależy w dużej mierze od wielu czynników, w tym: składu wsadu fermentacyjnego, stężenia substratu, stężenia tlenu i temperatury. Bardzo ważnym parametrem procesu jest właściwy dobór oraz utrzymanie stałej wartości pH. Podczas wzrostu bakterii dochodzi do obniżenia pH, ze względu na wytwarzane kwasy organiczne. Taka sytuacja negatywnie wpływa na wydajność produkcji wodoru. Z tego powodu badanie procesu wytwarzania wodoru w procesie ciemnej fermentacji wymaga

przewodzenia wielu doświadczeń w celu zbadania wpływu parametrów procesowych na wydajność produkcji wodoru. W pracy przedstawiono budowę taniego bioreaktora, wyposażonego w system kontroli pH, odpowiedniego do zastosowania w optymalizacji prowadzenia procesu ciemnej fermentacji i badań przesiewowych. Przedstawiono również i omówiono wpływ regulacji pH na efektywność produkcji wodoru.

2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

2.1 "Bioreaktor"

Konstrukcję bioreaktora przedstawiono na Rysunku 1. Opiera się ona na szklanym naczyniu z płaskim dnem o pojemności 1200 ml. Naczynie jest hermetycznie zamknięte za pomocą 12-milimetrowej pokrywy wykonanej z Teflonu®, uszczelnionej silikonowym o-ringiem oraz przykręconej za pomocą aluminiowych zacisków. Naczynie jest izolowane termicznie, a także chronione przed światłem zewnętrznym. Kontrolę i regulację temperatury procesu (od temperatury otoczenia do 280°C) i prędkości obrotowej mieszadła (0-1500 obrotów na minutę) zapewnia mieszadło magnetyczne z ceramiczną płytą grzewczą (Sunlab SU1150, Niemcy). Jako czujnik temperatury wykorzystano czujnik Pt1000 podłączony do mieszadła.



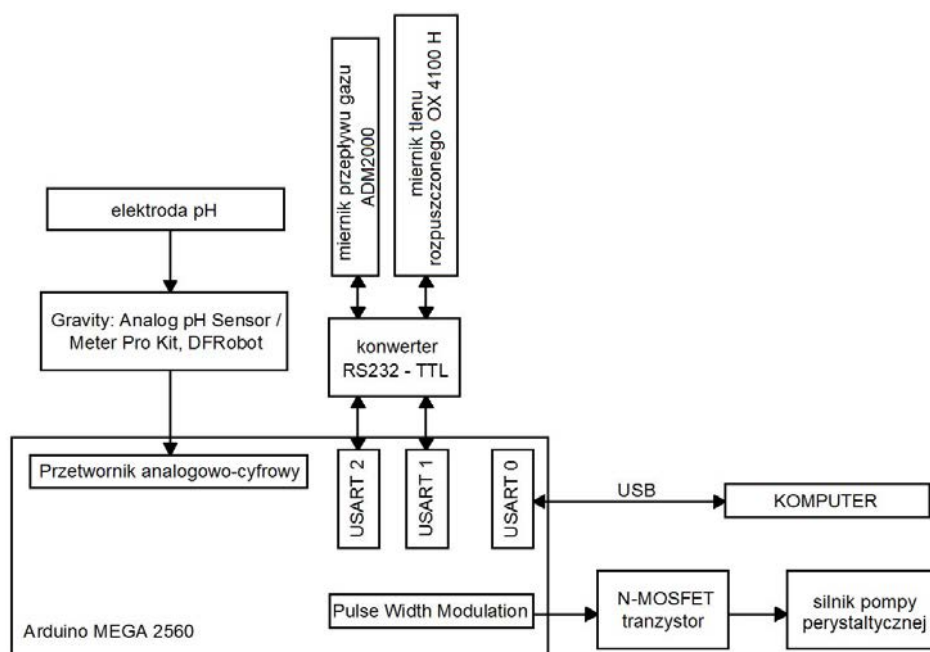
Rysunek 1 Schemat konstrukcji bioreaktora

Zapewnienie warunków beztlenowych odbywa się poprzez odtlenianie za pomocą strumienia gazowego azotu. Sprężony azot wprowadza się za pomocą kapilary ze stali nierdzewnej zakończonej porowatym spiekem. Stężenie rozpuszczonego tlenu w cieczy jest monitorowane za pomocą miernika (pHenomenal® OX 4100 H, Niemcy) wyposażonego w elektrodę tlenową (pHenomenal® OXY11-3, Niemcy) w zakresie do $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ z rozdzielczością $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Prezentowana konstrukcja bioreaktora pozwala na pobieranie próbek gazowych i ciekłych. Do tego celu wykorzystano rurki kapilarne zakończone zaworami odcinającymi ze złączami typu Luer. To rozwiązanie pozwala na szybkie pobieranie próbek do strzykawki, co umożliwia ich przygotowanie do dalszych etapów analizy (np. do chromatografii gazowej w celu oznaczania stężenia wodoru lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej). Jednym z ważnych parametrów opisujących proces ciemnej fermentacji jest ilość gazów wytwarzanych przez bakterie. Ze względu na małą pojemność bioreaktora ilość uwolnionego gazu jest stosunkowo niewielka. Z tego powodu do rejestrowania objętości wydzielonego gazu wykorzystano przepływomierz Agilent Technologies ADM2000, USA. Urządzenie mierzy prędkości przepływu od $0,5$ do $1000 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ z dokładnością równą $\pm 3\%$. Zgodnie z danymi przedstawionymi w Tabeli A.3 średnie natężenia przepływu gazu w trakcie trwania procesu mieszczą się w zakresie od 0 do $5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Kontrola i regulacja pH odbywa się za pomocą samodzielnie skonstruowanego systemu. Parametry pro-

cesu (tj. zawartość tlenu rozpuszczonego, uwolniona objętość gazu oraz pH) są przesyłane do komputera, gdzie przedstawiane są w postaci wykresów i zapisywane przy użyciu oprogramowania napisanego w języku C# (Microsoft Visual Studio). Oprogramowanie umożliwia również integrację generowanej objętości gazu podczas procesu. Transmisja danych pomiędzy urządzeniami i komputerem odbywa się za pomocą konwerterów RS-232 – TTL oraz modułu Arduino MEGA 2560, który jest odpowiedzialny za zbieranie, przygotowywanie i przesyłanie pakietu danych do komputera w trybie online.

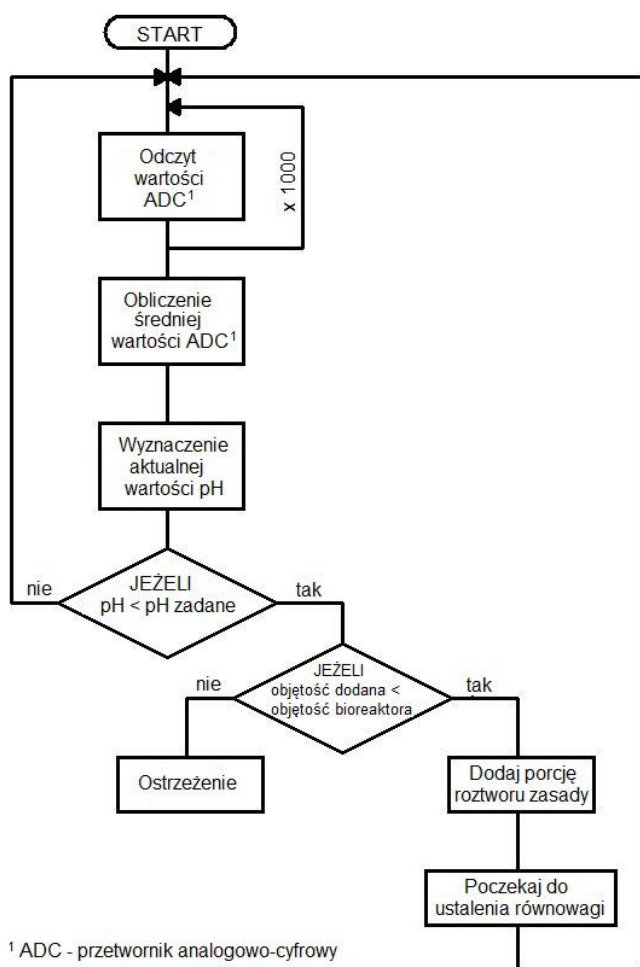
2.2 System kontroli i regulacji pH

Schemat systemu regulacji pH przedstawiono na Rysunku 2. Opiera się on na platformie Arduino. Jako jednostkę sterującą użyto modułu Arduino Mega 2560. Sygnał generowany przez elektrodę pH jest przesyłany do modułu konwertera (Gravity: Analogowy czujnik pH / Miernik Pro Kit, DFRobot, Chiny). W tym module sygnał pochodzący z elektrody jest konwertowany na sygnał z zakresu $0\text{...}5 \text{ V}$, który jest przesyłany do przetwornika analogowo-cyfrowego Arduino Mega 2560 (o rozdzielczości 10 bitów). Zastosowanie tego modułu umożliwia wykonywanie pomiarów na maksymalnie 16 kanałach. Dodatkowo, dzięki czterem niezależnym wbudowanym interfejsom USART, możliwe jest jednoczesne monitorowanie pH, a także odbieranie danych z miernika rozpuszczonego tlenu i miernika objętości gazu.



Rysunek 2 Schemat blokowy układu regulacji pH

Regulację pH osiąga się dzięki odpowiednio przygotowanemu oprogramowaniu, które pozwala na kalibrację systemu za pomocą roztworów wzorcowych o zadeklarowanej wartości pH. Jako element wykonawczy w układzie zastosowano pompy perystaltyczne o niskiej wydajności. Pompa dozuje roztwór alkaliczny (podczas procesu fermentacji pH się obniża), który jest wprowadzany za pomocą kapilary znajdującej się w pokrywie bioreaktora. Regulację objętości zasady wprowadzanej do bioreaktora uzyskano przy użyciu zmiany prędkości obrotowej silnika elektrycznego napędzającego pompę. W tym celu wykorzystano technikę PWM (Pulse Width Modulation) połączoną z tranzystorem N-MOSFET. Schemat programu realizującego regulację pH pokazano na Rysunku 3.



Rysunek 3 Schemat blokowy programu regulacji pH

Użytkownik może wprowadzić do programu następujące ustawienia: zadaną wartość pH, objętość roztworu neutralizującego dozowaną jednocześnie do bioreaktora i minimalny czas pomiędzy kolejnymi dawkami (czas ten jest niezbędny do doprowadzenia układu do stanu równowagi) oraz objętość cieczy w bioreaktorze. Oprogramowanie

zlicza całkowitą objętość roztworu dozującego i jeśli zbliża się do całkowitej objętości bioreaktora (1200 ml), informuje o tym fakcie użytkownika i nie pozwala na dalsze dodawanie roztworu do bioreaktora.

2.3 Fermentacja ciemna

Bakterie *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (Selectrol TCS Biosciences Ltd.) zastosowano do wytwarzania wodoru w procesie ciemnej fermentacji w sterylnych szklanych bioreaktorach (1200 ml) z początkową objętością roboczą równą 1 litrowi, w warunkach regulowanego oraz nieregulowanego pH. Początkowy bulion fermentacyjny składał się z tioglikolanowej wody peptonowej (Biomaxima), glukozy, hydrolizatów topoli energetycznej, kwaśnej serwatki lub glicerolu (o stężeniu źródła węgla równemu 5,5 grama na litr).

Początkowe pH bulionu fermentacyjnego doprowadzono do wartości 7,00 za pomocą 1 M NaOH. Bioreaktory zaszczerpiono 50 ml *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 w hodowli płynnej przy gęstości optycznej $OD_{\lambda=600nm} = 2,400 \pm 0,125$. Procesy przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Warunki anaerobowe wytworzono przez przedmuchanie reaktorów sterylnym gazowym azotem przez 60 min. Wartości parametrów pracy zostały ustawione na: temperaturę 37°C, prędkość obrotową mieszania 320 rpm oraz pH 7,00 $\pm 0,10$. W badaniach stosowano czas fermentacji wynoszący 72 h, ponieważ odpowiada on późnej logarytmicznej fazie wymierania hodowli *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 [7-9].

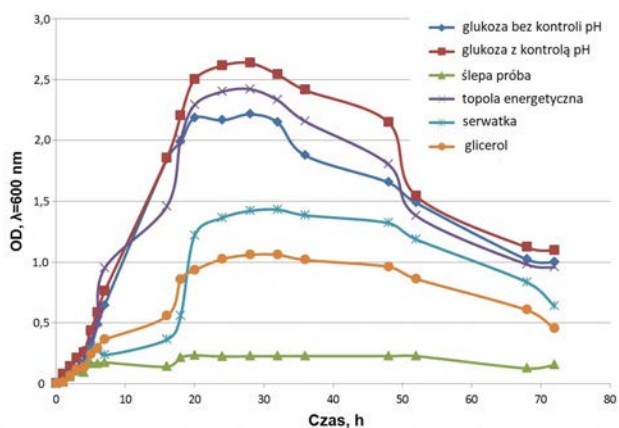
3. WYNIKI I ICH DYSKUSJA

Przedstawione badania wytwarzania wodoru oparto na technice mezofilnej ciemnej fermentacji [10, 11] przeprowadzanej okresowo w trzech powtórzeniach w warunkach beztlenowych. Wytwarzanie wodoru jest procesem wrażliwym, ponieważ silnie zależy od wielu czynników, w tym składu wsadu fermentacyjnego, stężenia substratu, stężenia tlenu rozpuszczonego i temperatury. Podczas eksperymentu monitorowano wybrane parametry procesu. Wartości temperatury i stężenia tlenu rozpuszczonego podczas procesu fermentacji przedstawiono w Załączniku (Tabela A.1 oraz A.2). Zmiany występujące w bulionie fermentacyjnym w systemach z kontrolowanym i niekontrolowanym pH przedstawiono w Tabeli 1 dla różnych materiałów wsadowych.

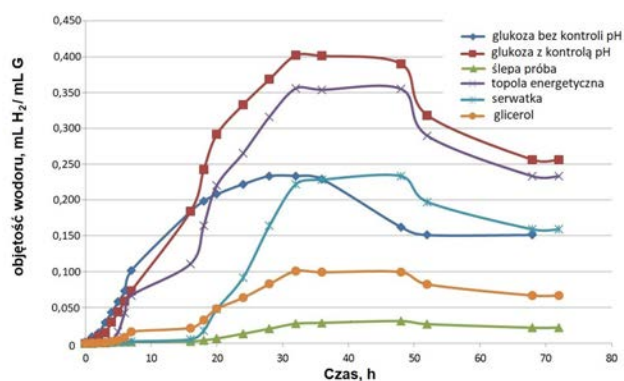
Tabela 1 Zmiany wartości pH występujące podczas ciemnej fermentacji prowadzonej dla różnych materiałów wsadowych

Czas [h]	pH, $\pm 0,02$					
	Glukoza bez kontroli pH	Glukoza	Ślepa próba	Topola energetyczna	Serwatka	Glicerol
				z kontrolą pH		
0	7,05	7,05	7,02	7,05	7,05	7,05
1	7,05	7,05	7,04	7,05	7,05	7,04
2	7,04	7,04	7,02	7,04	7,04	7,05
3	7,05	7,05	7,02	7,05	7,05	7,01
4	6,78	7,01	7,03	7,01	7,01	7,05
5	6,24	7,06	7,03	7,05	7,04	7,05
6	6,18	7,02	7,05	7,05	7,05	7,04
7	5,92	7,01	7,03	7,04	7,01	7,05
16	5,90	7,00	7,05	7,05	7,06	7,01
18	5,78	7,05	7,05	7,01	7,00	7,04
20	5,76	7,05	7,05	7,06	7,01	7,05
24	5,62	7,04	7,04	7,02	7,00	7,01
28	5,59	7,05	7,05	7,01	7,05	7,06
32	5,54	7,01	7,01	7,00	7,05	7,02
36	5,41	7,05	7,06	7,05	7,05	7,05
48	5,04	7,05	7,02	7,05	7,05	7,05
52	4,99	7,04	7,01	7,04	7,04	7,04
68	5,02	7,05	7,00	7,05	7,05	7,05
72	4,89	7,01	7,05	7,01	7,01	7,01

Podczas prowadzenia procesów badano zmiany gęstości optycznej $OD_{\lambda=600nm}$ hodowli *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 w bioreaktorach, a także objętości wytwarzanego wodoru. Wyniki przedstawiono odpowiednio na Rysunkach 4 i 5. Wyniki dotyczące przyrostu całkowitej objętości produkowanego gazu przedstawiono w załączniku (Tabela A.3).



Rysunek 4 Zmiany gęstości optycznej kultur bakterii zachodzące podczas wzrostu *E. aerogenes* ATCC 13048 podczas procesu ciemnej fermentacji dla różnych materiałów wsadowych



Rysunek 5 Zmiany objętości wodoru wytwarzanego w procesie ciemnej fermentacji dla różnych materiałów wsadowych

Proces wzrostu drobnoustrojów w czasie można przedstawić za pomocą krzywej wzrostu bakterii, z wyraźnie odróżnialnymi czterema fazami, tj.: fazą pierwotnego hamowania, gdy następuje adaptacja do nowych warunków środowiskowych; fazą wzrostu wykładniczego, gdy liczba komórek gwałtownie rośnie; stabilną fazą wzrostu – w przybliżeniu liczba komórek tworzących i umierających w danym momencie jest jednokowa (faza ta ma miejsce, gdy źródła żywności

zaczynają się wyczerpywać lub/i stężenie produktów przemiany materii wzrasta do poziomu, który jest szkodliwy dla samych bakterii); fazą końcową, gdy dominują procesy śmierci komórkowej. Na Rysunku 4 wyraźnie obserwuje się zmiany gęstości optycznej podczas hodowli drobnoustrojów, co potwierdza przebieg wszystkich wymienionych faz. Można zauważyć, że stabilna faza wzrostu jest dłuższa, gdy stosowany jest układ regulacji pH w bulionach glukozowych. Stosowanie źródeł węgla stanowiących jedyne źródło glukozy, takich jak serwatka, glicerol lub surowiec biomasy lignocelulozowej, powoduje wydłużenie pierwotnej fazy inhibicji. Dane przedstawione na Rysunku 5 odpowiadają przebiegowi wzrostu bakterii (Rys. 4). Ilość wodoru w ogólnym strumieniu gazu ($\text{ml H}_2 / \text{ml G}$) wzrasta i maleje proporcjonalnie do fazy wzrostu drobnoustrojów. Można zatem wywnioskować, że istnieje silna zależność między wzrostem hodowli drobnoustrojów (Rys. 4), na którą bezpośrednio wpływa zastosowanie układu kontroli pH, a wydajnością wytwarzania wodoru. Za optymalne warunki wzrostu *Enterobacter aerogenes ATCC 13048* przyjmuje się pH w zakresie pH 6,8-7,2 [12]. Podczas wzrostu bakterii dochodzi do zmian pH, ponieważ w trakcie trwania hodowli są wytwarzane kwasy organiczne: kwas octowy, kwas bursztynowy i mrówkowy [13-17], które powodują spadek wartości pH. Analiza krzywej wytwarzania wodoru przez *Enterobacter aerogenes ATCC 13048* wykazała, że wydajność produkcji wodoru można zwiększyć, gdy pH jest kontrolowane i ustalone na 7,00, a glukoza jest używana jako jedyne źródło węgla. Można również zauważyć, że faza logarymiczna trwa ok. 12 h dłużej, gdy system kontroli pH jest stosowany w bulionach fermentacyjnych na bazie glukozy. Z tego powodu warunki kontroli pH zostały zastosowane również w procesie ciemnej fermentacji hydrolizatów topoli energetycznej otrzymanych według [7], kwaśnego roztworu serwatki oraz roztworu glicerolu.

4. WNIOSKI

W artykule przedstawiono budowę taniego bioreaktora badawczego wyposażonego w system kontroli i regulacji pH. Konstrukcja bioreaktora oparta jest na łatwo dostępnych elementach, co sprawia, że niezwykle łatwo można go przystosować do realizacji określonych procesów biotechnologicznych. Przedstawiony system umożliwia monitorowanie i kontrolowanie podstawowych parametrów procesu fermentacji: temperatury, stężenia rozpuszczonego tlenu, pH i pomiaru objętości gazu. Dzięki platformie Arduino wyżej wymienione parametry przesyłane są do komputera, prezentowane w formie graficznej i zapisywane. To rozwiązanie sprawia, że prezentowany bioreaktor z powodzeniem może być także wykorzystywany do celów dydaktycznych.

W proponowanym typie bioreaktora przeprowadzono serię badań nad wytwarzaniem wodoru w procesie ciemnej fermentacji. Wykazano, że zastosowanie proponowanego projektu bioreaktora jest w pełni uzasadnione i celowe. Ze względu na możliwość wizualizacji zmian parametrów procesu w trybie on-line oraz prosty system pobierania próbek gazu i cieczy wykonanie badań przesiewowych lub optymalizacyjnych staje się niezwykle łatwe. Przedstawione badania – proces ciemnej fermentacji z użyciem *Enterobacter aerogenes ATCC 13048* – wskazują na dużą zależność wytwarzanej objętości wodoru od pH bulionu fermentacyjnego. Zapewnienie właściwego zakresu pH za pomocą układu kontroli pH prowadzi do wydłużenia logarymicznej fazy wzrostu bakterii do około 12 godzin, co spowodowało zwiększenie całkowitej ilości wytwarzanego wodoru.

Podziękowania: Badania zostały przeprowadzone w ramach projektu „Badania zasadowej hydrolizy biomasy lignocelulozowej oraz warunków konwersji produktów do biogazów”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki poprzez umowę UMO-2014/13/B/ST8/04258.

Konflikt interesów: Autorzy deklarują brak konfliktu interesów. Fundatorzy nie mieli żadnej roli w projektowaniu badań; w gromadzeniu, analizie lub interpretacji danych; w pisaniu manuskryptu oraz w decyzji o opublikowaniu wyników.

LITERATURA

- [1] Rubio M. G. A., Jaojaruek K., Hydrogen – The Future Fuel, *Adv Automob Eng*, 4 (2015), 116.
- [2] Dincer I., Acar C., Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability, *Int J Hydrogen Energy*, 40 (2015), 11094-11111.
- [3] Pakarinen O., Lehtomäki A., Rintala J., Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: The effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio, *Int J Hydrogen Energy*, 33 (2008), 594-601.
- [4] Gadhe A., Sonawane S. S., Varma M. N., Enhanced biohydrogen production from dark fermentation of complex dairy wastewater by sonolysis, *Int J Hydrogen Energy*, 40 (2015), 9942-9951.
- [5] Hu C. C., Giannis A., Chen C. L., Qi W., Wang J. Y., Comparative study of biohydrogen production by four dark fermentative bacteria, *Int J Hydrogen Energy*, 38 (2013), 15686-15692.
- [6] Reilly M., Dinsdale R., Guwy A., Mesophilic biohydrogen production from calcium hydroxide treated wheat straw, *Int J Hydrogen Energy*, 39 (2014), 16891-16901.
- [7] 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*, 23 (2018), 1-21.
- [8] Łukajtis R., Rybarczyk P., Kucharska K., Konopacka-Łyskawa D., Słupek E., Wychodnik K., Kamiński M., Optimization of saccharification conditions of lignocellulosic biomass under alkaline pre-treatment and enzymatic hydrolysis, *Energies*, 11 (2018), 886.
- [9] Łukajtis R., Kucharska K., Hołowacz I., Rybarczyk P., Wychodnik K., Słupek E., Nowak P., Kamiński M., Comparison and optimization of saccharification conditions of alkaline pre-treated triticale straw for acid and enzymatic hydrolysis followed by ethanol fermentation, *Energies*, 11 (2018), 639.
- [10] Krishnan S., Singh L., Sakinah M., Thakur S., Nasrul M., Otieno A., Wahid Z. A., An investigation of two-stage thermophilic and mesophilic fermentation process for the production of hydrogen and methane from palm oil mill effluent, *Environ Prog Sustain Energy*, 36 (2017), 1322-1336.
- [11] 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*, 129 (2018), 384-408.
- [12] Reungsang A., Sittijunda S., O-Thong S., Bio-hydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as affected by organic loading rate, *Int J Hydrogen Energy*, 38 (2013), 6970-6979.
- [13] Nath K., Muthukumar M., Kumar A., Das D., Kinetics of two-stage fermentation process for the production of hydrogen, *Int J Hydrogen Energy*, 33 (2008), 1195-1203.
- [14] Chaganti S. R., Kim D. H., Lalman J. A., Dark fermentative hydrogen production by mixed anaerobic cultures: Effect of inoculum treatment methods on hydrogen yield, *Renew Energy*, 48 (2012), 117-121.
- [15] Slezak R., Grzelak J., Krzystek L., Ledakowicz S., The effect of initial organic load of the kitchen waste on the production of VFA and H₂ in dark fermentation, *Waste Manage*, 68 (2017), 610-617.
- [16] Bundhoo M. A. Z., Mohee R., Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review, *Int J Hydrogen Energy*, 41 (2016), 6713-6733.
- [17] Singh L., Wahid Z. A., Siddiqui M. F., Ahmad A., Rahim M. H. A., Sakinah M., Application of immobilized upflow anaerobic sludge blanket reactor using *Clostridium* LS2 for enhanced biohydrogen production and treatment efficiency of palm oil mill effluent, *Int J Hydrogen Energy*, 38 (2013), 2221-2229.

ZAŁĄCZNIKI

Tabela A.1 Zmiany temperatury występujące podczas ciemnej fermentacji prowadzonej dla różnych materiałów wsadowych

Czas [h]	Temperatura, °C					
	Glukoza bez kontroli pH	Glukoza	Ślepa próba	Topola energetyczna	Serwatka	Glicerol
0	37,2	37,0	37,0	37,0	37,0	37,0
1	37,1	36,9	37,3	36,8	36,8	36,7
2	36,8	37,2	36,4	37,1	36,9	36,6
3	37,1	37,1	36,7	37,0	36,9	36,7
4	37,4	36,8	36,4	36,7	37,0	36,9
5	36,5	37,1	36,6	37,0	36,8	36,9
6	36,8	37,4	36,7	37,3	36,7	37,0
7	37,0	36,5	36,6	36,4	36,6	36,9
16	37,3	36,8	36,7	36,7	36,7	36,8
18	36,4	36,5	36,9	36,4	36,8	36,9
20	36,7	36,7	36,9	36,6	36,8	36,9
24	36,4	36,8	37,0	36,7	36,9	37,0
28	36,6	36,9	36,9	36,8	36,9	36,8
36	36,8	37,0	36,8	36,9	36,8	36,9
48	36,9	37,0	36,9	36,9	36,7	36,9
68	36,7	36,7	36,7	36,9	36,8	36,9
72	37,5	37,1	37,5	37,1	37,1	37,1

Tabela A.2 Zmiany stężenia tlenu rozpuszczonego występujące podczas ciemnej fermentacji prowadzonej dla różnych materiałów wsadowych

Czas [h]	Stężenie tlenu rozpuszczonego, mg O ₂ /L					
	Glukoza bez kontroli pH	Glukoza	Ślepa próba	Topola energetyczna	Serwatka	Glicerol
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0
5	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
6	0,0	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0
7	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0
16	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
18	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1
20	0,0	0,0	0,1	0,3	0,0	0,1
24	0,0	0,0	0,1	0,3	0,0	0,1
28	0,0	0,0	0,1	0,3	0,0	0,1
36	0,1	0,0	0,1	0,3	0,0	0,1
48	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1
68	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0
72	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0

Tabela A.3 Zmiany w przyrostach objętości gazu występujące podczas ciemnej fermentacji prowadzonej dla różnych materiałów wsadowych

Czas [h]	Przyrost objętości gazu ± 40 ml, ml					
	Glukoza bez kontroli pH	Glukoza	Ślepa próba	Topola energetyczna	Serwatka	Glicerol
		z kontrolą pH				
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	24,98	25,20	0,09	12,32	0,59	1,77
2	87,22	86,99	3,28	14,32	1,42	2,82
3	121,13	124,20	4,20	20,23	5,10	9,95
4	241,51	235,73	11,68	32,25	8,6	20,79
5	318,44	336,31	13,11	125,30	10,23	33,95
6	376,41	412,72	14,04	301,20	11,40	53,14
7	385,22	476,08	14,13	433,23	15,26	96,36
16	411,25	653,00	14,35	594,23	26,55	103,88
18	434,21	688,88	15,76	626,88	49,30	113,27
20	462,14	728,89	17,06	663,29	65,12	120,06
24	511,05	769,68	21,07	700,41	137,60	138,75
28	555,52	799,22	36,40	727,29	228,99	158,34
36	562,12	870,13	59,20	791,82	436,81	198,35
48	571,03	876,16	64,30	797,31	462,13	203,09
68	596,28	899,20	75,50	818,27	506,63	211,35
72	596,44	899,22	76,30	818,29	507,42	212,70