

## CAMERA SEPARATORIA

Volume 10, Number 2 / 2018, pp. 52-63

**Edyta SŁUPEK\*, Patrycja MAKOŚ, Marian KAMIŃSKI**

Katedra Inżynierii Procesowej i Technologii Chemicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska,

\*Autor do korespondencji, e-mail: edyta.slupek@pg.edu.pl

### **Metodyka oznaczania sumarycznej zawartości inhibitorów fermentacji ciemnej oraz monocukrów w brzeczках fermentacyjnych techniką HPLC-RID-UV-VIS/DAD**

**Streszczenie:** W pracy przedstawiono wyniki badań oraz opracowaną w ich rezultacie metodykę ilościowego oznaczania sumarycznej zawartości inhibitorów fermentacji ciemnej oraz monocukrów w brzeczках fermentacyjnych z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej (RP-HPLC-RID-UV-VIS/DAD). Najbardziej przydatną do zbadania sumarycznej zawartości inhibitorów w próbkach rzeczywistych okazało się zastosowanie warunków chromatografii wykluczania jonowego (IExclC) z kolumną Shodex (1) SH1011, 7  $\mu\text{m}$ , 8x300 mm, przy natężeniu przepływu (1,2 mL/min) eluentu o składzie  $\text{H}_2\text{O} + 0,2\% \text{HCOOH}$  z termostatowaniem kolumny w  $60^\circ\text{C}$  oraz objętości dozowania brzeczki fermentacyjnej  $v=50 \mu\text{L}$ . Metodyka charakteryzuje się niskimi wartościami granicy wykrywalności (0,073 mg/L) oraz oznaczalności (0,219 mg/L), szerokim zakresem liniowości (0,219-3,600) oraz dobrą powtarzalnością (RSD poniżej 4,4 %). Opracowana metodyka została z powodzeniem zastosowana do zbadania sumarycznej zawartości inhibitorów w rzeczywistych próbkach brzeczek fermentacyjnych z oznaczeniem dodatkowym zawartości monocukrów.

**Słowa kluczowe:** chromatografia cieczowa (RP-HPLC-RID-UV-VIS/DAD), inhibitory fermentacji ciemnej, przygotowanie próbki

### **Methodology for determining the total content of dark fermenters and monosugars in fermentation broths by HPLC-RID-UV-VIS/DAD**

**Abstract:** The paper presents the results of research and the methodology developed for the quantitative determination of the total content of dark fermenters and monosugars in fermentation broths using the liquid chromatography technique (RP-HPLC-RID-UV-VIS / DAD). The use of Ion Exclusion Chromatography (IExclC) conditions with the Shodex column (1) SH1011, 7  $\mu\text{m}$ , 8x300 mm, with a flow rate of 1.2 mL/min eluent with  $\text{H}_2\text{O} + 0.2\% \text{HCOOH}$  with the eluent proved to be the most useful for testing the total content of inhibitors in real samples. column thermostat at  $60^\circ\text{C}$  and dosing volume of fermentation broth  $v=50 \mu\text{L}$ . The methodology is characterized by low detection limit values (0.073 mg/L) and determination (0.219 mg/L), wide range of linearity (0.219-3.600) and good repeatability (RSD below 4.4 %). The developed methodology has been successfully used to examine the total content of inhibitors in real samples of fermentation broths with additional monosugars.

**Key words:** liquid chromatography (RP-HPLC-RID-UV-VIS/DAD), dark fermentation inhibitors, sample preparation

#### **1. Wstęp (Introduction)**

Przystąpienie Polski do Unii Europejskiej spowodowało wzrost świadomości związanej z zagrożeniem środowiska, wywołanym stosowaniem energii nieodnawialnej. Wykorzystywanie paliw kopalnych, w celach energetycznych powoduje negatywne skutki dla naszego środowiska, dlatego stosowanie odnawialnych, czystych źródeł energii jest niezbędne, gdyż można je pozyskiwać w zrównoważony sposób, ze źródeł niekopalnych i niejądrowych. Energia odnawialna obejmuje energię słoneczną, wiatrową, wodną, oceaniczną, geotermalną, biomasę i inne źródła energii. Większość globalnego biowodoru jest obecnie produkowana poprzez reforming parowy, jednak coraz częściej zwraca się uwagę na metody biotechnologiczne, takie jak ciemna fermentacja i foto-fermentacja. Wodór w ciemnej fermentacji wytwarzany jest przez fermentujące beztlenowe mikroorganizmy, natomiast w foto-fermentacji wodór wytwarzany jest dzięki mikroorganizmom fotosyntetycznym, które wykorzystują cząsteczki wody lub proste kwasy jako donory elektronów (np. bakterie fotosyntetyczne). Ciemna fermentacja ma kilka zalet w stosunku do foto-

fermentacji, m.in. jako surowiec można wykorzystywać różne organiczne odpady i ścieki, oraz nie zależny od warunków pogodowych [1].

Biomasa lignocelulozowa jest odnawialnym i tanim surowcem, składającym się z trzech biopolimerów (celulozy, hemicelulozy oraz ligniny). Lignina występująca w materiale lignocelulozowym utrudnia bezpośrednie wykorzystanie biomasy do produkcji biopaliw. Konwersja biomasy lignocelulozowej polega na obróbce wstępnej biomasy lignocelulozowej (hydroliza utleniająca, kwaśna lub zasadowa) w wyniku czego następuje delignifikacja. Dzięki rozerwaniu struktury ligniny zwiększa się podatność materiału na hydrolizę enzymatyczną oraz fermentację ciemną [2, 3, 7].

Wytwarzanie biopaliw drugiej generacji z surowców lignocelulozowych metodami fermentacyjnymi jest złożonym procesem mikrobiologicznym, w których stosuje się różnego typu fermentujące mikroorganizmy, które wytwarzają biowodór. Produkcja biowodoru jest zależna od wielu parametrów takich jak: pH, temperatura, rodzaj podłoża biologicznego, konkurencja mikrobiologiczna, produkty uboczne czy dostępność makro- i mikroelementów. Efektywne prowadzenie procesu fermentacji ciemnej jest związane z monitorowaniem biowodoru oraz inhibitorów powstających w brzeczce fermentacyjnej. W związku z tym, celowe jest opracowanie nowych metodyk, umożliwiających oznaczenie stężenia inhibitorów oraz monocukrów w brzeczce fermentacyjnych.

Obecnie w literaturze występują wiele metod stosowanych do oznaczania monosacharydów (glukozy czy ksylozy) za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, wyposażonej w detektor RID z kolumną Aminex HPX-87H z wkładką ochronną Carbo-P. Wykorzystywaną kolumnę termostatowano w 80°C, natomiast jako fazę ruchomą używano 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> przy prędkości przepływu 0,6 mL/min. Oznaczanie całkowitej zawartości związków fenolowych zazwyczaj wykonuje się za pomocą metody kolorymetrycznej Folina-Ciocalteu. Poszczególne wolne kwasy fenolowe można oznaczyć przy użyciu techniki HPLC wyposażonej w detektor UV oraz kolumnę Eclipse SDB C18. Kolumnę termostatowano w 35°C. Rozdzielanie przeprowadzono stosując fazę ruchomą A (0,5% kwas octowy w ultraczystej wodzie) oraz fazę ruchomą B (5,0% ultraczysta woda z dodatkiem 0,5% kwasu octowego w metanolu) z zastosowaniem elucji gradientowej. Objętość dozowanej próbki wynosiła 20 µL przy prędkości przepływu 1 mL/min z czasem rozdzielania trwającym 55 minut [4].

W pracy przedstawiono nowe procedury badania składu brzeczki fermentacyjnych ciemnej fermentacji, w zakresie oznaczania sumarycznej zawartości inhibitorów fermentacji oraz monocukrów. Metodyki opracowano w oparciu o zastosowanie techniki chromatografii cieczowej (RP-HPLC-RID-UV-VIS/DAD).

## 2. Część eksperymentalna (*Experimental*)

### 2.1. Materiały (*Materials*)

W badaniach wykorzystano substancje wzorcowe, w tym sole nieorganiczne: chlorek sodu, siarczan (VI) sodu (cz.d.a. POCH). Substancje wzorcowe cukrów: D(+) Glukoza (≥99,5% Sigma Aldrich), D(+) Celobioza (≥99% Sigma Aldrich), D(+) Ksyloza (≥99% Sigma Aldrich), D(+) Mannoza (≥99% Sigma Aldrich), D(-) Arabinoza (≥98% Sigma Aldrich), D(+) Galaktoza (≥98% Sigma Aldrich). Substancje wzorcowe kwasów organicznych, związków feonolowych i furanowych: Kwas bursztynowy (Laborchemie), Kwas mlekowy (85% Sigma-Aldrich), Hydroksyacetony (90% Sigma Aldrich), Gwajakol (≥99% Acros Organic), Kwas wanilinowy (97% Sigma Aldrich), 1,2-dihydroksybenzen (≥99% Sigma Aldrich), Kwas 4-hydrokysbenzen (99% Sigma Aldrich), Kwas trans-ferulowy (99% Sigma Aldrich), Wanilina (99% Sigma Aldrich), Kwas syringowy (≥95% Sigma Aldrich), 5- hydroksymetylofurfural (≥99% Sigma Aldrich), Furfural (99.9% Sigma Aldrich), Kwas lewulinowy (99% Sigma Aldrich), Syringol (99% Sigma Aldrich), Fenol (≥96%, Sigma Aldrich), Kwas mrówkowy (80% POCH), Kwas octowy (>99% Sigma Aldrich), Kwas butanowy (≥99% Sigma Aldrich).

Jako rozpuszczalnik do przygotowania roztworów substancji wzorcowych zastosowano wodę dejonizowaną. Do badań techniką RP-HPLC-RID-UV-VIS/DAD zastosowano wodę dejonizowaną z 0,2% HCOOH (80% POCH) oraz techniką RP-HPLC-RID zastosowano wodę dejonizowaną.

### 2.2. Aparatura (*Instruments*)

W badaniach nad oznaczaniem sumarycznej zawartości inhibitorów fermentacji zastosowano wysokosprawny chromatograf cieczowy (Merck – Hitachi, Niemcy), wyposażony w pompę L-7100 z tzw. niskociśnieniowym systemem gradientowym. Kolumnę Shodex (1) SH1011, 7 µm, 8x300 mm, H811077 (termostatowano za pomocą termostatu ACS). Układ posiadał dwa szeregowo połączone detektory: spektrofotometryczny (L-7450 – Merck – Hitachi, Niemcy) w zakresie UV-VIS z wykorzystaniem czujników

fotodiodowych (DAD) oraz różnicowy refraktometrycznym (RID – RI Detector 2100 – Knauer, Niemcy). Dodatkowo aparat posiadał zawór do zmiany kierunku przepływu fazy ruchomej w kolumnie - back-flush (Merck, Niemcy), sterowany manualnie. Do rejestracji oraz obróbki wyników wykorzystano oprogramowanie HSM.

Dodatkowo w badaniach nad oznaczaniem sumarycznej zawartości inhibitorów fermentacji do zastosowano wysokosprawy chromatograf cieczowy (Merck – Hitachi, Niemcy), wyposażony w pompę L-7100 z tzw. niskociśnieniowym systemem gradientowym. Kolumnę Rezex Pb<sup>2+</sup> (300x7.8 mm, 8 µm) – Phenomenex, Torrance, CA, USA (termostatowano za pomocą termostatu CT80). Układ posiadał sprzężony różnicowy detektor refraktometryczny (RID – RI Detector 2100 – Knauer, Niemcy). Do rejestracji oraz obróbki wyników wykorzystano oprogramowanie Turbochrom.

## 2.3. Metody postępowania (Methods)

### 2.3.1. Analiza ilościowa (Quantitative analysis)

Analizę ilościową wykonano w oparciu o krzywą kalibracyjną, która przedstawia zależność powierzchni piku od stężenia syringolu. W tym celu przygotowano roztwór wyjściowy syringolu w wodzie dejonizowanej w stężeniu około 3,6 mg/mL. Poprzez rozcieńczenie roztworu wyjściowego w wodzie dejonizowanej, przygotowano roztwory kalibracyjne w stężeniach 2,4; 1,2; 0,9 mg/mL.

### 2.3.2. Wyznaczenie parametrów metodyki i zapewnienie jakości wyników (Determination of method parameters and ensuring the quality of results)

Granica wykrywalności (LOD) została wyznaczona na podstawie równania (1):

$$LOD = \frac{3.3 \cdot Sa}{b} \quad (1)$$

gdzie:  $Sa$  – odchylenie standardowe wyrazu wolnego prostoliniowej krzywej kalibracyjnej,  
 $b$  – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej.

Granice oznaczalności (LOQ) wyznaczono na podstawie równania (2):

$$LOQ = 3LOD \quad (2)$$

Zbadano liniowość przebiegu krzywej kalibracyjnej w zakresie stężeń 0,9 – 3,6 mg/mL. Ocenę liniowości odpowiedzi detektora (RID) w badanym zakresie dokonano na podstawie współczynnika regresji ( $r$ ). Wyznaczane zależności liniowe (pole powierzchni piku od stężenia analitu) krzywej kalibracyjnej powinny być równe lub nieistotnie różne od 1.

Precyzję metody oszacowano na podstawie współczynnika zmienności (RSD - *ang. Relative Standard Deviation*) [5]:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \quad (3)$$

gdzie:  $s$  – odchylenie standardowe wyników trzech powtórzeń danego stężenia  
 $\bar{x}$  – średnia wartość z trzech pomiarów danego stężenia.

## 2.4. Fermentacja ciemna z wykorzystaniem hydrolizatów powstałych z biomasy lignocelulozowej (Dark fermentation using hydrolysates derived from lignocellulosic biomass)

Próbki poddane badaniom, zostały przygotowane w następujący sposób: materiał biomasy lignocelulozowej (kaczany kukurydzy) pocięto na zrębki za pomocą rozdrabniacza ogrodowego (Mec Tools). Następnie materiał zmielono w młynie ZM 200 (Retsch) z wykorzystaniem sita o średnicy 0,75 mm. Biomase lignocelulozową suszono przez 4 godziny w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 105°C, do stałej masy. W celu powolnego ochłodzenia, materiał umieszczono w ekzykatorze zawierającym środek suszący w postaci NaOH. Po osiągnięciu temperatury pokojowej, przeniesiono w ilości po 1 g do fiolek wirówkowych do których dodano po 20 mL roztworu katalizatora hydrolizy utleniającej (1:20 – m/V). Badane procesy różniły się rodzajem użytego katalizatora, każdy proces został wykonany w trzech powtórzeniach. Wykorzystywane katalizatory zestawiono poniżej:

- I. Przefiltrowany nasycony wodny roztwór Ca(OH)<sub>2</sub> - doprowadzony do pH ± 11,5 za pomocą 0,5 M NaOH.
- II. Wodę dejonizowaną zmieszano z (30% v/v) roztworem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> otrzymany roztwór doprowadzono do pH ± 11,5 za pomocą 0,5 M NaOH.

- III. Przefiltrowany nasycony wodny roztwór  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  zmieszany z roztworem  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) otrzymany roztwór doprowadzono do  $\text{pH} \pm 11,5$  za pomocą 0,5 M NaOH.
- IV. Odczynnik Fentona przygotowany przez zmieszanie wodnego roztworu  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  oraz  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) w stosunku molowym 1:25 – doprowadzono roztwór do  $\text{pH} \pm 3,0$  za pomocą 0,5% kwasu szczawiowego.
- V. Roztwór zawierający  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  oraz 2,2'-bipirydynę (2 mM  $\text{Fe}^{2+}$  i 4 mM bipirydyny), do którego dodano roztwór  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v), tak aby stosunek molowy  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  w mieszaninie reakcyjnej wynosił 1:25.

Obróbkę wstępną biomasy lignocelulozowej prowadzono przez 6 godzin w temperaturze 25°C, w wytrząsarce z łaźnią wodną. Następnie, próbki odwirowano w wirówce (Hettichzentrifugen, D-78533 Tuttlingen,) przez 10 minut przy prędkości 5000 RPM i przesączono przez lejek Buchnera w celu oddzielenia fazy stałej od roztworu. Osad przemyto trzykrotnie wodą dejonizowaną, a następnie dwukrotnie acetonem, aby zapewnić całkowite usunięcie ligniny i pochodnych hemicelulozy. Osad suszono w suszarce laboratoryjnej przez 24 godziny w 105°C, który następnie umieszczono w eksykatorze z substancją suszącą, w postaci NaOH. Stałą pozostałość po wstępnej obróbce chemicznej (1 g) przeniesiono do roztworu enzymów cellulolitycznych (20 mL), zawierającego *Viscozyme L* (Novozymes Corp., Kopenhaga Dania) uzupełnionego  $\beta$ -glukozydazą (Sigma-Aldrich, Sztokholm, Szwecja). Biomase lignocelulozową z roztworem enzymów umieszczono w fiolkach wirówkowych, które wytrząsano w 42°C przez 24 godziny w wytrząsarce z łaźnią wodną. Enzym rozdzielono od powstałego hydrolizatu przez ogrzewanie fiolek wirówkowych w 60°C, następnie odwirowano (Hettichzentrifugen, D-78533 Tuttlingen, 3000 RPM). Enzymatyczne hydrolizaty wykorzystano jako „wsad cukrowy” do ciemnej fermentacji przeprowadzanej przy użyciu mieszanego osadu czynnego (miejska oczyszczalnia ścieków, Saur Neptun Gdańsk, Polska) po procedurze Faloye [6]. Ciemną fermentację przeprowadzono w sterylnych 1200 mL szklanych bioreaktorach o objętości roboczej 1 L. Bulion fermentacyjny pracował w regulowanych warunkach pH. Początkowy bulion fermentacyjny składał się z 900 mL hydrolizatów i 100 mL wstępnie mieszanego osadu ściekowego przygotowanego zgodnie z procedurą Faloye. Stężenie monocukrów w początkowym bulionie fermentacyjnym ustalono na 5,5 g/L. Bulion fermentacyjny doprowadzono do  $\text{pH} \pm 7,00$  za pomocą 1 M NaOH. Przed inokulacją warunki anaerobowe wytworzono przez przedmuchiwanie reaktorów sterylnym azotem (Linde, czystość N5) przez 60 minut. Proces fermentacji ciemnej przeprowadzono w temperaturze 37°C utrzymując ciągle mieszanie 320 RPM.

## 2.6. Przygotowanie próbki do analiz HPLC (*Sample preparation for HPLC analysis*)

Z trwającego procesu fermentacji ciemnej pobrano próbki do badań oznaczania sumarycznej zawartości inhibitorów fermentacji oraz badań zmiany stężeń występujących cukrów w brzeczkach fermentacyjnych. Brzeczki fermentacyjne poddano inkubacji w 60°C w suszarce laboratoryjnej przez 15 minut w celu usunięcia białek – metodą denaturacji termicznej. Następnie próbki brzeczek fermentacyjnych zamrożono w celu przechowywania próbki. Kolejnym krokiem podczas przygotowania próbki było rozmrożenie brzeczki fermentacyjnej. Umieszczono próbkę w wirówce (Hittachi EBA 8S) i wirowano przez 5 minut przy prędkości 3000 RPM - w celu wstępnego usunięcia fazy stałej. Fazę wodną (1,0 mL) przefiltrowano przez filtr strzykawkowy hydrofilowy-celulozowy 0,45  $\mu\text{m}$  (Hahnemühle FineArt HmbH, Niemcy) i przeniesiono do fiołki 1,5 mL. Analizie chromatograficznej poddawano próbkę o objętości 50  $\mu\text{L}$ .

## 2.7. Optymalne warunki rozdzielania (*Optimum separation conditions*)

W badaniach zastosowano RP-HPLC-RID-UV-VIS/DAD z eluentem  $\text{H}_2\text{O} + 0,2\%$  HCOOH o natężeniu przepływu 1,2 mL/min. Temperatura termostatowanej kolumny wynosiła 60°C. Czas analizy 30 minut. Po czasie 7,6 minuty zastosowano przepływu zwrotnego w celu wyeluowania wzorca syringolu.

## 3. Wyniki i dyskusja (*Results and discussion*)

### 3.1. Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego (*Optimization of chromatographic separation conditions*)

Warunki prowadzenia rozdzielania chromatograficznego (RP-HPLC-RID-UV-VIS/DAD) brzeczki fermentacyjnej poddano optymalizacji w zakresie: rodzaju kolumny, długości kolumny, temperatury termostatowanej kolumny oraz natężenia przepływu eluentu. Efekt zmian poszczególnych parametrów



oceniano na podstawie porównania rozdzielania poszczególnych frakcji (sole, cukry oraz inhibitory: kwasy organiczne, związki fenolowe oraz furanowe).

Dobór odpowiedniej kolumny wykonano poprzez rozdzielanie mieszaniny wzorcowej składającej się z mieszaniny soli, cukrów oraz inhibitorów (Tabela 1). Badano kolumny:

- ✓ Shodex (1) SH1011, 7  $\mu\text{m}$ , 8x300 mm, H811077
- ✓ LiChrospher® 100RP-18e, 5  $\mu\text{m}$  x 12.5 mm, No.250044
- ✓ Połączone systemem ManCurt® dwie kolumny Merck 50931 LiChrospher 100RP-18 – 5  $\mu\text{m}$  x 25 mm.

Na podstawie uzyskanych wyników, najlepsze rozdzielanie poszczególnych grup uzyskano po zastosowaniu kolumny Shodex (1) SH1011, 7  $\mu\text{m}$ , 8x300 mm, H811077, którą wykorzystano do dalszej optymalizacji metodyki. Dla kolumny Shodex (1) SH1011 dobrano optymalne warunki temperatury kolumny, natężenia przepływu eluentu oraz objętości dozowania. Szczegółowy zakres badań nad doбором optymalnych warunków rozdzielania zestawiono poniżej:

- temperatura: 40; 60; 80°C
- prędkości przepływu eluentu: 0,6; 1,2; 1,6 mL/min
- objętość dozowania: 25; 50; 100  $\mu\text{L}$ .

Wyniki badań nad rozdzielaniem chromatograficznym wykazały, że w temperaturze 40°C nie uzyskano rozdzielania pomiędzy frakcją soli i cukrów, natomiast przy zastosowaniu 60 i 80°C nie zaobserwowano znaczącej różnicy w uzyskanych wynikach. Ze względów ekonomicznych wybrano temperaturę 60°C. W kolejnym etapie dobrano optymalną prędkość przepływu eluentu, która wynosiła 0,6 mL/min, przy tej prędkości czas analizy trwał ok. 70 min. Natomiast stosując 1,6 mL/min napotymano problemy z pobieraniem frakcji cukrowej, gdyż zbyt blisko siebie eluowały frakcje soli oraz cukrów. Kolejnym etapem było zoptymalizowanie objętości dozowania. Stosując 25  $\mu\text{L}$  uzyskiwano zbyt małe stężenie frakcji cukrów, które uniemożliwiało dalsze rozdzielania chromatograficzne z wykorzystaniem kolumny Pb<sup>2+</sup>. Podczas dozowania 100  $\mu\text{L}$  otrzymano przeładowanie stężeniowe, które uniemożliwiało oznaczanie inhibitorów fermentacji.

Najlepsze wyniki rozdzielania otrzymano dla kolumny Shodex (1) SH1011, 7  $\mu\text{m}$ , 8x300 mm, H811077 o natężeniu przepływu 1,2 mL/min z termostatowaną kolumną w temperaturze 60°C oraz objętości dozowania 50  $\mu\text{L}$  (Rys.1.).

Tabela 1. Mieszaniny wzorcowe wykorzystywane w optymalizacji metody RP-HPLC-RID-UV-VIS/DAD.

Table 1. Standard solutions used in the optimization of the RP-HPLC-RID-UV-VIS/DAD method.

Mieszanina wzorcowa					
Sole (1.) [mg/mL]		Cukry (2.) [mg/mL]		Inhibitory fermentacji (3.) [mg/mL]	
Chlorek sodu	12,0	Glukoza	5,4	Kwas bursztynowy	0,015
Siarczan (VI) sodu	13,4	Ksyloza	5,4	Kwas mlekowy	0,014
		Mannoza	5,5	Hydroksyaceton	0,015
		Celobioza	5,4	Gwajakol	0,015
		Arabinoza	5,4	Kwas wanilinowy	0,005
		Galaktoza	8,4	1,2-dihydroksyaceton	0,001
				4-hydroksybenzen	0,002
				Wanilina	0,007
				Syringol	0,012
				HMF	0,015
				Furfural	0,014
				Kwas lewulinowy	0,014
				Kwas syryngowy	0,004
				Fenol	0,016

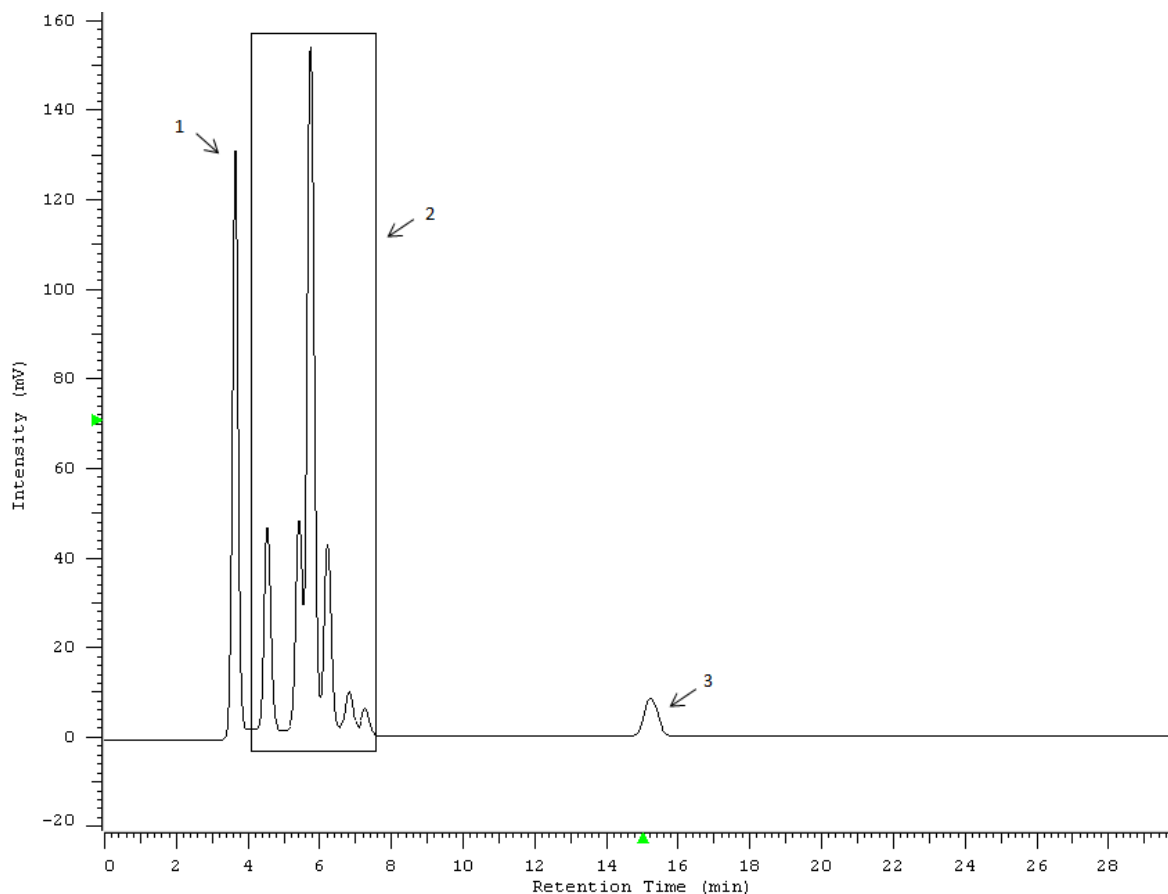
Względem chromatogramów zamieszczonych na Rys.1. i Rys.2. wyznaczono pomiędzy frakcją cukrów oraz inhibitorów:

- współczynnik retencji ( $k=2,94$ ),
- współczynnik selektywności ( $\alpha=2,95$ ).

Jako czas martwy przyjęto pik pochodzący od wzorców soli (1). W tabeli 2. Zestawiono czasy retencji wzorców.

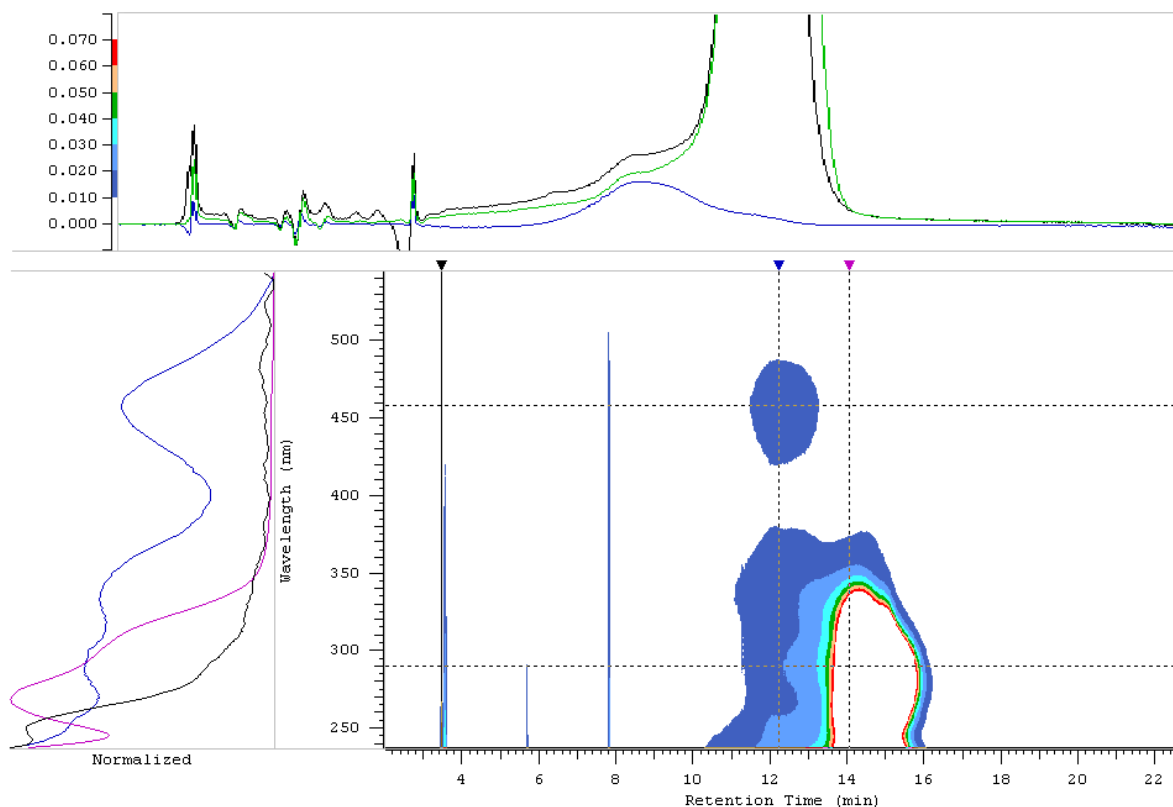
Tabela 2. Czas retencji mieszanin wzorcowych cukrów (2.) oraz inhibitorów fermentacji (3.).  
 Table 2. Retention time of the reference mixtures of sugars (2.) and fermentation inhibitors (3.).

Czas retencji	Substancje						
	Celobioza	Glukoza	Ksyloza	Galaktoza	Arabinoza	Mannoza	Inhibitory
T <sub>R</sub> [min]	4,55	5,45	5,76	6,23	6,79	7,28	14,55



Rys. 1. Chromatogram rozdzielenia mieszaniny wzorcowej zawierającej sole (1.), cukry (2.) oraz inhibitory fermentacji (3.) wg Tabeli 1 o całkowitej objętości dozowania 50  $\mu$ L - RP-HPLC-RID.

Fig. 1. Chromatogram for the separation of the reference mixture containing salts (1.), sugars (2.) and fermentation inhibitors (3.) according to Table 1 with a total dosing volume of 50  $\mu$ L - RP-HPLC-RID.



Rys. 2. Chromatogram rozdzielania mieszaniny wzorcowej zawierającej sole (1.), cukry (2.) oraz inhibitory fermentacji (3.) wg Tabeli 1 o całkowitej objętości dozowania 50  $\mu\text{L}$  - RP-HPLC-UV-VIS/DAD.

Fig. 2. Chromatogram for the separation of the reference mixture containing salts (1.), sugars (2.) and fermentation inhibitors (3.) according to Table 1 with a total dosing volume of 50  $\mu\text{L}$  - RP-HPLC-UV-VIS/DAD.

### 3.1. Wyznaczenie podstawowych parametrów metodyki (Determination of the basic parameters of the methodology)

Do oznaczeń ilościowych wykorzystano metodę krzywej kalibracyjnej. Wykonano kalibrację dla syringolu w oparciu o cztery punkty kalibracyjne. Każdy punkt kalibracyjny powtórzono 3-krotnie. Krzywa kalibracyjna posłużyła do oznaczenia sumarycznej zawartości inhibitorów fermentacji w rzeczywistych próbkach brzeczek fermentacyjnych.

Opracowana metodyka RP-HPLC-RID-UV-VIS/DAD charakteryzuje się dobrą granicą wykrywalności (LOD), oznaczalności (LOQ) oraz powtarzalnością (RSD). Uzyskane wyniki wskazują, że metodyka nadaje się do rutynowych oznaczeń sumarycznej zawartości inhibitorów fermentacji. Wyznaczone parametry metodyki zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Zestawienie uzyskanych wartości parametrów kalibracyjnych dla syringolu.

Table 3. Comparison of obtained values of calibration parameters for syringol.

Związek	a	b	R <sup>2</sup>	LOD [mg/mL]	LOQ [mg/mL]	Zakres liniowości	Stężenie [mg/mL]	RSD [%]
syringol	581382	430499	0,9915	0,073	0,219	0,219-3,600	0,9	4,38
							1,2	1,29
							3,6	1,23

### 3.2. Wyznaczenie sumarycznej zawartości inhibitorów fermentacji w próbkach rzeczywistych brzeczek fermentacyjnych RP-HPLC-RID-UV-VIS/DAD (Determination of the total content of fermentation inhibitors in real samples of fermentation broths RP-HPLC-RID-UV-VIS/DAD)

Oznaczanie sumarycznej zawartości inhibitorów fermentacji wykonano w odniesieniu do krzywej kalibracyjnej wzorca – syringolu. Analizy HPLC brzeczek fermentacyjnych przeprowadzono po wcześniejszym etapie przygotowania próbki. Podczas trwania rozdzielania, zbierano frakcję cukrową między 4,0 oraz 7,6 minutą rozdzielania. Frakcje cukrową oznaczano według procedury NREL wykorzystywanej w pracach [8]. Po zebraniu frakcji cukrowej wykonano przepływ zwrotny eluentu (tzw. *back-flush*), który polegał na zmianie kierunku przepływu eluentu, w celu wyeluowania w postaci jednego pików frakcji pochodzącej od inhibitorów fermentacji (Rys. 3.).

Na podstawie chromatogramu otrzymanego z rozdzielania próbki rzeczywistej – proces II – 16h wyznaczono współczynnik retencji ( $k=3,00$ ) oraz selektywności ( $\alpha=2,95$ ) pomiędzy frakcją cukrów oraz inhibitorów. Jako czas martwy przyjęto pik pochodzący od wzorców soli (1) (Rys. 3, 4.). W tabeli 4. przedstawiono czasy retencji związków powstających podczas procesu II – 16h.

Tabela 4. Czas retencji próbki rzeczywistej – proces II – 16h.

Table 4. Retention time of the real sample - process II - 16h.

Czas retencji	Substancje						
	Celobioza	Glukoza	Ksyloza	Galaktoza	Arabinoza	Mannoza	Inhibitory
$T_R$ [min]	4,78	5,43	< LOD	< LOD	6,77	7,22	14,31

Na podstawie krzywej wzorcowej względem roztworu wzorcowego syringolu, otrzymane powierzchnie pików przeliczono na stężenia sumarycznej zawartości inhibitorów zawartych w brzeczkach fermentacyjnych. Wyniki przedstawiono w tabeli 5.

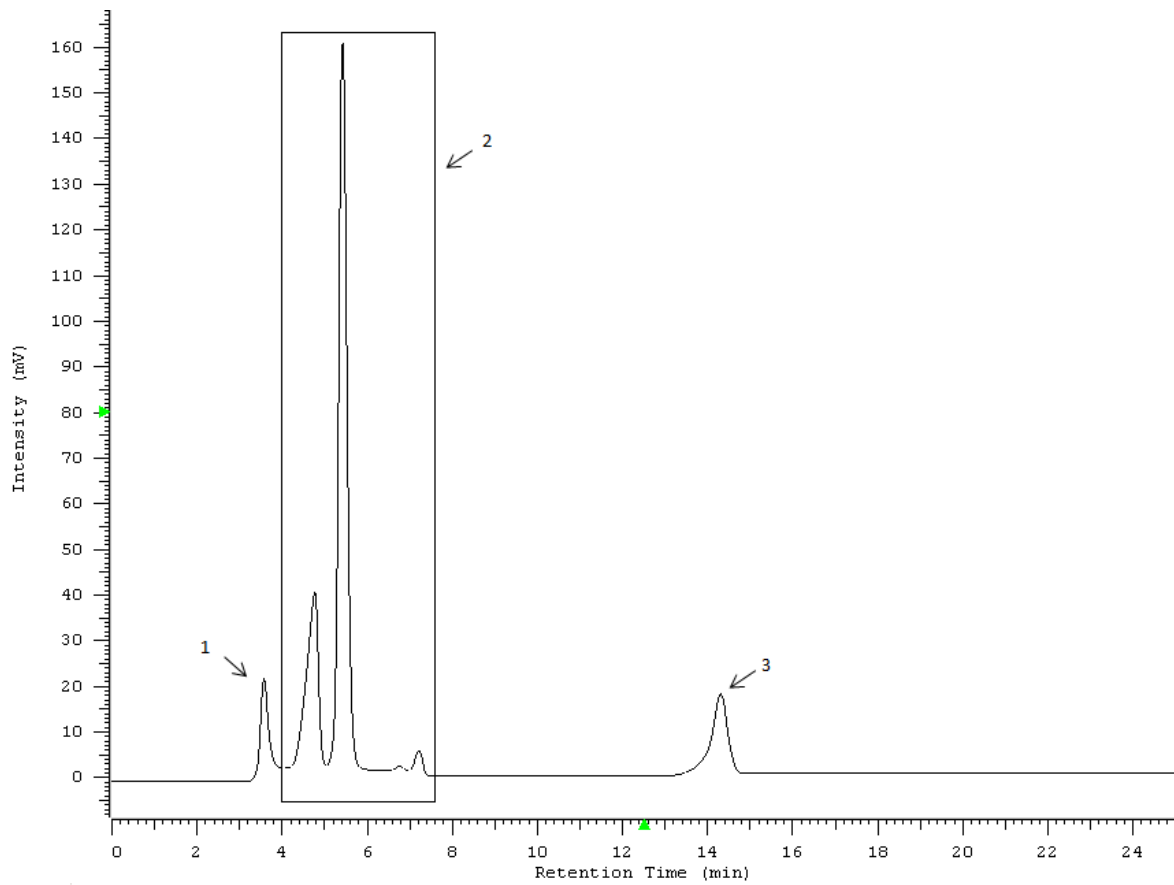
Tabela 5. Sumaryczna zawartość inhibitorów powstających podczas fermentacji ciemnej w procesach I-V oraz procesie modelowym „glukoza”.

Table 5. Total content of inhibitors formed during dark fermentation in I-V and the „glucose” model process.

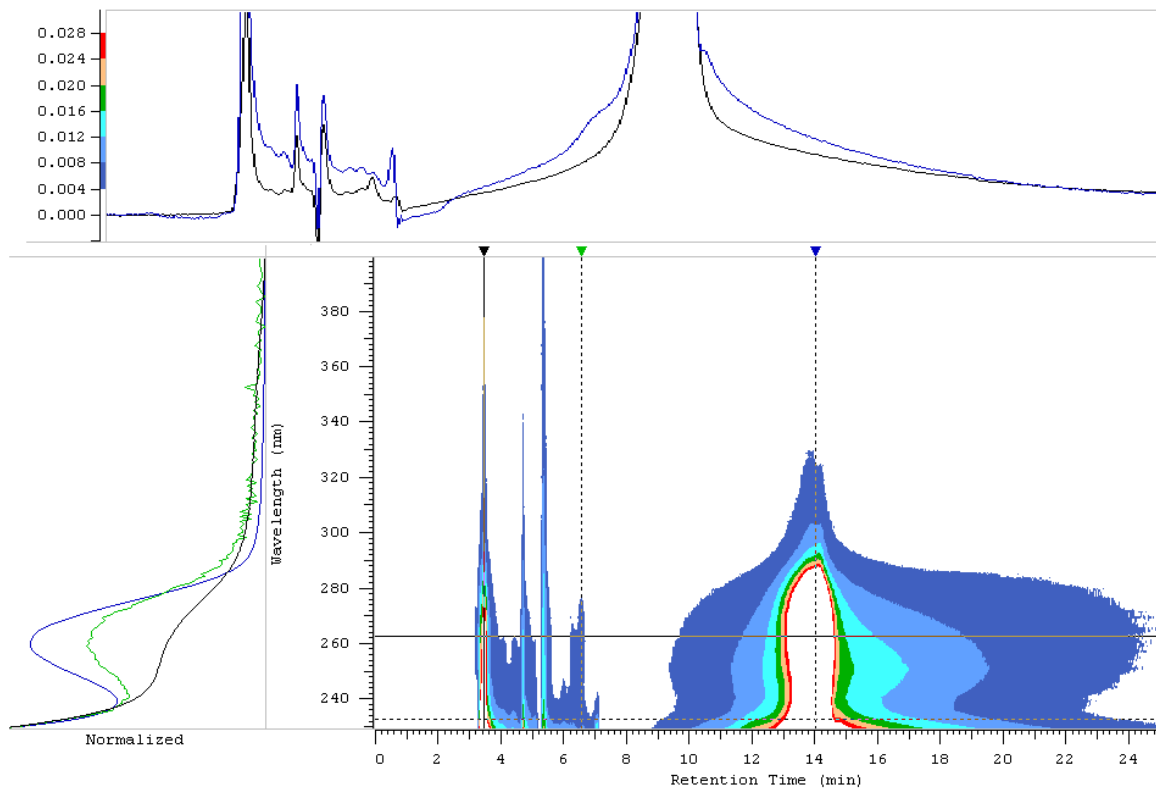
Czas [h]	Stężenie [g/L]					
	I	II	III	IV	V	glukoza
0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
16	<LOQ (~0,13)	<LOQ (~0,12)	<LOD	0,56	<LOD	<LOD
24	1,14	1,41	<LOD	1,19	<LOD	<LOD
48	1,36	1,58	0,73	1,24	<LOQ (~0,12)	0,66
116	1,70	1,82	1,18	1,57	0,62	1,05

LOD=0,073 mg/mL





Rys. 3. Chromatogram rozdzielania badanej próbki brzezki fermentacyjnej (proces II) po czasie 16h – detektor RID.  
 Fig. 3. Chromatogram of separation of the tested fermentation broth sample (process II) after time 16h - RID detector.



Rys. 4. Chromatogram rozdzielania badanej próbki brzezki fermentacyjnej (proces II) po czasie 16h – detektor DAD-3D.  
 Fig. 4. Chromatogram of separation of the tested fermentation broth sample (process II) after time 16h – DAD-3D detector.

### 3.3. Wyznaczenie stężenia cukrów w brzeczках fermentacyjnych (Determination of the concentration of sugars in fermentation broths)

Frację cukrową zebrano w czasie trwania rozdzielania oznaczania sumarycznej zawartości inhibitorów fermentacji ciemnej. Dla każdego badanego procesu zbierano frakcję cukrową w czasie ok 4,0-8,0 minuty czasu trwania rozdzielania. Zebraną frakcję cukrów poddano obróbce wstępnej, która umożliwiała dalsze rozdzielanie frakcji na poszczególne cukry występujące w danym procesie oraz w danym czasie fermentacji ciemnej. Zebraną frakcję cukrów przefiltrowano przez kationową, a następnie anionową kolumnę jonowymienną. Procedurę wymiany jonowej zakończono odparowaniem pozostałości w strumieniu azotu. Frakcję cukrową rozpuszczono w 200  $\mu$ L wody dejonizowanej, a następnie przesączono przez hydrofilowy-celulozowy filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45  $\mu$ m. Analizę cukrów wykonano na wysokosprawnym chromatografie cieczowym RP-HPLC (Merck – Hitachi, Niemcy), wyposażony w pompę L-7100 z tzw. niskociśnieniowym systemem gradientowym. Temperaturę kolumny uzyskano oraz utrzymywano za pomocą termostatu CT80. Układ posiadał sprzężony różnicowy detektor refraktometrycznym (RID – RI Detector 2100 – Knauer, Niemcy). Rozdzielanie RP-HPLC frakcji cukrowej trwało 25 minut wykorzystując układ HPLC-RID, temperatura rozdzielania 60°C; kolumna: Rezex Pb<sup>2+</sup> (300x7.8 mm, 8  $\mu$ m) – Phenomenex, Torrance, CA, USA; eluent: H<sub>2</sub>O; przepływ: 0,6 mL/min; całkowita objętość dozowanej próbki 50  $\mu$ L.

Na podstawie krzywej wzorcowej względem glukozy oraz celbiozy otrzymane powierzchnie pików przeliczono na stężenie cukrów zawartych w brzeczce fermentacyjnej. Wyniki przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Stężenia cukrów zawartych w brzeczce fermentacyjnej w procesach rzeczywistych I-V.  
Table 6. Concentrations of sugars contained in the fermentation broth in real processes I-V.

Proces	Czas	Celbioza	Glukoza	Ksyloza	Galaktoza	Mannoza, Arabinoza
	[h]					
I.	0	0,40	14,7	0,71	0,78	0,85
	24	0,31	1,81	<LOD	0,75	<LOD
	48	0,25	0,95	<LOD	0,74	<LOD
	116	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
II.	0	0,25	19,06	0,71	0,95	0,90
	24	0,21	3,18	<LOD	0,36	<LOD
	48	0,20	1,78	<LOD	<LOD	<LOD
	116	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
III.	0	0,25	19,79	0,71	0,96	0,99
	24	0,12	0,37	0,36	0,71	<LOD
	48	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	116	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
IV.	0	0,31	40,42	0,73	1,75	1,21
	24	0,29	3,06	<LOD	0,36	0,49
	48	0,26	2,16	<LOD	<LOD	0,47
	116	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
V.	0	0,29	34,49	0,72	1,78	1,12
	24	0,17	1,51	<LOD	0,36	0,38
	48	0,14	0,62	<LOD	0,36	0,36
	116	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

LOD=0,01 mg/mL

#### 4. Podsumowanie (Summary)

W pracy przedstawiono metodykę oznaczania sumarycznej zawartości inhibitorów fermentacji z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem RID oraz UV-VIS/DAD.

W celu ilościowego oznaczenia sumarycznej zawartości inhibitorów, a także oddzielenia frakcji cukrowej, dobrano optymalne warunki rozdzielania w zakresie rodzaju kolumny, prędkości przepływu eluentu, temperatury rozdzielania, a także objętości dozowania. Procedurę doboru warunków rozdzielania wykonano dla wzorcowych mieszanin cukrów, soli oraz inhibitorów fermentacji w skład których wchodziły kwasy organiczne, fenole oraz związki furanowe, dobrane na podstawie studium literaturowego. Przy doborze warunków kierowano się zapewnieniem możliwie krótkiego czasu rozdzielania chromatograficznego, a także zapewnieniem względnie dużych współczynników odpowiedzi, które mają istotny wpływ na granice wykrywalności oraz oznaczalności. Ostatecznie wybrano kolumnę w postaci Shodex (1) SH1011, 7  $\mu\text{m}$ , 8x300 mm, H811077, prędkość przepływu 1,2 mL/min, temperatura kolumny 60°C.

Podstawowe parametry kalibracyjne (LOD, LOQ, RSD,  $R^2$  oraz zakres liniowości) uzyskane dla zoptymalizowanej metody wykazują użyteczność i możliwość stosowania metodyki do badań kontroli procesów fermentacji. W metodzie HPLC analizowano zależności powierzchni piku od stężenia syringolu. Wykorzystywana w pracy metoda charakteryzowała się zależnością liniową. Krzywa wykazywała liniowość w zakresie 0,219-3,600 mg/mL. Granica wykrywalności zoptymalizowanej procedury analitycznej wynosi 0,073 mg/mL. Granicę oznaczalności otrzymano na poziomie 0,219 mg/mL. W celu określenia precyzji oznaczeń posłużono się współczynnikami zmienności (RSD, %), zwanym również względnym odchyleniem standardowym, który wynosił 1,23% dla stężenia 3,6 mg/mL.

Uzyskane wyniki podstawowych parametrów kalibracyjnych w połączeniu z prostotą oraz krótkim czasem analizy, wskazują na możliwość stosowania opracowanej metodyki do rutynowej kontroli procesu fermentacji.

Badania próbek rzeczywistych wykazały, że najwięcej inhibitorów fermentacji oznaczono dla procesów I i II. Z kolei najniższe stężenie otrzymano w procesie V, niższą niż dla procesu modelowego (glukoza). Powstające inhibitory fermentacji (zwłaszcza kwasy, fenole i związki furanowe) obniżają opłacalność procesu, ponieważ zmniejsza się wydajność przekształcenia związku organicznych do wodoru.

Wykorzystywana biomasa lignocelulozowa do fermentacji ciemnej składa się ze zmiennych ilości hemicelulozy, celulozy i ligniny. Składniki węglowodanowe (tj. celuloza i hemiceluloza) są zamknięte w złożonej strukturze i nie są dostępne dla mikroorganizmów wykorzystywanych w fermentacji ciemnej. Aby zwiększyć dostępność składników węglowodanowych zawartych w materiale dla drobnoustrojów biomasę lignocelulozową poddaje się różnym technikom obróbki wstępnej (procesy I-V). Jednakże podczas wstępnej obróbki uwalniane jest szerokie spektrum dodatkowych związków organicznych, które mogą hamować wytwarzanie  $\text{H}_2$  lub zmieniać szlak metaboliczny bakterii używanych w procesie ciemnej fermentacji. Kwasy organiczne są naturalnym metabolitem mikroorganizmów, natomiast w efekcie przemian wtórnych glukozy mogą powstawać, np. furfural, 5-HMF, kwas lewulinowy. Z konwersji ligniny mogą powstawać: związki fenolowe (np. fenol, wanilina, aldehyd syringowy).

Stężenia związków furanowych i fenolowych mogą znacznie hamować produkcję  $\text{H}_2$ . Powstające kwasy organiczne w brzemce fermentacyjnej wpływa na mechanizm pompy protonowej oraz zmienia siłę jonową brzemce, jednak powstające produkty są transportowane na zewnątrz komórek. Związki furanowe (furfural, 5-HMF) i fenolowe mogą hamować proces fermentacji przez błony komórkowe, które zakłócają i zmieniają szlak metaboliczny enzymów. Pochodne furanu mają bardziej negatywny wpływ na ciemną fermentację w porównaniu ze związkami fenolowymi.

Opracowana metodyka HPLC-RID-UV-VIS/DAD jest metodyką przesiewową, która umożliwia szybkie wykrycie momentu w którym zaczynają się tworzyć inhibitory fermentacji ciemnej oraz wydajność procesu wytwarzania biowodoru znacznie spadać. Połączenie opisanej metodyki z metodyką oznaczania konkretnych inhibitorów fermentacji z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej w sprzężeniu ze spektrometrem mas (GC-MS) jest bardzo korzystne i potrzebne do dalszych badań naukowych.

#### 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. D. Akroum-Amrouche, N. Abdi, H. Lounici, N. Mameri, *Biohydrogen production by dark and photofermentation processes*, IEEE (2013) 13580455.
2. R. Łukajtis, P. Rybarczyk, K. Kucharska, D. Konopacka-Łyskawa, E. Słupek, K. Wychodnik, M. Kamiński; *Optimization of saccharification conditions of lignocellulosic biomass under alkaline pre-treatment and enzymatic hydrolysis*, Energies (2018) 11, 886.
3. R. Łukajtis, K. Kucharska, I. Hołowacz, P. Rybarczyk, K. Wychodnik, E. Słupek, P. Nowak, M. Kamiński; *Comparison and Optimization of Saccharification Conditions of Alkaline Pre-Treated Triticale Straw for Acid and Enzymatic Hydrolysis Followed by Ethanol Fermentation*, Energies (2018) 11, 639.
4. X. Wang, Y.F. Tsang, Y. Li, X. Ma, S. Ciu, T-A. Zhang, J. Hu, M-T. Gao; *Inhibitory effects of phenolic compound of rice straw formed by saccharification during ethanol fermentation by Pichia stipitis*, Bioresource Technology 224 (2017) 1059-1067.
5. N.T. Petkova, R. Vrancheva, P. Denev, I. Ivanov; *HPLC - RID method for determination of inulin and fructooligosaccharides HPLC-RID*, Acta Scientifica Naturalis (2014) 1, 99-107
6. F.D. Faloye, E.B. Gueguim Kana, S. Schmidt; *Optimization of hybrid inoculum development techniques for biohydrogen production and preliminary scale up*, Int. J. Hydrogen Energy (2013) 38, 11765–11773.
7. K. Kucharska, R. Łukajtis, E. Słupek, H. Cieśliński, P. Rybarczyk, M. Kamiński; *Hydrogen Production from Energy Poplar Preceded by MEA Pre-Treatment and Enzymatic Hydrolysis*, Molecules (2018) 23, 1–21.
8. A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker; *Determination of structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, U.S. Department of Energy (2012) NREL/TP-510-42618.