

## CAMERA SEPARATORIA

Volume 10, Number 2 / 2018, pp. 64-80

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

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

\*Autor do korespondencji, e-mail: [patrycja.makos@pg.edu.pl](mailto:patrycja.makos@pg.edu.pl)

### Metodyka rozdzielania i oznaczania lotnych inhibitorów fermentacji w brzeczkach fermentacyjnych ciemnej fermentacji, techniką GC-MS

**Streszczenie:** W pracy przedstawiono opracowaną w wyniku badań metodykę identyfikacji i oznaczania inhibitorów fermentacji w brzeczkach fermentacji ciemnej z biomasy ligno-celulozowej, z wykorzystaniem ekstrakcji ciecz-ciecz w sprzężeniu z chromatografią gazową ze spektrometrem mas (LLE-GC-MS). W ramach badań dokonano doboru korzystnych warunków ekstrakcji ciecz-ciecz, w tym: pH, objętości rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, czasu ekstrakcji oraz warunków wirowania. Opracowana metodyka charakteryzuje się niskimi wartościami granicy wykrywalności (0,0086 – 3,75 mg/L) i oznaczalności, dobrą powtarzalnością i szerokim zakresem liniowości. W próbkach brzeczek fermentacyjnych, zidentyfikowano trzy inhibitory fermentacji (furfural, gwajakol i syringol) w stężeniach w zakresie od 0,04 do 2,45 mg/L. Dodatkowo, osiem innych inhibitorów, w tym głównie lotne kwasy tłuszczowe w stężeniach od 2,86 do 956 mg/L zidentyfikowano w brzeczkach, w trybie SCAN. Wyniki badań, wskazują na konieczność monitorowania przebiegu procesu fermentacji ciemnej w zakresie powstawania inhibitorów fermentacji, których obecność wpływa toksycznie na mikroorganizmy wytwarzające biowodór.

**Słowa kluczowe:** biomasa ligno-celulozowa, fermentacja ciemna, inhibitory fermentacji, ekstrakcja ciecz-ciecz, chromatografia gazowa - spektrometria mas (GC-MS)

### Method for the separation and determination of volatile fermentation inhibitors in broths from dark fermentation, using GC-MS

**Abstract:** The paper presents the method for the qualitative and quantitative determination of fermentation inhibitors in fermentation broths for bio-hydrogen, using liquid-liquid extraction and gas chromatography with mass spectrometry (LLE-GC-MS). Initially, the extraction parameters were optimized. These included: pH, volume of extraction solvent, pH, extraction time as well as speed of centrifugation. The developed method has low detection limits (0,0086 – 3,75 mg/L), and determination, good repeatability and a wide range of linearity. In fermentation broth samples, three fermentation inhibitors (furfural, guaiacol and syringol) were identified in concentrations ranging from 0.04 to 2.45 mg/L. In addition, eight more inhibitors, mainly volatile fatty acids in concentrations from 2.86 to 956 mg/L, were identified in fermentation broth, using the SCAN mode. The paper demonstrates the need for monitoring inhibitors in fermentation broth during dark fermentation process, due to the fermentation inhibitors are toxic to biohydrogen-producing microorganisms.

**Key words:** fermentation inhibitors, lignocellulosic biomass, dark fermentation, liquid-liquid extraction, gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS)

## 1. Wstęp (Introduction)

W ostatnich latach obserwuje się gwałtowny wzrost zainteresowania wytwarzaniem energii ze źródeł odnawialnych, który wynika z postępującego kryzysu energetycznego, degradacji środowiska, a także wyczerpywaniu się złóż kopalnych [1]. Wśród alternatywnych źródeł energii szczególnie atrakcyjny wydaje się biowodór, który charakteryzuje się wysoką wartością opałową 120 MJ/kg oraz brakiem toksycznych produktów ubocznych w procesie spalania, gdyż jedynym produktem ubocznym jest woda. Wodór może być wykorzystywany jako paliwo do silników spalinowych, a także do produkcji energii w ogniach paliwowych. Aktualnie, najpopularniejsze metody produkcji wodoru polegające na elektrolizie wody lub termokatalizie związków bogatych w wodór, są bardzo energochłonne [2]. Alternatywą jest produkcja wodoru z wykorzystaniem metod biologicznych w tym m.in. fermentacji ciemnej. Do produkcji biowodoru z zastosowaniem fermentacji ciemnej można stosować ścieki komunalne, przemysłowe, a przede wszystkim odpady organiczne. Wielkość produkcji biowodoru uzależniona jest od wielu czynników w tym m.in. od

rodzaju substratu, rodzaju mikroorganizmów biorących udział w procesie, temperatury, wartości pH czy podatności substratu na rozkład biologiczny. Istotnym jest również występowanie tak zwanych inhibitorów fermentacji, czyli substancji których obecność w brzeczkach fermentacyjnych nawet w niewielkich stężeniach może powodować znaczne obniżenie wydajności produkcji biowodoru lub nawet doprowadzić do jego całkowitego zahamowania. Inhibitory powstają głównie w procesie wstępnej obróbki biomasy [3, 4], bądź też mogą być wytwarzane w toku procesu fermentacji. Do inhibitorów fermentacji ciemnej należą przede wszystkim lotne kwasy tłuszczowe, związki fenolowe, a także związki furanowe [3, 5]. Z uwagi na ich niekorzystny wpływ na proces wytwarzania biowodoru, celem jest kontrolowanie procesu w zakresie tworzenia inhibitorów w brzeczkach fermentacyjnych.

Aktualnie, w celu oznaczenia ilościowego inhibitorów fermentacji w próbkach brzeczek fermentacyjnych, stosuje się głównie proste testy oznaczania sumarycznej zawartości inhibitorów. Niemniej, metody te uniemożliwiają oznaczenie poszczególnych związków organicznych, które w zależności od struktury w różnym stopniu toksycznie oddziałują na mikroorganizmy wytwarzające biowódór. Z uwagi na bardzo złożony skład matryc brzeczek fermentacyjnych, do oznaczenia poszczególnych składników, konieczne jest zastosowanie czułych i selektywnych technik analitycznych. W tym celu wykorzystywane są głównie techniki spektrofotometryczne oraz chromatograficzne, w tym chromatografia cieczowa (ang. *Liquid Chromatography*, LC) [6-10], elektroforeza kapilarna (ang. *Capillary Electrophoresis*, CE) [11, 12] oraz chromatografia gazowa (ang. *Gas Chromatography*, GC) [13]. Znaczna część inhibitorów fermentacji charakteryzuje się wysokim stopniem lotności, umożliwiającym zastosowanie techniki chromatografii gazowej w sprzężeniu z detektorem płomieniowo jonizacyjnym (ang. *Flame Ionization Detector*, FID) [13] lub spektrometrem mas (ang. *Mass Spectrometry*, MS) [13-15]. Niemniej, bezpośrednie dozowanie próbek brzeczek fermentacyjnych do układu chromatograficznego jest niezalecane, z uwagi na znaczną zawartość soli nieorganicznych, które mogą osadzać się wewnątrz kolumny, przyczyniając się tym samym do znacznego skrócenia jej żywotności. Dlatego, istotnym elementem każdej procedury jest dodatkowe zastosowanie techniki izolacji analitów. Wśród dostępnych rozwiązań można wyróżnić techniki ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz w tym klasyczną ekstrakcję ciecz-ciecz (ang. *Liquid-Liquid Microextraction*, LLE) [16], mikroekstrakcję do fazy ciekłej (ang. *Liquid Phase Microextraction*, LPME), dyspersyjną mikroekstrakcję w układzie ciecz-ciecz (ang. *Dispersive liquid-liquid microextraction*, DLME), a także ekstrakcję w układzie ciecz-ciało stałe tj. ekstrakcja do fazy stałej (ang. *Solid Phase Extraction*, SPE), mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (ang. *Solid Phase Microextraction*, SPME) [14, 16].

W pracy przedstawiono metodykę jakościowego i ilościowego oznaczania inhibitorów fermentacji (głównie kwasów organicznych, związków furanowych i fenolowych) w brzeczkach fermentacyjnych z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej w sprzężeniu ze spektrometrem mas (GC-MS) w trybie skanowania poszczególnych jonów (SIM) oraz w trybie skanowania całego zakresu jonów (SCAN). W ramach założonego celu dobrano korzystne parametry ekstrakcji ciecz-ciecz, oraz wykonano kalibracje dla poszczególnych analitów, które w kolejnym etapie posłużyły do zbadania zawartości inhibitorów fermentacji w próbkach rzeczywistych brzeczek fermentacyjnych.

## **2. Część eksperymentalna (Experimental part)**

### **2.1. Materiały (Materials)**

W badaniach wykorzystano odczynniki: dichlorometan (czystość  $\geq 99.9\%$ ) oraz aceton (czystość  $\geq 99.9\%$ ), z produkcji POCH (Polska). Wysokiej czystości wzorce (furfural, gwajakol, kwas lewulinowy, 5-hydroksymetylofurfural, syringol, kwas mrówkowy, kwas octowy, kwas propionowy, kwas 2-metylopropanowy, kwas butanowy, kwas 3-metylobutanowy, kwas 3-metylobutanowy, fenol, indol, 4-chlorofenol) z produkcji Sigma-Aldrich (USA).

### **2.2. Aparatura (Instruments)**

W badaniach zastosowano chromatograf gazowy ze spektrometrem mas QP2010 GC-MS SE (Shimadzu, Japonia), wyposażony w automatyczny podajnik próbek a combi-PAL AOC 5000 autosampler (Shimadzu, Japan) oraz kolumnę kapilarną Rxi-624Sil MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ) (Restek, USA).

### 2.3. Próbkki rzeczywiste brzeczek fermentacyjnych (*Real fermentation broth samples*)

Próbki poddane badaniu, zostały przygotowane w następujący sposób: materiał biomasy lignocelulozowej (kaczany kukurydzy) pocięto na zrębki za pomocą rozdrabniacza ogrodowego (Mec Tools). Następnie materiał poddano zmieleniu w młynie ZM 200 (Retsch) z wykorzystaniem sita o średnicy 0.75 mm. Masę lignocelulozową suszono przez 4 godziny w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 105°C, do stałej masy. W celu powolnego ochłodzenia, materiał umieszczono w eksykatorze zawierający 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  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  - doprowadzony do  $\text{pH} \pm 11.5$  za pomocą 0.5 M NaOH.
- II. Wodę dejonizowaną zmieszano z (30% v/v) roztworem  $\text{H}_2\text{O}_2$  otrzymany roztwór doprowadzony do  $\text{pH} \pm 11.5$  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 doprowadzony 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 – doprowadzony roztwór do  $\text{pH} \pm 3.0$  za pomocą 0.5% kwasu szczawowego.
- 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.

Procesy hydrolizy, w każdym z powyższych przypadków prowadzono przez 6 godzin w temperaturze 25°C, w wytrząsarce z łaźnią wodną. Następnie, próbki odwirowano w wirówce (Hettich-Zentrifugen, D-78533 Tuttlingen,) przez 10 min 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). Masę lignocelulozową z roztworem enzymów umieszczono w fiolkach wirówkowych, które wytrząsano w 42°C przez 24 godz. w wytrząsarce z łaźnią wodną. Enzym rozdzielono od powstałego hydrolizatu przez ogrzewanie fiolek wirówkowych w 60°C, następnie odwirowano (Hettich-Zentrifugen, 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 [17]. 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 min. Proces fermentacji ciemnej przebiegał w temperaturze 37°C oraz ciągłym mieszaniem z prędkością 320 RPM.

### 2.4. Metody postępowania (*Methods*)

#### 2.4.1. Przygotowanie próbki (ekstrakcja ciecz-ciecz) (*Sample preparation (liquid-liquid extraction)*)

W pierwszym etapie rozmrożono brzeczeki fermentacyjne, umieszczono w wirówce i przez 5 min przy prędkości 3000 obr/min wirowano w celu wstępnego usunięcia fazy stałej. Następnie fazę wodną przefiltrowano przez hydrofilowy-celulozowy filtr strzykawkowy (0,45  $\mu\text{m}$ ) i przeniesiono do fiołki 1 mL, do której dodano 20  $\mu\text{L}$  roztworu wzorca wewnętrznego 4-chlorofenolu w acetonie (50 mg/L). Następnie dodano 30  $\mu\text{L}$  kwasu mrówkowego w celu obniżenia pH próbki i dodano 300  $\mu\text{L}$  dichlorometanu (DCM). Próbkę wytrząsano energicznie w fiołce przez 1 minutę, a następnie poddano wirowaniu (3000 obr/min) przez 5 minut. Wytworzoną organiczną fazę ekstrakcyjną przenoszono w objętości 250  $\mu\text{L}$  za pomocą pipety automatycznej do fiolek o objętości 2 mL wyposażonych w mikrowkłady o objętości 300  $\mu\text{L}$ . Analizie chromatograficznej poddano 1  $\mu\text{L}$  ekstraktu.

#### 2.4.2. Warunki analizy chromatograficznej (Chromatographic conditions)

W badaniach zastosowano gaz nośny: wodór o objętościowym natężeniu przepływu 1 mL/min, temperaturę dozownika: 300°C, tryb split 10:1, temperaturę źródła jonów (EI, 70 eV) 200°C, temperaturę linii łączącej chromatograf gazowy z detektorem MS 310°C, program temperaturowy: 50°C (5 min) – narost 10°C/min - 260°C (10 min). Tryb SCAN w zakresie stosunku masy do ładunku 34 – 450  $m/z$  oraz SIM dla poszczególnych dobranych dla poszczególnych związków wartości  $m/z$ .

#### 2.4.3. Analiza ilościowa (Quantitative analysis)

Analizę ilościową wykonano w oparciu o metodę wzorca wewnętrznego. W tym celu przygotowano roztwór wyjściowy zawierający badane anality (w tym furfural, 5-hydroksymetylofurfural, kwas lewulinowy, syringol, gwajakol) w stężeniu około 1000 mg/L w 20 mL acetonu. Poprzez rozcieńczenia roztworu wyjściowego w wodzie demineralizowanej, przygotowano roztwory kalibracyjne poszczególnych składników w stężeniach 0,01; 0,05; 1; 0,5; 5; 10 i 50 mg/L. Dodatkowo, dla związków zidentyfikowanych w trybie SCAN, wykonano analizę ilościową, analogicznie do powyższej procedury. Zmieniono jedynie zakres badanych stężeń. Pierwotny roztwór w stężeniu 1000 mg/L w wodzie demineralizowanej, rozcieńczono do stężeń w 0,1; 1, 5, 10, 50, 250, 500 i 1000 mg/L. Roztwory kalibracyjne przeniesiono do fiolek w ilości 2 mL. Dalszą procedurę wykonano zgodnie z punktem 2.4.1.

#### 2.4.4. Wyznaczenie parametrów metodyki (Determination of method parameters)

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

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot S_a}{b} \quad (1)$$

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

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

$$\text{LOQ} = 3\text{LOD} \quad (2)$$

Względne odchylenie standardowe wyznaczono dla trzech powtórzeń ze wzoru (3):

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

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

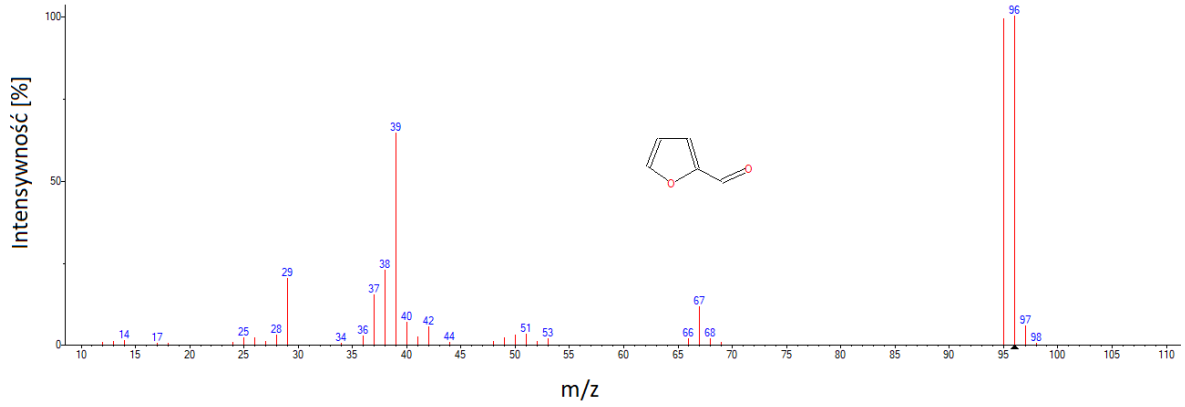
Zbadano liniowość w założonym do kalibracji zakresie stężeń. Liniowość odpowiedzi detektora MS w badanym zakresie dokonano na podstawie współczynnika regresji ( $r$ ), który dla zależności liniowej pola powierzchni piku od stężenia analitu powinien być równy lub nieistotnie różny od 1.

Dla każdej substancji wzorcowej, wybrano dwie charakterystyczne wartości stosunku masy do ładunku, dalej oznaczane jako  $m/z_{\text{int}}$  – wartość dla której dokonywano integracji piku oraz  $m/z_{\text{id}}$  – wartość stosowana w celu potwierdzenia identyfikacji na podstawie stosunku intensywności  $m/z_{\text{int}}$  i  $m/z_{\text{id}}$ . Na podstawie sygnału zliczanego tylko dla wybranych jonów, dla każdego związku, wykonywano integrację pików chromatograficznych. Uzyskiwane w ten sposób dane były porównywane dla badanych próbek przed procesem, w toku jak i po zakończeniu procesu fermentacji. Zestawienie wytypowanych wartości  $m/z$  wraz z wartościami czasu retencji zestawiono w tabeli 1. Na Rys. 1-6 przedstawiono widma badanych analitów.

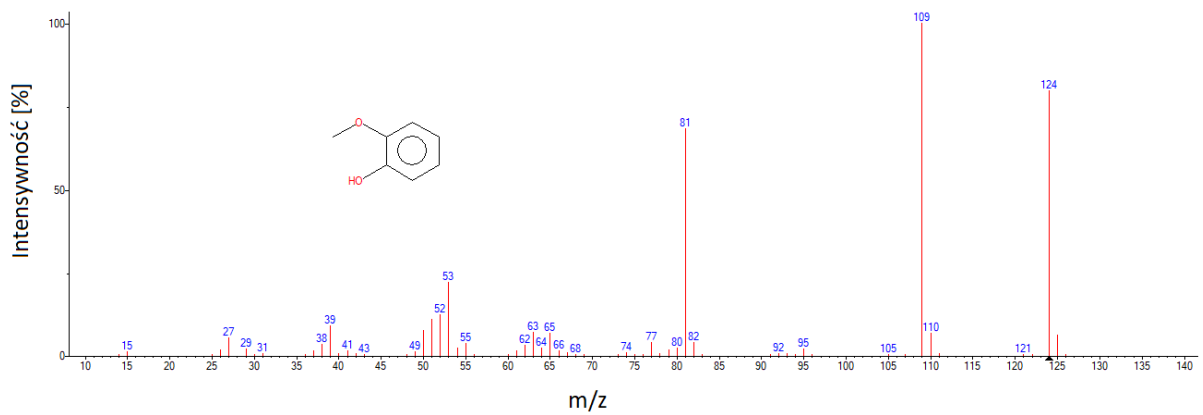
Tabela 1. Zestawienie charakterystycznych wartości  $m/z$  dla wytypowanych analitów oraz wartości czasu retencji.

Table 1. Compilation of characteristic  $m/z$  of selected analytes and retention times.

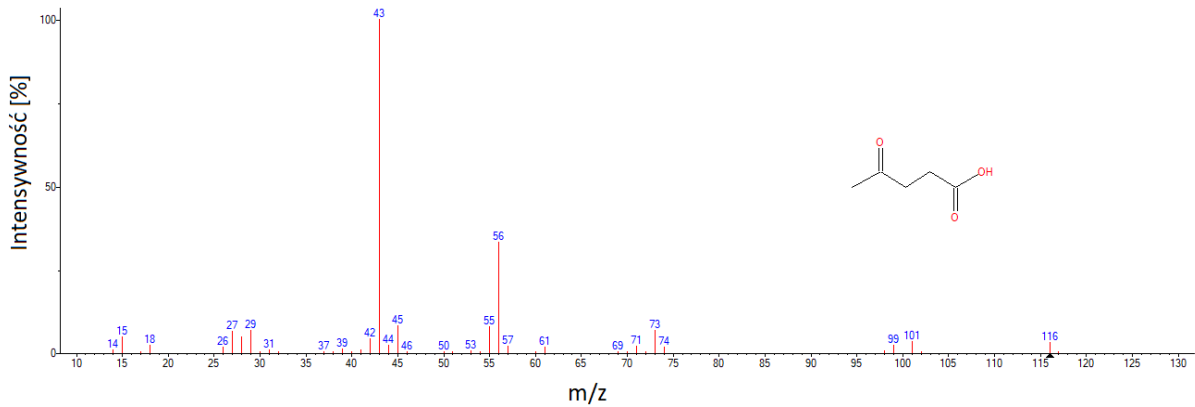
Związek(Compound)	$t_R$ [min]	$m/z_{\text{int}}$	$m/z_{\text{id}}$
furfural	14,94	95	96
gwajakol	20,09	109	124
Kwas lewulinowy	20,61	73	116
4-chlorofenol (IS)	22,82	128	130
5-hydroksymetylofurfural	23,24	97	126
syringol	24,31	154	139



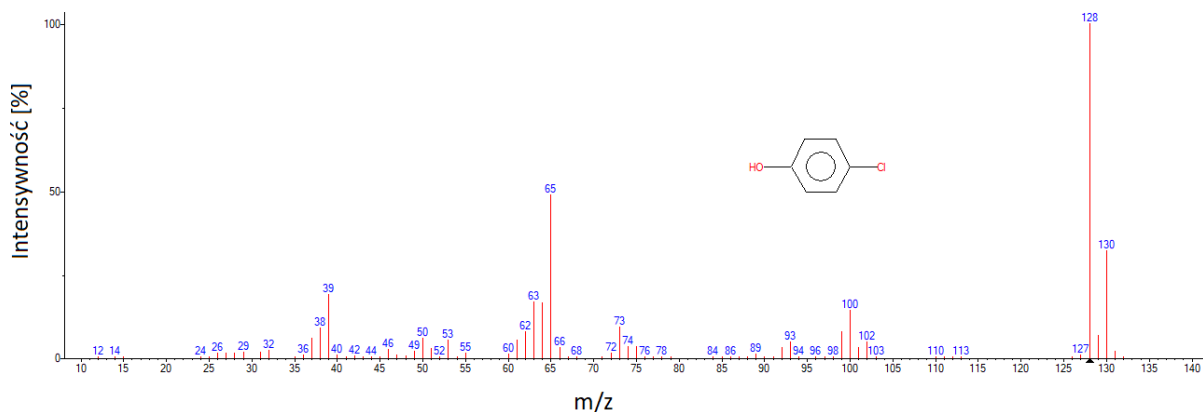
Rys. 1. Widmo masowe furfuralu.  
Fig. 1. Mass spectrum of the furfural.



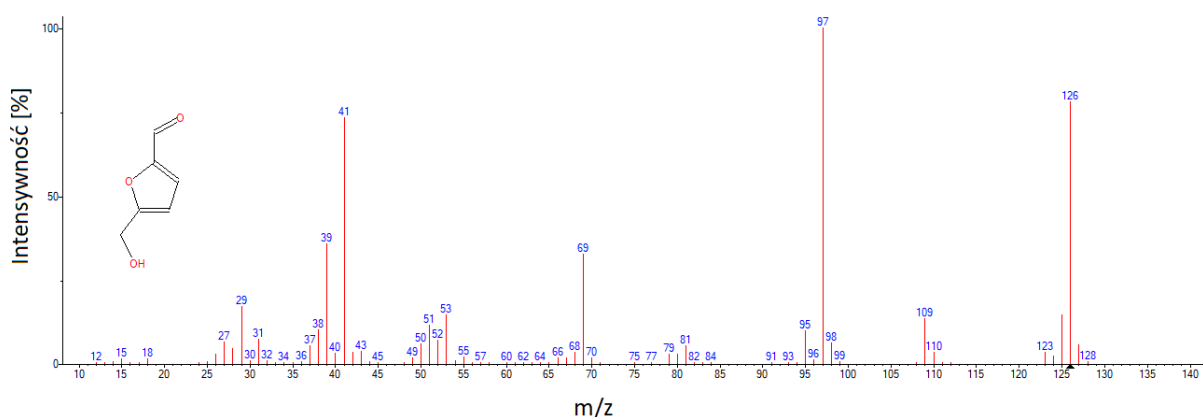
Rys. 2. Widmo masowe gwajakolu.  
Fig. 2. Mass spectrum of the guaiacol.



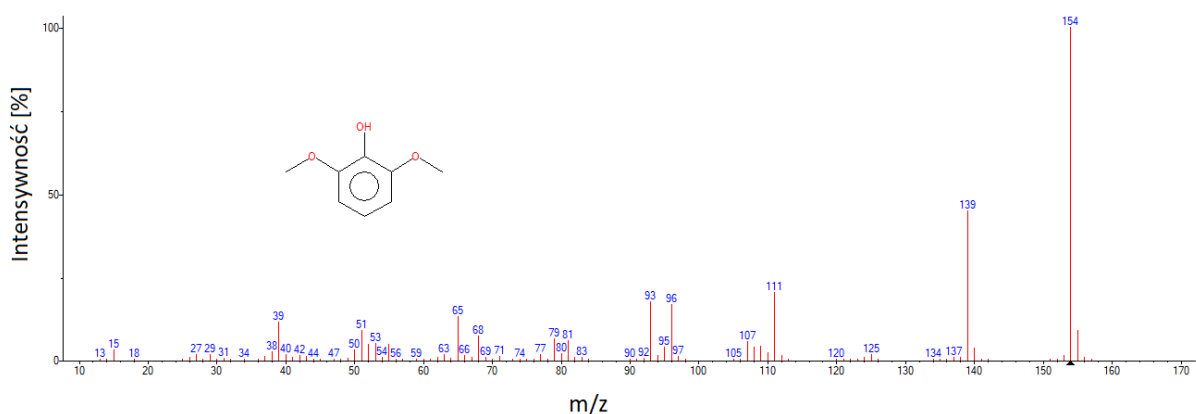
Rys. 3. Widmo masowe kwasu lewulinowego.  
Fig. 3. Mass spectrum of the levulinic acid.



Rys. 4. Widmo masowe 4-chlorofenolu.  
Fig. 4. Mass spectrum of the 4-chlorophenol.



Rys. 5. Widmo masowe 5-hydroksymetylofurfuralu.  
Fig. 5. Mass spectrum of the 5-hydroxymethylfurfural.



Rys. 6. Widmo masowe syringolu.  
Fig. 6. Mass spectrum of the syringol.

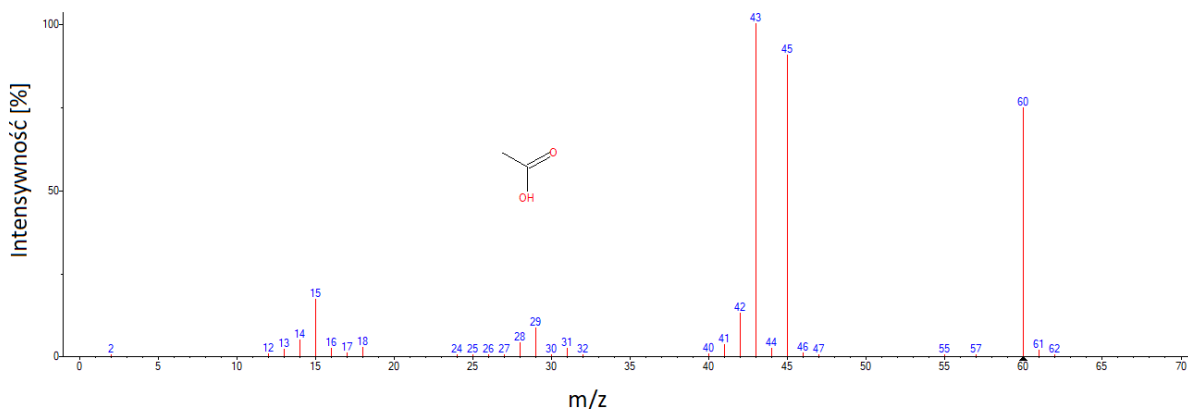
Identyfikacji pików pozostałych związków organicznych, dokonano poprzez porównanie widm poszczególnych związków z biblioteką NIST 14. Dla tych związków dokonano ilościowego oznaczenia w brzczechkach na podstawie wykonanych dodatkowych krzywych kalibracyjnych w trybie SCAN. Analogicznie do poprzedniej procedury, dla substancji wzorcowych wytypowano charakterystyczne wartości  $m/z$ , które wykorzystano do analizy jakościowej i ilościowej. Wytypowane wartości  $m/z$  zestawiono w Tabeli 2. Widma zidentyfikowanych związków przedstawiono na Rys. 7-14.



Tabela 2. Zestawienie charakterystycznych wartości  $m/z$  dla inhibitorów zidentyfikowanych w trybie SCAN wraz z wartościami czasu retencji.

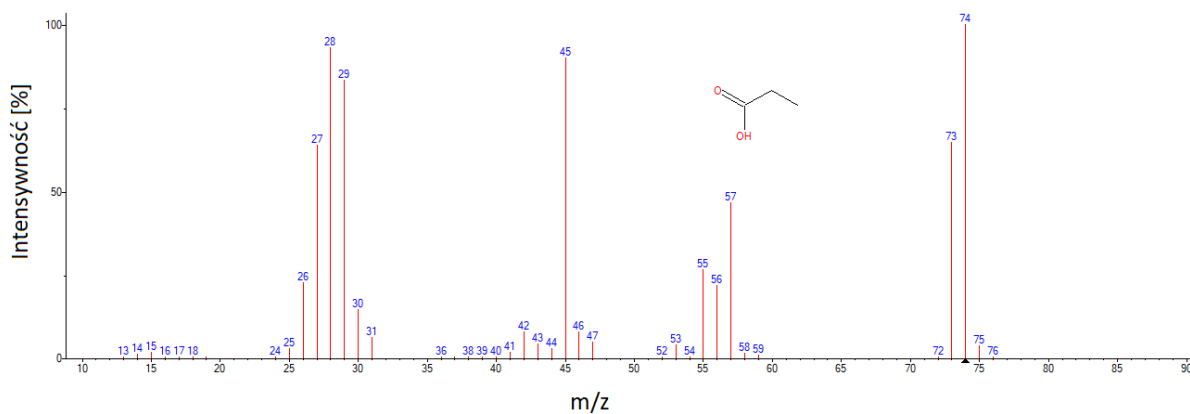
Table 2. Compilation of characteristic ions  $m/z$  of inhibitors identified in SCAN mode and retention times.

Związek(Compound)	$t_R$ [min]	$m/z_{int}$	$m/z_{id}$
Kwas octowy	9,63	60	56
kwas propionowy	12,17	74	73
kwas 2-metylopropanowy	13,50	73	88
kwas butanowy	14,26	60	74
kwas 3-metylobutanowy	15,36	60	87
kwas 2-metylobutanowy	15,55	74	87
fenol	18,87	94	66
indol	24,21	117	90



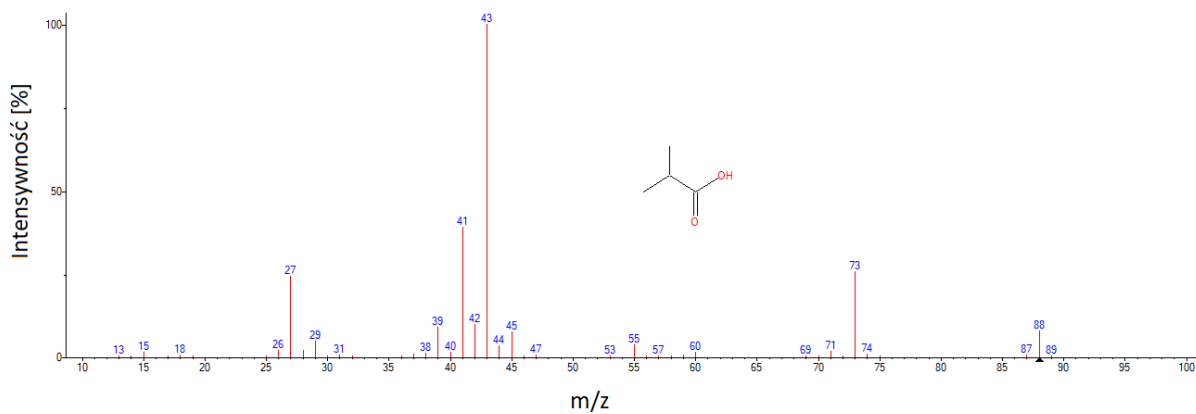
Rys. 7. Widmo masowe kwasu octowego.

Fig. 7. Mass spectrum of the acetic acid.

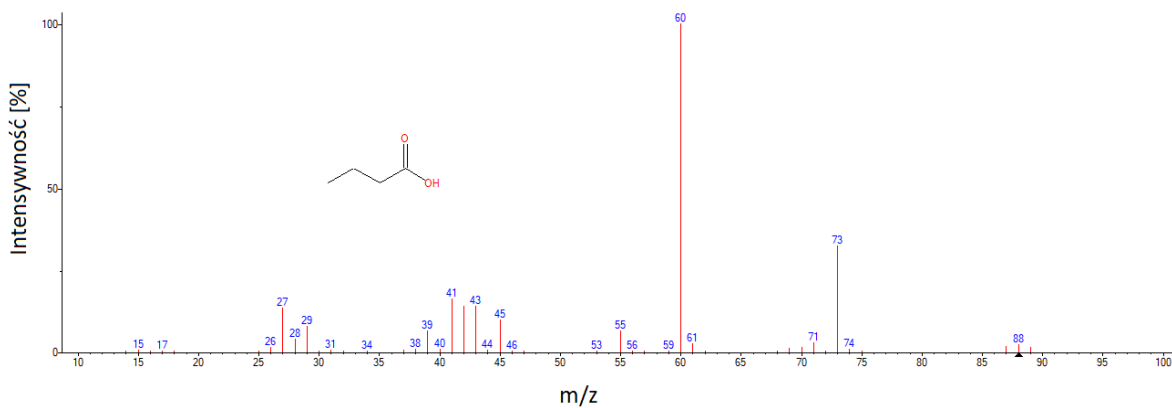


Rys. 8. Widmo masowe kwasu propionowego.

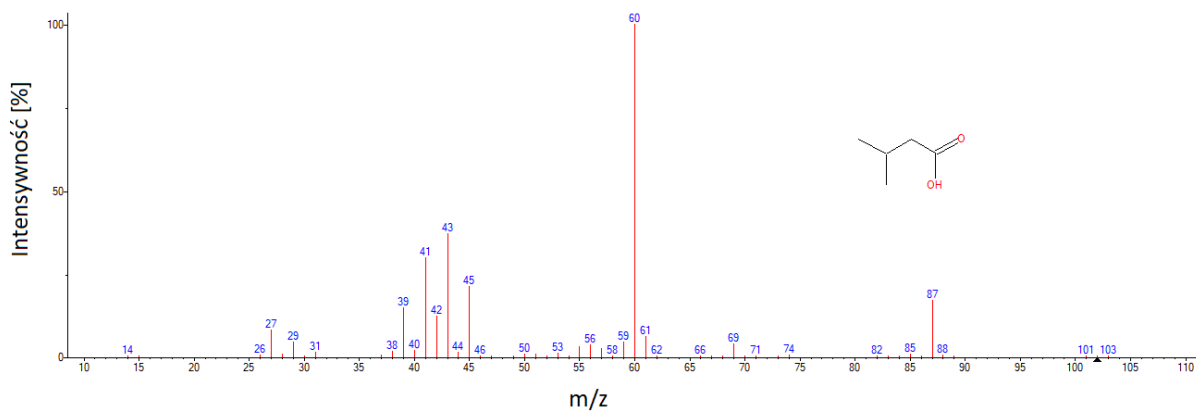
Fig. 8. Mass spectrum of the propionic acid.



Rys. 9. Widmo masowe kwasu 2-metylopropanowego.  
Fig. 9. Mass spectrum of the 2-methylpropanoic acid.

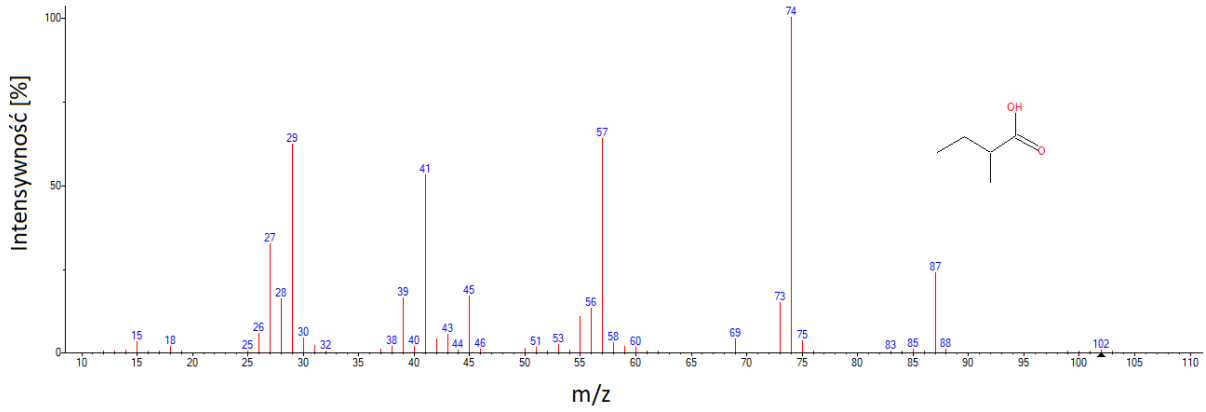


Rys. 10. Widmo masowe kwasu butanowego.  
Fig. 10. Mass spectrum of the butyric acid.

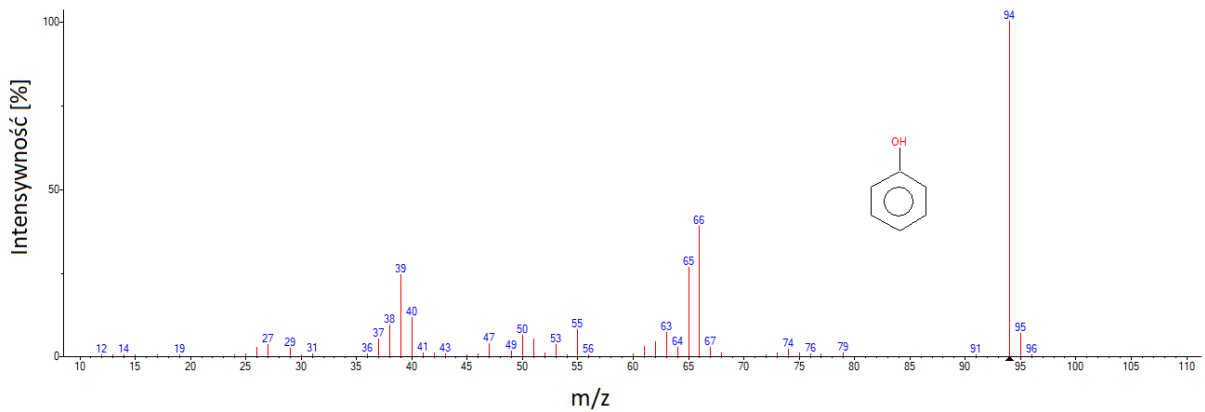


Rys. 11. Widmo masowe kwasu 3-metylobutanowego.  
Fig. 11. Mass spectrum of the 3-methylbutanoic acid.

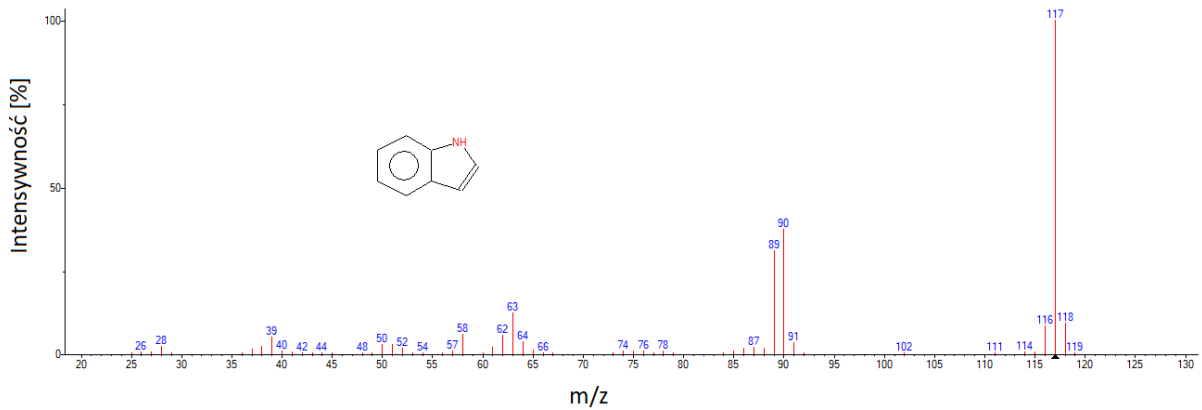




Rys. 12. Widmo masowe kwasu 2-metylobutanowego.  
Fig. 12. Mass spectrum of the 2-methylbutanoic acid.



Rys. 13. Widmo masowe fenolu.  
Fig. 13. Mass spectrum of the phenol.



Rys. 14. Widmo masowe indolu.  
Fig. 14. Mass spectrum of the indole.

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

#### 3.1. Optymalizacja warunków ekstrakcji (Optimization of extraction conditions)

Warunki prowadzenia ekstrakcji ciecz-ciecz poddano optymalizacji w zakresie doboru objętości rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, wpływu dodatku rozpuszczalnika dyspergującego, pH, a także czasu i prędkości wirowania. Efekt zmian poszczególnych parametrów oceniano na podstawie porównania wartości pól powierzchni pików dla wybranego zestawu substancji wzorcowych (furfural, gwajakol, kwas lewulinowy, 5-hydroksymetylofurfural, syringol). Uzyskane wyniki zestawiono na Rys. 15.

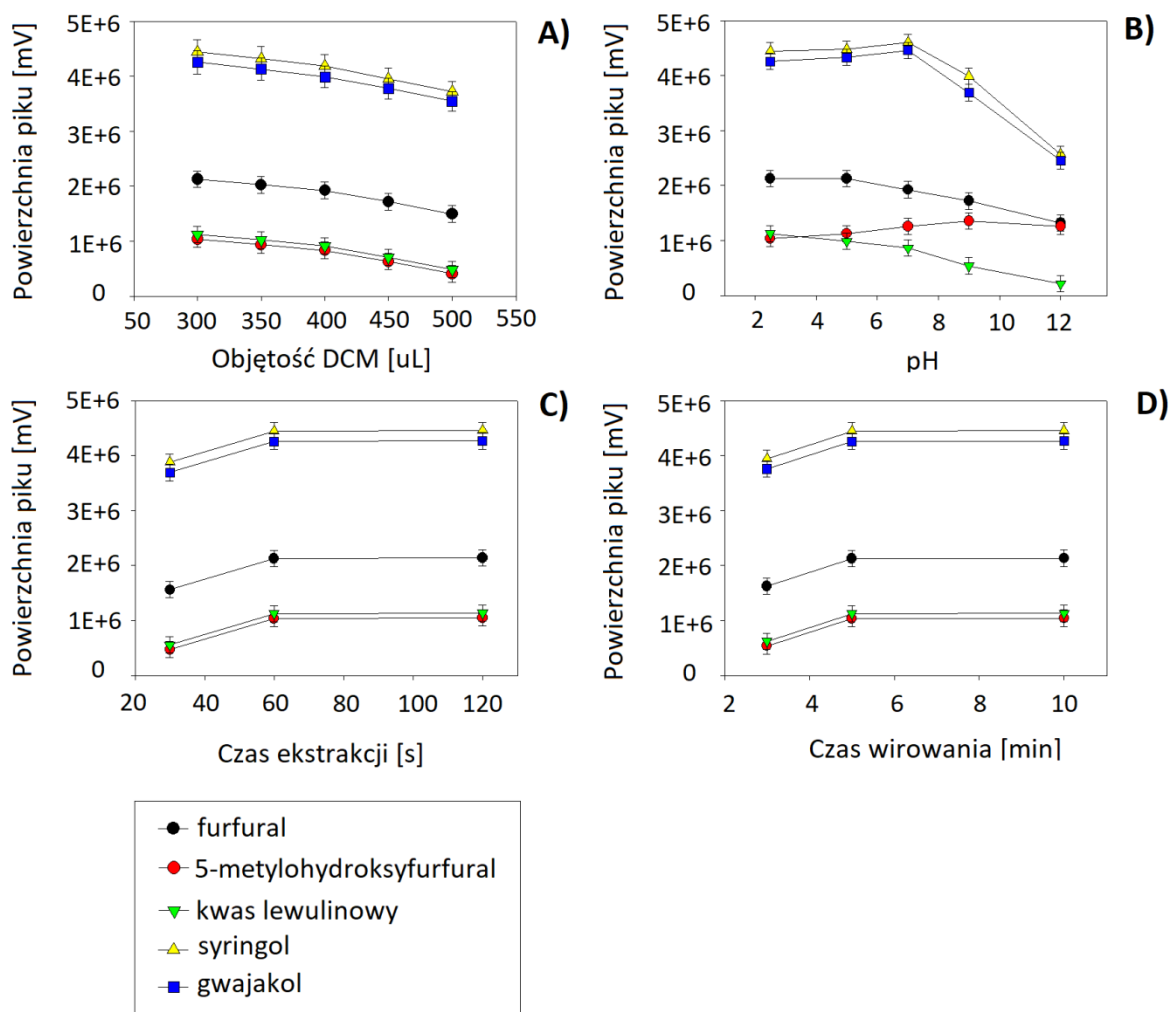
Objętość rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (DCM) testowano w zakresie od 300 do 500  $\mu\text{L}$  (Rys. 15A). Wzrost objętości DCM, w badanym przedziale skutkowało zmniejszeniem współczynników odpowiedzi analitów, co wynikało ze wzrostu objętości otrzymywanej fazy ekstrakcyjnej. Badana minimalna ilość rozpuszczalnika ekstrakcyjnego w objętości 300  $\mu\text{L}$ , została wybrana z uwagi na dalszą możliwość wykorzystania systemu automatycznego dozowania próbek, który zapewnia lepszą powtarzalność wyników, w porównaniu do tradycyjnego dozowania z użyciem strzykawki mikrolitrowej i zapewnia ciągłość analizy przez 24 godziny.

Jednym z istotniejszych parametrów mających wpływ na efektywność ekstrakcji jest pH, które powinno być niższe od  $\text{pK}_a$  wszystkich badanych analitów ( $\text{pK}_a$  w przedziale 3,2 – 12,8) o około 2 w celu cofnięcia dysocjacji. Dlatego zbadano wpływ pH odpowiednio dla wartości: 2, 5, 5, 7, 9 i 12 (Rys. 15B). Zgodnie z oczekiwaniami, można było zaobserwować stopniowy wzrost współczynników odpowiedzi dla syringolu oraz gwajakolu wraz ze wzrostem pH do wartości 7 i stopniowy ich spadek po dalszym zwiększaniu wartości pH. Z kolei dla związków o najniższych wartościach  $\text{pK}_a$  (furfural, kwas lewulinowy), maksimum wydajności ekstrakcji obserwuje się dla wartości pH 2,5. Natomiast, dla związku o najwyższym  $\text{pK}_a$  - 5-hydroksymetylofurfuralu, optymalną jest wartość 9. Na podstawie uzyskanych wyników, do dalszych badań wybrano wartość pH 2,5.

W kolejnym etapie badano wpływ czasu ekstrakcji oraz czasu odwirowania próbki (Rys. 15 C-D). Najwyższe wartości współczynników odpowiedzi względem wszystkich badanych analitów uzyskano odpowiednio po 60 sekundach ekstrakcji oraz 5 minutach wirowania. Natomiast dalsze wydłużanie czasu w obydwu przypadkach nie skutkowało poprawą efektywności ekstrakcji.

Dodatkowo, zbadano wpływ dodatku acetonu, którego obecność powinna przyczynić się do wzrostu stopnia zdyspergowania rozpuszczalnika ekstrahującego, a tym samym poprawić efektywność ekstrakcji. Niemniej, dodatek acetonu spowodował pogorszenie efektu wzbogacenia analitów. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest wzrost powinowactwa analitów do fazy wodnej próbki, a także wzrost otrzymanej objętości fazy organicznej.

Ostatecznie wybrano warunki: 300  $\mu\text{L}$  DCM jako rozpuszczalnik ekstrakcyjny przy objętości 1 mL próbki, brak dodatku acetonu, pH 2,5, czas ekstrakcji: 60 s i czas wirowania: 5 min przy prędkości 3000 obr/min.



Rys. 15. Wykres przedstawiający A) Wpływ objętości rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (DCM) na wydajność ekstrakcji, B) wpływ pH, C) wpływ czasu ekstrakcji oraz D) wpływ czasu wirowania na wydajność ekstrakcji.

### 3.2. Wyznaczenie podstawowych parametrów walidacyjnych metodyki (Determination of the validation parameters)

#### 3.2.1. Metodyka LLE-GC-MS (tryb SIM) (LLE-GC-MS method (SIM mode))

Do oznaczeń ilościowych wykorzystano metodę wzorca wewnętrznego. Zastosowano wzorec wewnętrzny w postaci 4-chlorofenolu, który wybrano na podstawie parametrów tj. temperatura wrzenia, prężność par oraz współczynnik podziału oktanol-woda. Poprzez porównanie powierzchni pików analitu i wzorca, wyeliminowano problem strat analitów związany z ich dużą lotnością, a także zapewniona została duża powtarzalność wyników. Dla każdego z analitów wykonano kalibrację w oparciu o pięć punktów kalibracyjnych, które posłużyły do oznaczania inhibitorów fermentacji w rzeczywistych próbkach brzeczki fermentacyjnych.

Opracowana metodyka charakteryzuje się niskimi wartościami granicy wykrywalności (LOD) w zakresie 0,0086 – 1,12 µg/mL oraz oznaczalności (LOQ), a także dobrą powtarzalnością (RSD poniżej 5,23%) oraz szerokim zakresem liniowości. Uzyskane wyniki wskazują, że metodyka nadaje się do rutynowych oznaczeń inhibitorów fermentacji.

Wyznaczone parametry walidacyjne metodyki zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Zestawienie uzyskanych wartości parametrów kalibracyjnych dla wzorcowych związków (tryb SIM).  
Table 3. Compilation of calibration parameters for standards (SIM mode).

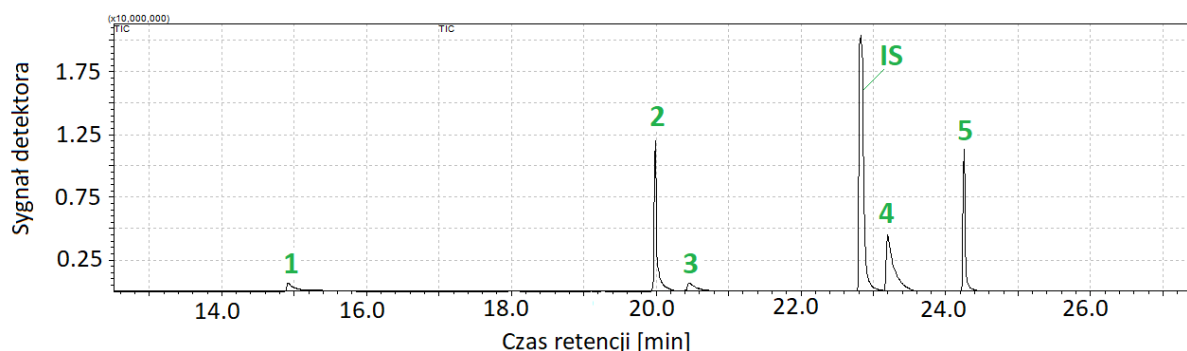
Związek (Compound)	a	b	R <sup>2</sup>	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]	RSD [%] <sup>1)</sup>	RSD [%] <sup>2)</sup>	RSD [%] <sup>3)</sup>	Zakres liniowości [mg/L] (Linear range)
furfural	0,2849	-0,058	0,9972	0,012	0,036	4,13	3,16	3,07	0,036 – 52,31
gwajakol	0,4049	-0,0951	0,9996	0,010	0,029	5,23	3,11	2,74	0,029 – 55,62
kwask lewulinowy	0,0079	-0,00058	0,9971	1,12	3,36	-	4,09	3,78	3,36 – 54,11
5-hydroksymetylofurfural	0,0183	-0,0003	0,9968	0,97	2,91	-	5,12	3,74	2,91 – 51,18
syringol	0,1982	-0,0619	0,9977	0,0086	0,026	3,84	2,98	2,22	0,026 – 52,97

1) Wartości obliczone dla stężenia 0,5 µg/mL

2) Wartości obliczone dla stężenia 5 µg/mL

3) Wartości obliczone dla stężenia 50 µg/mL

Na Rys.16 zamieszczono chromatogram mieszaniny wzorcowej w stężeniu 50 µg/mL.



Rys.16. Chromatogram wykonany dla mieszaniny wzorcowej. Zidentyfikowane związki: 1) furfural, 2) gwajakol, 3) kwas lewulinowy, 4) HMF, 5) syringol, IS) wzorzec wewnętrzny – 4-chlorofenol.

Fig. 16. Chromatogram of a standards mixture. Identified compounds: 1) furfural, 2) guaiacol, 3) levulinic acid, 4) 5-hydroxymethylfurfural, 5) syringol, IS) internal standard – 4-chlorophenol.

### 3.2.2. Metodyka LLE-GC-MS (tryb SCAN) (LLE-GC-MS method (SCAN mode))

W celu wyznaczenia dokładnych stężeń inhibitorów fermentacji zidentyfikowanych w trybie SCAN, wykonano dodatkowe kalibracje dla związków wzorcowych w przybliżeniu w zakresie 1-1000 mg/L dla kwasu octowego i propionowego oraz 0,1 – 250 mg/L dla pozostałych analitów z użyciem metody wzorca wewnętrznego. Analogicznie do procedury opartej o zastosowanie trybu SIM, powierzchnie pików wyznaczano na podstawie charakterystycznych wartości stosunku masy do ładunku  $m/z_{int}$  oraz wartości  $m/z_{id}$  stosowanej w celu potwierdzenia identyfikacji, które zestawiono w tabeli 2. Natomiast w tabeli 4 zestawiono podstawowe parametry kalibracyjne dla związków chemicznych zidentyfikowanych w trybie SCAN. Uzyskane wyniki wartości LOD, LOQ, RSD, a także zakresu liniowości wskazują na znaczną użyteczność opracowanej metodyki do oznaczenia ilościowego inhibitorów fermentacji (głównie kwasów organicznych) na wyższym poziomie stężeń.

Tabela 4. Zestawienie uzyskanych wartości parametrów kalibracyjnych dla wzorcowych związków (tryb SCAN).

Table 4. Compilation of calibration parameters for standards (SCAN mode).

Związek (Compound)	a	b	R <sup>2</sup>	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]	RSD [%] <sup>1)</sup>	RSD [%] <sup>2)</sup>	RSD [%] <sup>3)</sup>	Zakres liniowości [mg/L] (Linear range)
Kwas octowy	5,792	-0,024	0,9987	1,25	3,75	-	6,25	5,22	3,75–1035,1
kwas propionowy	267,5	-1,02	0,9988	0,42	1,26	-	6,04	5,01	1,26–601,8
kwas 2-metylopropanowy	449,5	-1,24	0,9984	0,091	0,273	6,12	5,86	3,24	0,273–220,3
kwas butanowy	549,5	-1,99	0,9992	0,062	0,186	6,26	5,98	3,38	0,186–211,3

kwask 3-metylobutanowy	622,8	-2,01	0,9981	0,044	0,132	6,18	5,88	3,22	0,132– 209,2
kwask 2-metylobutanowy	624,7	-2,07	0,9979	0,045	0,135	6,01	5,13	3,07	0,135– 228,7
fenol	764,2	-2,15	0,9999	0,0011	0,0033	4,37	4,11	4,08	0,0033– 50,9
indol	321,1	-1,18	0,9993	0,25	0,75	-	4,68	3,11	0,75– 129,4

1) Wartości obliczone dla stężenia 0,5 mg/L

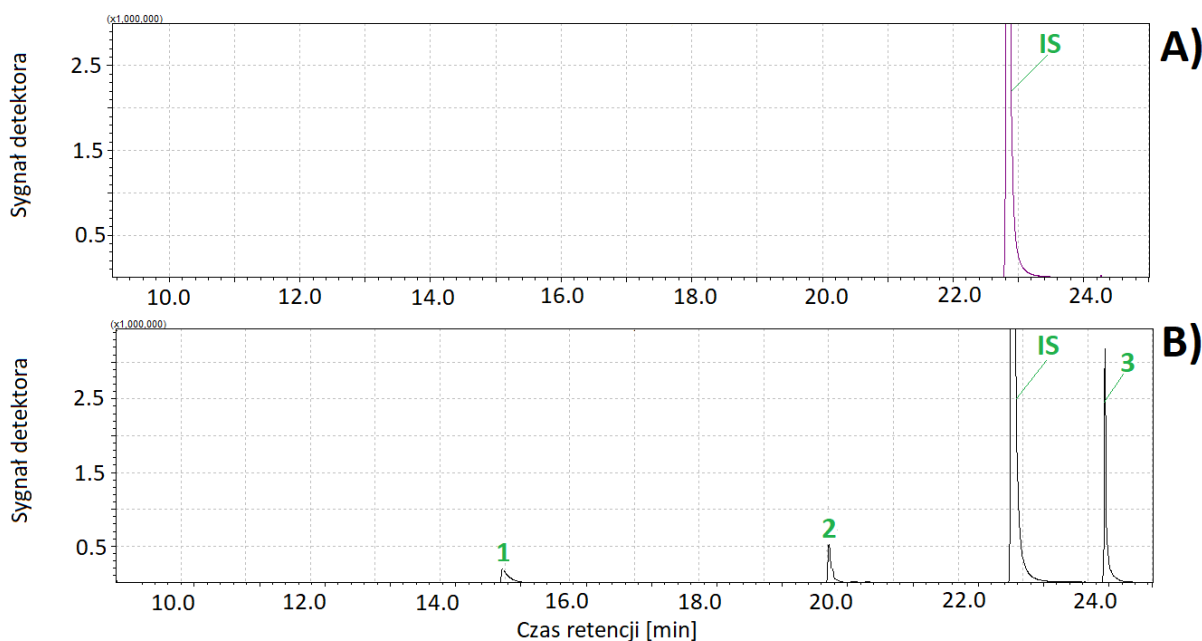
2) Wartości obliczone dla stężenia 5 mg/L

3) Wartości obliczone dla stężenia 50 mg/L

### 3.3. Badania próbek rzeczywistych brzeczek fermentacyjnych (Real fermentation broth samples analysis)

Opracowaną metodykę zastosowano do zbadania zawartości inhibitorów fermentacji w próbkach w toku prowadzonego procesu fermentacji (po 0, 16, 24, 48 oraz 116 godzinach). Związki zidentyfikowano na podstawie stosunku intensywności charakterystycznych jonów zawartych w Tabeli 1 i 2, przyjmując przedział ufności  $\pm 15\%$ , a także na podstawie wartości czasu retencji  $\pm 0,2$  min.

Z przebadanej grupy związków chemicznych w trybie SIM, w próbkach po zakończonym procesie fermentacji (po 116 godz.) zidentyfikowano trzy związki będące inhibitorami fermentacji, w tym gwajakol oraz syringol, a także występujący na najwyższym poziomie stężeniu furfural (od 0,15 do 2,45 mg/L). W próbkach przed rozpoczęciem procesu fermentacji nie stwierdzono obecności inhibitorów, które zaczęły pojawiać się w 16 godzinie prowadzenia procesów, a ich stężenia wzrastały wraz z wydłużaniem czasu fermentacji (Tabela 5-9). Najwyższe stężenia badanych inhibitorów stwierdzono w próbkach z procesu I-go i II-go (Tabela 6). Chromatogram próbki wykonany w trybie SIM przed rozpoczęciem oraz po 116 godzinach procesu II-go, przedstawiono na Rys.17.

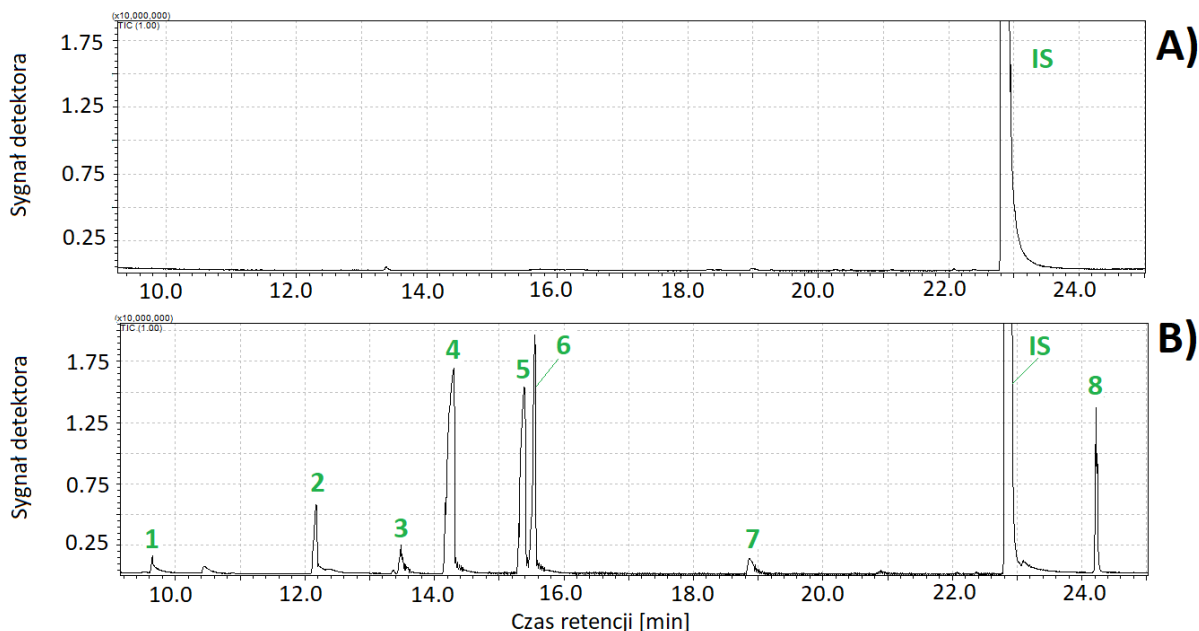


Rys.17. Chromatogramy próbek rzeczywistych brzeczek fermentacyjnych wykonane w trybie SIM wykonane dla procesu II po A) 0 h, B) 116 h prowadzenia procesu fermentacji. Zidentyfikowane związki chemiczne: 1) furfural, 2) gwajakol, 3) syringol.

Fig. 17. Chromatograms of a Real fermentation broth samples in SIM mode for II process after A) 0 h, B) 116 h of the fermentation process. Identified compounds: 1) furfural, 2) guaiacol, 3) syringol, IS) internal standard – 4-chlorophenol.

Dodatkowo, wykonano badania w trybie skanowania całego zakresu jonów w celu zidentyfikowania innych inhibitorów fermentacji, nie wchodzących w skład analitów badanych w trybie SIM. W próbkach brzeczek fermentacyjnych zidentyfikowano łącznie 8 innych związków organicznych w tym głównie kwasy organiczne (kwask octowy, propionowy, 2-metylopropanowy, butanowy, 3-metylobutanowy oraz 2-metylobutanowy) a także fenol i indol. Przykładowy chromatogram próbki brzeczeki przed procesem fermentacji oraz po 116 godzinach prowadzenia procesu przedstawiono na Rys.18. Uzyskane wyniki są zbieżne z tymi uzyskanymi w trybie SIM, które wskazują brak obecności inhibitorów fermentacji przed

rozpoczęciem procesu, a także występowanie kwasów organicznych oraz fenolu i indolu na najwyższym poziomie stężeń w próbkach poddanych procesowi nr II oraz w nieco niższych stężeniach w procesie nr I (Tabela 5-6). W obydwu przypadkach związki te zaczęły pojawiać się już w 16-stej godzinie trwania procesu i wzrastały w toku prowadzenia procesów. W próbkach końcowych we wszystkich procesach, na najwyższym poziomie stężeń występował kwas octowy którego stężenie mieściło się w zakresie od 323 do 956 mg/L, a także kwas butanowy (54,5 – 198,1 mg/L), kwas 3-metylobutanowy (74,0 – 137,7 mg/L) oraz kwas 2-metylobutanowy (58,8 – 139,2 mg/L) (Tabela 5-9).



Rys. 18. Chromatogramy próbek rzeczywistych wykonane w trybie SCAN wykonane dla procesu II po A) 0 h, B) 116 h prowadzenia procesu fermentacji. Zidentyfikowane związki chemiczne: 1) kwas octowy, 2) kwas propionowy, 3) kwas 2-metylopropanowy, 4) kwas butanowy, 5) kwas 3-metylobutanowy, 6) kwas 2-metylobutanowy, 7) fenol, 8) indol.

Fig. 18. Chromatograms of a Real fermentation broth samples in SCAN mode for II process after A) 0 h, B) 116 h of the fermentation process. Identified compounds: 1) acetic acid, 2) propionic acid, 3) 2-methylpropanoic acid, 4) butyric acid, 5) 3-methylbutanoic acid, 6) 2-methylbutanoic acid, 7) phenol, 8) indole, IS) internal standard – 4-chlorophenol.

Tabela 5. Stężenia zidentyfikowanych inhibitorów fermentacji w toku procesu I.

Table 5. Concentrations of identified fermentation inhibitors during the I process.

Związek (Compound)	Stężenie [mg/L] (Concentration [mg/L])				
	0 h	16 h	24 h	48 h	116 h
furfural	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,416 ± 0,021
gwajakol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,277 ± 0,014
kwas lewulinowy	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
HMF	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
syringol	<LOD	<LOD	0,0401 ± 0,0021	0,0510 ± 0,0034	0,0530 ± 0,0035
kwas octowy	<LOD	38,1 ± 1,7	350 ± 18	420 ± 21	778 ± 31
kwas propionowy	<LOD	17,27 ± 0,86	19,25 ± 0,96	74,1 ± 3,7	127,0 ± 6,4
kwas 2-metylopropanowy	<LOD	4,21 ± 0,21	5,25 ± 0,52	10,42 ± 0,52	19,74 ± 0,99
kwas butanowy	<LOD	20,2 ± 1,1	81,27 ± 5,5	109,3 ± 5,5	198,1 ± 9,9
kwas 3-metylobutanowy	<LOD	20,6 ± 1,0	80,26 ± 4,9	97,8 ± 4,9	137,7 ± 6,9
kwas 2-metylobutanowy	<LOD	16,80 ± 0,84	55,2 ± 2,8	66,8 ± 3,3	139,2 ± 7,0
fenol	<LOD	<LOD	4,65 ± 0,23	5,30 ± 0,26	23,4 ± 1,2
indol	<LOD	<LOD	15,69 ± 0,78	25,3 ± 1,3	62,9 ± 3,2
Sumaryczne stężenie inhibitorów	-	117,08	611,67	783,93	1424,78



Tabela 6. Stężenia zidentyfikowanych inhibitorów fermentacji w toku procesu II.  
Table 6. Concentrations of identified fermentation inhibitors during the II process.

Związek (Compound)	Stężenie [mg/L] (Concentration [mg/L])				
	0 h	16 h	24 h	48 h	116 h
furfural	<LOD	0,255 ± 0,013	2,02 ± 0,10	2,04 ± 0,10	2,45 ± 0,12
gwajakol	<LOD	0,0220± 0,0012	0,0290 ± 0,0012	0,0670 ± 0,0031	0,077±0,0041
kwask lewulinowy	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
HMF	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
syringol	<LOD	0,413 ± 0,021	0,416 ± 0,021	0,472 ± 0,024	0,501 ± 0,025
kwask octowy	<LOD	64,7 ± 3,5	337 ± 17	670 ± 33	956 ± 43
kwask propionowy	<LOD	9,70 ± 0,49	10,48 ± 0,58	11,58 ± 0,58	78,3 ± 3,9
kwask 2-metylopropanowy	<LOD	9,60 ± 0,48	11,34 ± 0,57	14,46 ± 0,72	19,70 ± 0,48
kwask butanowy	<LOD	29,4 ± 1,5	52,9 ± 2,6	88,9 ± 4,4	125,4 ± 6,3
kwask 3-metylobutanowy	<LOD	40,1 ± 4,0	88,7 ± 4,4	101,6 ± 5,1	108,3 ± 3,9
kwask 2-metylobutanowy	<LOD	32,2 ± 3,6	68,7 ± 3,4	88,8 ± 4,4	109,4 ± 3,2
fenol	<LOD	<LOD	<LOD	13,34 ± 0,67	20,3 ± 3,2
indol	<LOD	21,7 ± 4,6	103,5 ± 5,2	109,3 ± 5,4	127,35 ± 4,52
Sumaryczne stężenie inhibitorów	-	116,53	675,09	1100,56	1547,78

Tabela 7. Stężenia zidentyfikowanych inhibitorów fermentacji w toku procesu III.  
Table 7. Concentrations of identified fermentation inhibitors during the III process.

Związek (Compound)	Stężenie [mg/L] (Concentration [mg/L])				
	0 h	16 h	24 h	48 h	116 h
furfural	<LOD	<LOD	<LOD	0,1880 ± 0,0012	0,1910 ±0,0015
gwajakol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kwask lewulinowy	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
HMF	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
syringol	<LOD	0,0441± 0,0091	0,0972 ± 0,0011	0,1521 ± 0,0012	0,2003± 0,0021
kwask octowy	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	465 ± 23
kwask propionowy	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	10,18 ± 0,51
kwask 2-metylopropanowy	<LOD	<LOD	<LOD	5,37 ± 0,27	15,37 ± 0,77
kwask butanowy	<LOD	<LOD	<LOD	17,01 ± 0,85	97,31 ± 4,9
kwask 3-metylobutanowy	<LOD	<LOD	<LOD	77,4 ± 3,9	105,07 ± 5,2
kwask 2-metylobutanowy	<LOD	<LOD	<LOD	86,5 ± 4,3	137,05 ± 6,9
fenol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	21,25 ± 1,1
indol	<LOD	<LOD	<LOD	69,2 ± 3,5	50,03 ± 2,5
Sumaryczne stężenie inhibitorów	-	0,044	0,097	186,29	851,35

Tabela 8. Stężenia zidentyfikowanych inhibitorów fermentacji w toku procesu IV.  
Table 8. Concentrations of identified fermentation inhibitors during the IV process.

Związek (Compound)	Stężenie [mg/L] (Concentration [mg/L])				
	0 h	16 h	24 h	48 h	116 h
furfural	<LOD	<LOD	0,187 ± 0,011	0,213 ± 0,014	0,266 ± 0,016
gwajakol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
kwask lewulinowy	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
HMF	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
syringol	<LOD	<LOD	0,068 ± 0,068	0,092 ± 0,078	0,1312 ± 0,091
kwask octowy	<LOD	112,1 ± 4,2	251 ± 13	355 ± 13	655 ± 23
kwask propionowy	<LOD	<LOD	3,09 ± 0,15	6,86 ± 0,34	13,61 ± 0,68
kwask 2-metylopropanowy	<LOD	4,97 ± 0,35	7,37 ± 0,37	7,44 ± 0,37	10,60 ± 0,53
kwask butanowy	<LOD	5,19 ± 0,19	41,2 ± 2,1	49,9 ± 2,5	123,8 ± 5,2
kwask 3-metylobutanowy	<LOD	6,98 ± 0,24	65,9 ± 3,3	71,1 ± 3,6	115,6 ± 4,3
kwask 2-metylobutanowy	<LOD	7,29 ± 0,12	71,6 ± 3,6	72,4 ± 3,6	112,7 ± 4,6
fenol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3,98 ± 0,20
indol	<LOD	16,29 ± 0,78	51,5 ± 2,6	62,8 ± 3,1	68,4 ± 3,4
Sumaryczne stężenie inhibitorów	-	152,82	447,36	561,98	965,60



Tabela 9. Stężenia zidentyfikowanych inhibitorów fermentacji w toku procesu V.  
 Table 9. Concentrations of identified fermentation inhibitors during the V process.

Związek (Compound)	Stężenie [mg/L](Concentration [mg/L])				
	0 h	16 h	24 h	48 h	116 h
Furfural	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,152 ± 0,019
Gwajakol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kwas lewulinowy	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
HMF	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
syringol	<LOD	<LOD	<LOD	0,0311 ± 0,0067	0,0502± 0,0087
Kwas octowy	<LOD	<LOD	<LOD	43,59 ± 2,2	323,92 ± 16
kwas propionowy	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2,86 ± 0,14
kwas 2-metylopropanowy	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3,70 ± 0,18
kwas butanowy	<LOD	<LOD	<LOD	6,32 ± 0,32	54,52 ± 2,7
kwas 3-metylobutanowy	<LOD	<LOD	22,65 ± 0,26	28,86 ± 1,4	74,01 ± 3,7
kwas 2-metylobutanowy	<LOD	<LOD	15,62 ± 0,19	18,08 ± 0,90	58,83 ± 2,9
fenol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	10,21 ± 0,51
indol	<LOD	<LOD	13,75 ± 0,54	18,42 ± 0,92	48,76 ± 2,4
Sumaryczne stężenie inhibitorów	-	-	40,73	95,70	528,23

#### 4. Podsumowanie (Summary)

W pracy przedstawiono metodykę oznaczania inhibitorów fermentacji, w tym głównie kwasów organicznych oraz związków furanowych i fenolowych w brzeczkach fermentacyjnych z wykorzystaniem ekstrakcji ciecz-ciecz w połączeniu z chromatografią gazową w sprzężeniu ze spektrometrem mas, w trybie SIM oraz SCAN. W celu oznaczenia związków fenolowych oraz furanowych, występujących na znacznie niższym poziomie stężeń w porównaniu do kwasów organicznych, dla wytypowanej grupy związków na podstawie studium literaturowego (w tym dla furfuralu, 5-hydroksymetylofurfuralu, syringolu, gwajakolu, kwasu lewulinowego) dobrano najkorzystniejsze warunki ekstrakcji ciecz-ciecz. Z uwagi na dość duże różnice w strukturze badanych analitów, dobór niektórych parametrów tj. pH był swego rodzaju kompromisem w którym kierowano się wyborem korzystniejszych parametrów dla związków chemicznych nie posiadających w widmach mas charakterystycznych wartości  $m/z$ , które warunkują wysokie współczynniki odpowiedzi, a jednocześnie wpływają na wartości granicy wykrywalności i oznaczalności. Ostatecznie stosowano 300  $\mu$ L rozpuszczalnika ekstrakcyjnego przy stałej objętości próbki (1 mL), brak dodatku rozpuszczalnika dyspergującego (acetonu), pH 2,5, czas ekstrakcji 60 sekund oraz czas wirowania 5 minut przy prędkości 3000 obr/min.

Podstawowe parametry kalibracyjne (w tym LOD, LOQ, RSD,  $R^2$  oraz zakresy liniowości) uzyskane dla wybranej grupy inhibitorów fermentacji, wykazują użyteczność i możliwość stosowania metodyki w rutynowych badaniach procesów fermentacji. Ze względu na koszt aparatury detekcja płomieniowo-jonizacyjna (GC-FID) byłaby korzystniejszym rozwiązaniem.

Zastosowana w badaniach fermentacji ciemnej, biomasa lignocelulozowa składa się ze zmiennych ilości hemicelulozy, celulozy i ligniny, które są zamknięte w złożonej strukturze i nie są dostępne dla mikroorganizmów warunkujących tworzenie wodoru w procesie fermentacji ciemnej. W celu umożliwienia kontaktu drobnoustrojów, biomasę lignocelulozową poddaje się różnym technikom obróbki wstępnej. Jednak, podczas obróbki wstępnej uwalniane jest szerokie spektrum toksycznych związków organicznych, które znacząco spowalniają proces wytwarzania wodoru w procesie ciemnej fermentacji. Tworzą się m.in. kwasy organiczne, które są naturalnym metabolitem mikroorganizmów, natomiast w efekcie przemian wtórnych glukozy, mogą powstawać: kwas lewulinowy, furfural i 5-hydroksymetylofurfural, natomiast z ligniny mogą tworzyć się związki fenolowe. Badania próbek rzeczywistych wykazały, że najwięcej inhibitorów fermentacji tworzy się w procesie I i II, czyli w procesach w których zastosowano w pierwszym etapie hydrolizę zasadową z użyciem odpowiednio katalizatora w postaci wodnego roztworu  $H_2O_2$  (30% v/v) oraz katalizatora nasyconego roztworu  $Ca(OH)_2$  w pH 11,5. Niższe stężenia wykryto w próbkach poddanych hydrolizie z wykorzystaniem połączenia obydwu katalizatorów w zasadowym środowisku. Natomiast, najniższe stężenia inhibitorów oznaczono w procesie V, w którym zastosowano odczynnik Fentona oraz 2.2'-bipirydynę. Wykryte w próbkach rzeczywistych kwasy organiczne mogą przenikać przez błony komórkowe i zmniejszać wewnątrz komórkowe pH, natomiast związki furanowe i fenolowe mogą hamować proces fermentacji przez błony komórkowe, które zakłócają działanie różnych enzymów. Pochodne furanu (furfural, 5-hydroksymetylofurfural) mają bardziej negatywny wpływ na ciemną fermentację w porównaniu ze związkami fenolowymi.

## 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. M. Suchowska-Kisielewicz, Produkcja biowodoru z odpadów w warunkach fermentacji. *Environ. Prot. Eng.* 34 (2014) 55-64.
2. J. Mathews, G. Wang, Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *Int. J. Hydrog. Energy* 34 (2009) 7404-7416.
3. L.J. Jönsson, C. Martín, Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* 199 (2016) 103-112.
4. K. Kucharska, P. Rybarczyk, I. Hołowacz, R. Łukajtis, M. Glinka, M.A. Kamiński. Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes, *Molecules* 23 (2018) 1-32.
5. N.A. Mostafa, Production and recovery of volatile fatty acids from fermentation broth. *Energy Convers. Manag.* 40 (1999) 1543-1553.
6. S.-F. Chen, R.A. Mowery, V.A. Castleberry, G.P.V. Walsum, C.K. Chambliss, High performance liquid chromatography method for simultaneous determination of aliphatic acid, aromatic acid and neutral degradation products in biomass pretreatment hydrolysates. *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 54-61.
7. S.M. Davies, R.S. Linforth, S.J. Wilkinson, K.A. Smart, D.J. Cook, Rapid analysis of formic acid, acetic acid, and furfural in pretreated wheat straw hydrolysates and ethanol in a bioethanol fermentation using atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Biotechnol. Biofuels* 4 (2011) 28-36.
8. S. Schiesel, M. Lämmerhofer, W. Lindner, Multitarget quantitative metabolic profiling of hydrophilic metabolites in fermentation broths of  $\beta$ -lactam antibiotics production by HILIC-ESI-MS/MS. *Anal. Bioanal Chem.* 396 (2010) 1655-1679.
9. Y. Guo, S. Srinivasan, S. Gaiki, Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interaction chromatography using a design of experiment. *Chromatographia* 66 (2007) 223-229.
10. C.J. Scarlata, D.A. Hyman, Development and validation of a fast high pressure liquid chromatography method for the analysis of lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation products. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2082-2087.
11. T. Soga, M. Imaizumi, Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, amino acids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds. *Electrophoresis* 16 (2001) 3418-3425.
12. M.A. Adams, Z.L. Chen, P. Landman, T.D. Colmer, Simultaneous determination by capillary gas chromatography of organic acids, sugars, and sugar alcohols in plant tissue extracts as their trimethylsilyl derivatives. *Anal. Biochem.* 266 (1999) 77-84.
13. K. Chattopadhyay, A.K. Tiwari, D. Singh, A. Chopra, M.B. Patel, B. Basu, A systematic analytical study on lignocelluloses originated inhibitors in hydrolyzed biomass. *Cellulose Chem. Technol.* 49 (2015) 81-85.
14. E.M.S.M. Gaspar, J.F. Lopes, Simple gas chromatographic method for furfural analysis. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2762-2767.
15. E. Teixidó, F.J. Santos, L. Puignou, M.T. Galceran, Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1135 (2006) 85-90.
16. L. Senila, M. Miclean, M. Senila, M. Roman, C. Roman, New analysis method of furfural obtained from wood applying an autohydrolysis pretreatment. *Rom. Biotech. Lett.* 18 (2013) 7947-7955.
17. 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* 38 (2013) 11765-11773.