



2013
Országos
Tudományos
Diákköri
Konferencia



Termikusan előkezelt anaerob mikrobakonzorcium alkalmazása biohidrogén előállítására

Készítette: Lankó Jácinta

Témavezetők: Bakonyi Péter

Dr. Nemestóthy Nándor

Pannon Egyetem
Mérnöki Kar
Biomérnöki BSc.
Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet
2012

Absztrakt

Kutatómunkám során biohidrogén előállítási kísérleteket végeztem, melyhez beoltó kultúraként a Pálhalmi Agrospeciál Mezőgazdasági Termelő, Értékesítő és Szolgáltató Kft. anaerob rothasztójából származó iszapot, szubsztrátként (szénforrásként) keményítőt, kiegészítő nitrogén- és nyomelem forrásként pedig élesztőkivonatot alkalmaztam.

Elvégzett méréseim elsődleges célja volt a biogáz fermentorból származó iszap megfelelő előkezelése, mellyel elérhető a nem kívánatos, hidrogénfogyasztó metanogén baktériumtörzsek eliminálása a számomra hasznos hidrogéntermelő mikroorganizmusok mellől. Ennek megvalósítására termikus előkezelési eljárást választottam és vizsgáltam a módszer két fő paraméterének (kezelési idő és hőmérséklet) hatását a hidrogénképződési hatékonyságra vonatkozóan, kísérlettervezéses alapon. Az eredmények alapján megállapítottam, hogy a változók közül a kezelési hőmérséklet rendelkezik szignifikáns hatással és meghatároztam az előkezelés optimális paramétereit (70°C, 20 perc), mellyel egységnyi szubsztrátra vonatkozóan a hidrogénhozam maximalizálható.

Ezt követően kísérleteket végeztem a hidrogéntermelés hatékonyságának növelése céljából az optimális körülmények között előkezelt mikrobakonzorcium alkalmazásával, melyben a keményítő- és élesztőkivonat koncentrációnak a biohidrogén képződésre kifejtett hatását tanulmányoztam. A kapott adatok kiértékelésével megállapítottam, hogy a vizsgált faktorok külön-külön, s azok kölcsönhatása is statisztikailag jelentős hatást fejt ki a hidrogén fermentációra, így ezek optimalizálásán keresztül nagymértékű növekedést lehet elérni az elérhető hidrogénhozamok tekintetében.

Summary

In this diploma work biohydrogen fermentations were carried out by anaerobic sludge as seed source collected from a domestic biogas plant. During the experiments starch and yeast extract was used as substrate and supplementary nitrogen/trace element source, respectively.

Firstly, the proper sludge pretreatment conditions were sought employing heat-shock and experimental design in order to simultaneously achieve sufficient suppression of methanogenic activity and efficient biohydrogen generation. Based on the results, temperature was identified as the statistically important variable significantly affecting the obtainable hydrogen formation. Moreover, the optimal pretreatment circumstances resulting in peak hydrogen yield were determined as 70 °C and 20 minutes.

Afterwards, measurements were performed in order to improve process efficiency during which the effect of the starch- and yeast extract concentration on the biohydrogen formation was studied applying the optimally pretreated microbial consortia. As the results it was revealed that these factors had remarkable impact on the attainable hydrogen yield. Therefore, it was concluded that further enhancement in hydrogen yields could be ensured through the optimization of these two parameters.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	2
2.1. A hidrogén előállítási lehetőségei biológiai úton	2
2.2.1 Direkt biofotolízis	2
2.2.2 Indirekt biofotolízis	3
2.2.3 Fotofermentáció	4
2.3. Sötét fermentáció	5
2.4. A sötét fermentációs hidrogéntermelést befolyásoló főbb tényezők.....	8
2.4.1 Hidrogéntermelő mikroorganizmusok, az inokulum összetétele	8
2.4.2 Hőmérséklet és pH	9
2.4.3 Szubsztrátok	9
2.4.4 Nitrogén és Foszfor	10
2.4.5 Nyomelemek	11
2.5. Az inokulum előkezelése.....	11
2.6. Kísérlettervezés	12
3. Célkitűzések	13
4. Anyagok és módszerek.....	14
4.1 Beoltó iszap	14
4.2 Fermentációs kísérletek	14
4.3 Manometrikus gázmérő készülék	16
4.4 Gázanalitika	16
5. Eredmények és értékelésük	19
5.1 A termikus előkezelés hatásának vizsgálata a hidrogénhozamra	19
5.2 A termikus előkezelés optimumának validálása.....	27
5.3 A hidrogénhozam növelési lehetőségének vizsgálata a keményítő- és élesztőkivonat koncentráció változtatásával.....	30
6. Összefoglalás	35
7. Irodalomjegyzék	36
8. Mellékletek	39

1. Bevezetés

A jelen kor egyik kiemelkedő környezeti-, energetikai-, valamint politikai problémája a fosszilis energiaforrások felhasználását érinti. Környezeti probléma, mert kitermelésük melléktermékei (pl. zagytározók, meddőhányók stb.) erősen szennyezők, valamint a kinyeréssel járó munkafolyamatok, emberi beavatkozások károsítják és megbontják az ökoszisztémát és az ökológiai egyensúlyt, s ezen felül felhasználásuk során nagy mennyiségű környezetre és egészségre káros anyagok (üvegházgázok, savas esők prekursorai, stb.) keletkeznek. Energetikai probléma, mert a fokozatos kitermelés csökkentette a rendelkezésre álló tartalékokat, valamint a további feldolgozási folyamatok is jelentős energia befektetést igényelnek. Politikai probléma, mert bizonyos fosszilis energiahordozókért még napjainkban is jelentős birtoklási harcok folynak.

Ezen nem megújuló források az 1960-1970-es évekig teljesen monopol helyzetben voltak a világ energiapiacán. Az emberiség fokozatosan fejlődő környezettudatos életszemlélete következtében azonban az 1970-es években megindultak bizonyos kezdeményezések, melyek a környezetbarát energiaforrások használatát célozták meg. [Manish, 2008; Das, 2001]. Az 1973-ban lévő energiaválság pedig ráébresztette a világot, hogy új megoldásokat kell keresni, s az emberiség nyitnia kellett a megújuló, alternatív energiahordozók irányába, melyek fontos ismérvei, hogy olyan közegek, természeti jelenségek, melyek kvázi folyamatosan vagy rövid időn belül újratermelődve az emberiség szolgálatára állnak. A teljesség igénye nélkül ezek közé tartozik a szélenergia, a geotermikus energia, a napenergia, valamint a biomasszából előállítható folyékony vagy gáznemű bioüzemanyagok (pl. bioetanol, biodízel, biogáz illetve a biohidrogén).

Napjaink egyik jelentős kutatási területét képviseli a biogáz(ok) előállítása és felhasználása, ezen belül is a biohidrogén előállítása.

Maga a hidrogén sok szempontból megfelelő energiahordozónak tekinthető, hiszen használatával nincs szennyező anyag kibocsátás, amennyiben alacsony hőmérsékleten, nagy hatásfokú (akár 60%) üzemanyag cellákban történik az oxidációja, melynek terméke kizárólag víz. További pozitív tulajdonsága, hogy ezen üzemanyagcellákkal működtetett gépjárművek nem jelentenek zajterhelést a környezet számára, mivel az üzemanyagcellák mozgó alkatrészt nem tartalmaznak. Ezen előnyös tulajdonságok miatt a hidrogén alapú gazdaság megteremtésére az 1970-es évektől egyre jelentősebb erőfeszítések történtek s zajlanak ma is.

Fontos szempont azonban, hogy ehhez olyan forrást válasszunk, mely nagymennyiségben rendelkezésünkre áll, valamint megújulónak tekinthető. Erre vonzó lehetőségnek kínálkoznak a biomasszából történő előállítási módszerek, köztük is a biológiai alapon nyugvó eljárások. A következőkben az ide sorolható, vagyis biohidrogén termelési lehetőségek kerülnek bemutatásra.

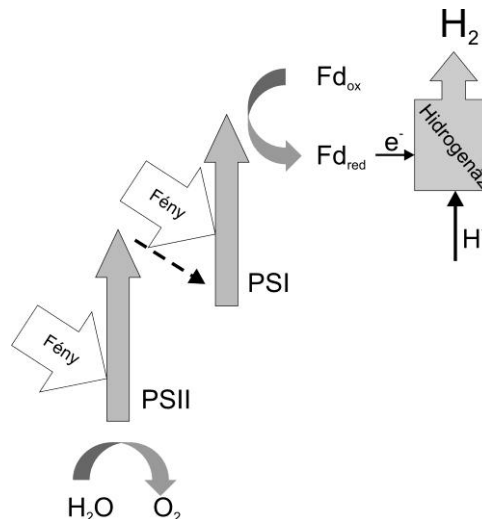
2. Irodalmi áttekintés

2.1. A hidrogén előállítási lehetőségei biológiai úton

A biohidrogén előállítási lehetőségei alapvetően két fő csoportba sorolhatók be. Az egyikbe a fényt igénylő (*light-dependent*), a másikba pedig a fényenergia nélkül is végbemenő sötét fermentációs (*dark fermentation*) eljárások tartoznak. Ezek közös ismérve, hogy hidrogenáz vagy nitrogenáz enzimek által katalizált folyamatok, illetve, hogy mindkét esetben oxigénmentes (anaerob) közegben lejátszódó reakciókról van szó.

2.2.1 Direkt biofotolízis

A hidrogén előállítás ezen módja a zöld algákra és cianobaktériumokra jellemző. Ezen organizmusok fotoszintetikus pigmentekkel rendelkeznek (PSI és PSII), mely rendszerek képesek a fény elnyelésére. A folyamatot az 2.2.-1. ábra szemlélteti. Ezen módszer előnyei, hogy az alkalmazott szubsztrátok (napfény és víz) szinte korlátlan mennyiségben állnak rendelkezésünkre, valamint, ahogy az 2.2.-2. ábra mutatja, a folyamat során nincs a légkörre káros szén-dioxid kibocsátás. A módszer kritikai értékeléseként azonban fontos megjegyezni, hogy alacsony a fénykonverziós hatékonyság, oxigén inhibíció léphet fel, esetleg robbanásveszélyes gázelegy képződhet az oxigén és a hidrogén elegyéből.



2.2-3. ábra -A direkt biofotolízis folyamata [Hallenbeck, 2009a]

2.2.2 Indirekt biofotolízis

Ezen eljárás során a direkt biofotolízis során fellépő oxigén gátlás kiküszöbölése a cél. Ezt úgy próbálják megoldani, hogy a biomassza képződés és a hidrogén előállítás folyamatát térben és/vagy időben elkülönítik egymástól. A folyamatot a direkt biofotolízishez hasonló módon zöld algák és cianobaktériumok segítségével lehet megvalósítani. Ennek során elsőként fotoszintézis zajlik le, ekkor ezen organizmusok napfény, valamint a fotoszintetikus pigment rendszer segítségével oxigént és glükózt állítanak elő, amely terméket a későbbiekben poliszacharid formában tárolják. Ezen szakaszt nevezzük növekedési vagy biomassza képződési szakasznak. A lezajló folyamat második lépésében a képződött biomaszt kisebb helyre és nagyobb adagban koncentrálnak, majd egy fénytől elzárt, anaerob közegbe helyezik át. Ebben a közegben a megtermelt glükóz átalakulása történik meg. A lejátszódó folyamat során pedig protonok és elektronok képződnek, melyek hidrogenáz vagy nitrogenáz enzim közreműködése révén hidrogénné alakulnak az oxigénmentes környezetben. [Levin, 2004; Das, 2001; Hallenbeck, 2009a]

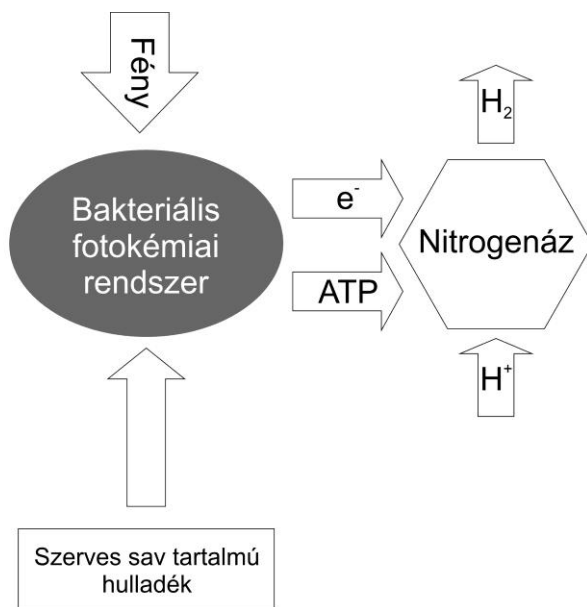
Az indirekt biofotolízis előnye, hogy elkerülhető az oxigén a hidrogén szimultán képződése s ezzel együtt jelenléte, ezen keresztül pedig az, hogy az oxigén inhibítorként hasson a lezajló reakcióra.

A módszer fő hátránya, hogy jelenleg – a direkt biofotolízishez hasonlóan – még nem versenyképes megoldásról van szó.

2.2.3 Fotofermentáció

A fotofermentációt főleg bíbor (nem-kén) baktériumok valósítják meg, melyek nitrogenáz enzimek segítségével katalizálják a hidrogéntermeléskor lejátszódó folyamatot. Ezen enzimek fő feladata, hogy a reakció során jelenlévő molekuláris állapotú nitrogént rögzítsék, majd ezt követően átalakítsák ammóniává.

Oxigénmentes közegben, nitrogén jelenlétében vagy nitrogén hiányában ezen nitrogenáz enzimek hidrogén előállítására is képesek. Sajátos tulajdonságuk, hogy a különböző anyagok átalakulása során keletkező protonok és elektronok H_2 -é alakítása ATP-t igényel. A reakció során rövid szénláncú szerves savak (pl. sötét fermentációs melléktermékek, úgymint acetát, butirát, propionát stb.) használhatók fel, valamint napenergia jelenléte is szükséges. [Levin, 2004; Das, 2001; Hallenbeck, 2009a; Eroglu, 2011]



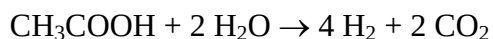
2.2.3.1. ábra - A fotofermentáció folyamata [Hallenbeck, 2002]

Ezen módszer előnyei közé sorolható, hogy szubsztrátok széles köre felhasználható, a rendelkezésre álló napenergia korlátlan mennyiségben áll rendelkezésre, s a végbemenő reakcióval relatív magas hidrogén hozam érhető el. Azonban, ha a reakcióhoz adagolt szubsztrát megújuló forrásból származik, úgy nem tapasztalható nettó szén-dioxid kibocsátás sem.

A módszer hátránya, hogy alacsony gázképződési sebesség érhető csak el, a fénykonverzió hatékonysága alacsony, és mivel a fermentációt bioreaktorban végezzük, így negatívként értékelhető a reaktorok nagy területigénye.

A lejátszódó reakció egyenlete:

$h\nu$



$h\nu$: foton (fény) energiája (h : Planck-állandó; ν : frekvencia)

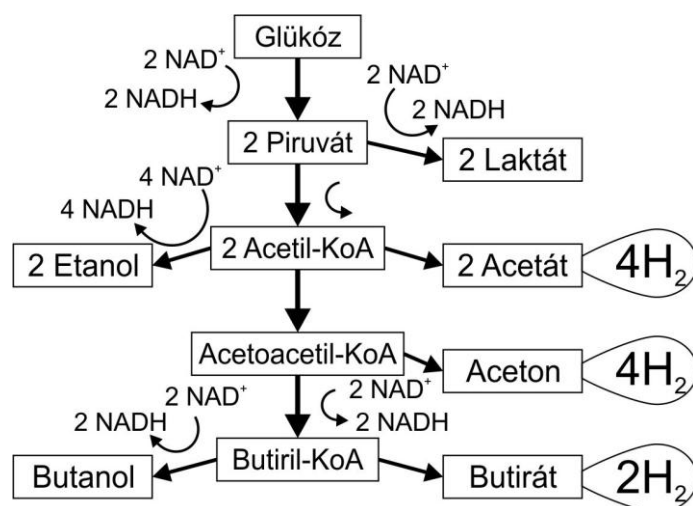
2.3. Sötét fermentáció

A sötét fermentáció során a lejátszódó biokémiai folyamatokhoz heterotróf, fakultatív és/vagy obligát anaerob baktériumok szükségesek, anélkül, hogy fényenergiát kellene közvetlenül felhasználni. A reakcióhoz különféle szerves anyagokat használhatunk szubsztrátként (pl. keményítőt, cellulózt vagy glükózt), melyekből hidrogén és szén-dioxid, valamint melléktermékként szerves komponensek – és természetesen biomassa – keletkeznek. [Levin, 2004; Das, 2001, 2008; Hallenbeck, 2009a].

A sötét fermentáció általános reakcióegyenlete:



Obligát anaerob baktériumok (pl. *Clostridium*) esetén a fermentáléhoz hozzáadott szubsztrát (pl. glükóz) lebomlási lehetőségeit az 2.3-1. ábra szemlélteti.



2.3-1. ábra – Hidrogén termelő folyamatok Clostridium baktériumokban [Mathews, 2009]

Ha a lezajló folyamatok végterméke acetát, úgy a maximálisan kinyerhető hidrogén 4 mol H₂ / mol glükóz.

Ecetsav végtermék esetén [Hawkes, 2002]:



Ha a fermentáció végterméke butirát, abban az esetben a kihozható hidrogén mennyisége maximálisan 2 mol H₂ / mol glükóz

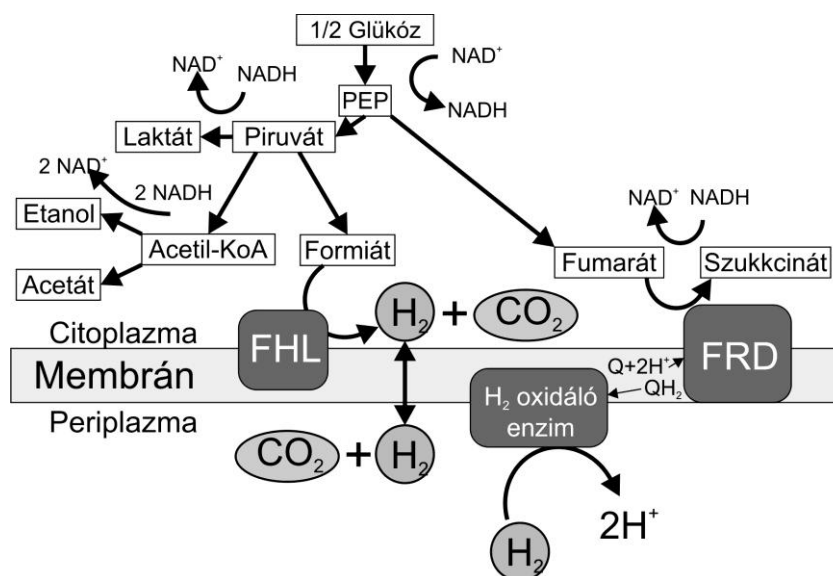
Vajsav végtermék esetén [Hawkes, 2002]:



A 2.3-1. ábra, s a bemutatott egyenletek is szemléltetik, hogy attól függően, hogy milyen fermentációs melléktermék (acetát, butirát, aceton, etanol, butanol) képződik, a hidrogén eltérő (mol H₂ / mol glükóz) hozammal keletkezik. Ezért a fermentáció ezen oldott metabolitjainak monitorozása egy jó indikátora lehet a hidrogéntermelés hatékonyságának megítélésére. Az ábra szerint pl. magas sav és alacsony alkoholképződés feltehetően jó hidrogénképződéssel párosul, míg a relatív magas alkohol koncentráció a hidrogéntermelés folyamatának hanyatlását jelezheti.

Fakultatív anaerob mikroorganizmusokban ún. kevert savas fermentáción keresztül játszódik le a hidrogénképződés. Ezen mikroorganizmusok sajátossága, hogy oxigén jelenlétében vagy hiányában is képesek szaporodni. A hidrogéntermelési folyamatban a kulcshozadékot a formiát.

A folyamat *E.coli* példáján keresztül szemléltethető:



2.3-2. ábra - Az *E. coli* hidrogéntermelő folyamata [Mathews, 2009]

Azok a mikroorganizmusok, melyek sötét fermentációt végeznek főként jellemzően növekedésük exponenciális szakaszában állítanak elő hidrogént. Ezt követően, mikor szaporodásuk eléri az stacioner állapotot, (mikor a szaporodási és elhalási fázis egymással egyensúlyban van) beindulhatnak a hidrogénfogyasztó mechanizmusok (hidrogénoxidáló enzimek aktivitása jelentőssé válhat), ezzel is csökkentve a H_2 kihozatal értékét [Eroglu, 2011; Wang, 2009a].

A keletkezett hidrogén mennyiségére gátló hatást fejthetnek ki egyéb paraméterek is. Ilyenek pl. a nem megfelelő hőmérsékleti- és pH beállítások, a nem megfelelő összetétele a tápközegnek (ez jelentheti azt, hogy túl magas vagy túl alacsony a szubsztrát koncentráció táplálunk be vagy nem megfelelő minőségű és összetételű tápanyagokban, vitaminokban, nyomelemekben gazdag adalékanyagot keverünk a rendszerhez), továbbá negatívan hathat a H_2 reaktortérben fokozatosan növekvő parciális nyomása, a nem megfelelő anyagátadási viszonyok, mely a nem megfelelő kevertetésen alapul.

A sötét fermentáció az eddig ismertetett módszerek közül a leghatékonyabbnak bizonyult, mivel a korábban ismertetett fermentációs folyamatokhoz képest magasabb hidrogén produktivitás érhető el, fény jelenlétét nem igényli, a fermentáció során alkalmazható szubsztrátok igen széles körben rendelkezésre állnak. Amennyiben alapanyagként mezőgazdasági hulladékot használunk, abban az esetben kettős célt tudunk megvalósítani. Egyrészt eleget tehetünk a környezetvédelmi kívánalmaknak, ezzel párhuzamosan pedig olcsó, megújuló energiát állíthatunk elő. További előny, hogy a fermentáció során egyszerűbb reaktortechnika és üzemvitel szükséges. Hátrányai között megemlíthető azonban a relatív kis H_2 hozam pl. a fotofermentációs rendszerekhez képest, hiszen a betáplált szubsztrát hidrogéntartalmának nagy része nem hidrogén (H_2) formában jelenik meg, hanem nagy energiatartalmú szerves anyagokban, vegyületekben, vagyis a már bemutatott fermentációs melléktermékekben. Ezek kinyerése, további feldolgozása, átalakítása célszerű lehet a folyamat összhatékonyságának növelése érdekében.

2.4. A sötét fermentációs hidrogéntermelést befolyásoló főbb tényezők

2.4.1 Hidrogéntermelő mikroorganizmusok, az inokulum összetétele

A baktériumok nagy hányada rendelkezik hidrogéntermelő képességgel. A biohidrogén termelést ezek felhasználásával, mind tiszta tenyészték, mind pedig kevert kultúrák segítségével megvalósíthatjuk. Elmondható azonban, hogy a kevert mikrobakonzorciumok alkalmazása számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik, hiszen ezek nem igényelnek steril körülményeket, amely ipari méretekben nehezen megoldható, valamint az ilyen rendszerek a diverzitásuknak köszönhetően többféle, s komplexebb összetételű alapanyag hidrogénné konvertálását képesek elvégezni. Azonban mindenképpen meg kell említeni, hogy azon források, melyekből ilyen számunkra hasznos mikroorganizmusok nyerhetők, számos esetben tartalmaznak olyan baktériumtörzseket is, melyek képesek a megtermelt hidrogén felvételére, elfogyasztására is. Ilyenek pl. a metántermelő (metanogén) archeák, a szulfátredukáló baktériumok, valamint számos acetogén baktérium, s így a megfelelő hidrogéntermelés megvalósításához ezen, nem kívánatos mikrobacsoportok eliminálása esszenciális. A fermentáció során elérhető hozam és a hidrogénképződési sebesség természetesen nagymértékben függenek a bioreaktorban jelenlévő mikrobapopuláció összetételétől, jellemzőitől. [Lee, 2011]

2.4.2 Hőmérséklet és pH

A hőmérséklet egy igen fontos faktor, mivel értéke meghatározza egy hidrogéntermelő rendszer hatékonyságát. Általánosságban elmondható, hogy a hidrogéntermelésre alkalmazott bioreaktoroknál mezofil vagy termofil körülményeket állítanak be, melyek optimuma 37 °C illetve 55 °C körül található. Továbbá korábbi tapasztalatokon alapuló tény, hogy a hőmérsékletet egy bizonyos értékig történő emelése növeli-, míg ezen érték fölé való továbbnövelése csökkenti a mikrobák hidrogéntermelő aktivitását. A hőmérséklet mellett másik fontos paraméter a pH, melynek megfelelő értékének beállítása szintén meghatározó a reakció szempontjából, mivel a kémhatás befolyásolja a hidrogenáz enzimek aktivitását, valamint a sejtekben lejátszódó metabolikus folyamatokat. A pH és a hőmérséklet változtatása során változhatnak a mikrobákban végbemenő anyagcsere folyamatok (*metabolic shift*). Ilyen eset például, amikor bizonyos baktérium törzsek esetén a fermentáció a hidrogén- és savtermelés helyett egyéb (hidrogént akár nem is eredményező) melléktermékek (pl. alkoholok) képződésének irányába tolódik el. Továbbá, ha a pH és a hőmérséklet megváltozik, az befolyással lehet a mikrobiológiai összetételére, diverzitására, vagyis konzorciumot alkotó törzsek egymáshoz viszonyított arányára is, hiszen a megváltozott környezeti feltételek által bizonyos törzsek szaporodása előtérbe kerülhet, melyek így dominánssá válnak, míg más mikrobák növekedése lelassul (*population shift*). Ennek egyik példája lehet, amikor a hidrogéntermelő törzseket egyéb, pl. hidrogénfogyasztó organizmusok (pl. propionsav termelők) veszik át. Szakirodalmi adatok alapján, a biohidrogén fermentáció pH optimuma 4-7 közötti intervallumban található, attól függően, hogy a fermentáció során alkalmazott kultúrát alkotó mikroorganizmusok milyen kémhatást igényelnek. [Hallenbeck, 2009; Lay 2004; Liu 2004]

2.4.3 Szubsztrátok

A szubsztrátokkal szemben támasztott egyik alapkövetelmény, hogy szénhidrátokban gazdag legyen, amely szénhidrátok lehetnek akár egyszerű, akár komplex (biopolimer) formában jelen a rendszerben, mert a kutatások szerint a zsírok, fehérjék közvetlenül nem alkalmasak anyagok biohidrogén előállítására, ellentétben pl. a biogáz (biometán) képződéssel, ahol ezen anyagok is rendre megfelelően hasznosulhatnak.

Az első és második generációs alapanyagok, a növényi biomassza, az ipari- és mezőgazdasági eredetű hulladék anyagok, megfelelő mennyiségű szénhidrát tartalommal (cellulóz és hemicellulóz, mint poliszacharidok) rendelkeznek, így potenciális forrást jelentenek az őket hasznosítani képes hidrogéntermelő baktériumoknak.

Amennyiben az átalakítandó szubsztrát komplex formában van jelen a rendszerünkben, úgy fermentálhatóságának előfeltétele a hidrolízis, mivel fontos kritérium, hogy a baktériumok számára az alapanyag hozzáférhető, felvehető módon legyen jelen. Ha lignocellulóz alapanyaggal dolgozunk, akkor a megfelelő hidrolízis eléréséhez sok esetben szükség van valamilyen előkezelési módszerre, amely előkezelés lehet fizikai, kémiai vagy biológiai. Az előkezelés célja a hidrolízis végző extracelluláris enzimek (pl. celluláz, hemicelluláz, proteáz, lipáz) poliszacharid frakciókhoz való hozzáférhetőségének növelése. Fizikai előkezelési formák pl. a darálás, őrlés, aprítás, ultrahangos előkezelés, kémiai előkezelési forma a savas vagy lúgos feltárás, míg biológiai pedig az enzimekkel végzett előkezelés. A legmegfelelőbb megoldást azonban az jelentené, ha sikerülne olyan baktérium törzseket alkalmazni, melyek maguk megtermelik azokat az enzimeket, melyekkel képesek a komplex anyagok megfelelő lebontására, ezzel elkerülve és a költség- és energiaigényes előkezelés szükségességét. [Fang, 2002; Hallenbeck, 2009; Levin, 2006; Wang,2009]

2.4.4 Nitrogén és Foszfor

A nitrogén az aminosavak-, (tehát közvetve a fehérjék), a nukleinsavak és más sejtalkotók szintéziséhez, valamint a baktériumok szaporodásához egyaránt elengedhetetlen fontosságú elem, ezért a baktériumok nagymértékű szaporodásához elengedhetetlen a megfelelő mennyiségű nitrogén jelenléte. A megfelelő szaporodás pedig a hatékony biohidrogén termelés kulcsa is egyben, hiszen általában elmondható, hogy hidrogén képződése párhuzamosan megy a baktériumok növekedésével, vagyis a hidrogén ún. primer anyagcsere termék. Ha a fermentáció során felhasznált alapanyag nitrogén tartalma nem megfelelő, abban az esetben szükség lehet nitrogén egyszerű, szerves (pl. ammónia illetve annak sói, karbamid) vagy komplex, szerves (élesztőkivonat, pepton) forrásból történő pótlására, kiegészítésére. A nitrogén mellett a foszfor is az elsődleges biogén elemek csoportjába tartozik, így jelenléte szintén szükséges a baktériumok megfelelő életműködéséhez, s hiányában csökkenhet a bioreaktor teljesítő képessége, a hidrogénképződés hatékonysága. [Argun, 2008;Lin,2004;O-Thong,2008]

2.4.5 Nyomelemek

A korábban tárgyalt C, N, P jelentősége mellett elengedhetetlen a különböző nyomelemek jelenléte a reaktorban. Ilyen nyomelemek pl. Ni, Fe, Mn, Cu, Zn, Mg, Ca, K, stb. melyeknek fontos szerepük van – például, de nem csak a hidrogéntermelésben résztvevő – enzimek katalitikus aktivitásának kialakításában és fenntartásában. Ha azonban a fermentlé nagy koncentrációban tartalmazza ezen nyomelemeket, azok akár toxikus hatást is kifejthetnek. [Lay, 2005; Liu, 2004; Wang, 2009]

2.5. Az inokulum előkezelése

Ahogy az már a 2.4.1 fejezetben említésre került, a hidrogéntermelés megvalósítható tiszta és kevert tenyészetekkel egyaránt. Habár a tiszta kultúrák alkalmazásával is számos figyelemre méltó eredmény született, ezen kísérletekben jellemzően csak egyszerű szubsztrátokat (pl. monoszacharidok, diszacharidok) alkalmaztak, mivel ritka, hogy egy-egy mikroba törzs egymagában rendelkezne az összetett alapanyagok megfelelő mértékű hidrogénné alakításához szükséges enzimkészlettel, s a steril körülmények fenntartása is nehézkes. A kevert kultúrák, mikrobakonzorciumok alkalmazásával az említett hátrányok nagy része kiküszöbölhető. Az ilyen faj gazdag mikrobakultúrák megtalálhatók pl. az anaerob rothasztók (biogáz fermentorok) aktív iszapjában, szennyvíziszapban, stb. A legtöbb esetben azonban, amikor ezeket a mikrobapopulációkat alkalmazzák szükséges valamilyen előkezelés, hiszen ezen populációk nem kizárólag hidrogéntermelő törzseket, hanem hidrogénfogyasztó mikroorganizmusokat (pl. metanogéneket) is tartalmaznak, s ezeket valamilyen módon eliminálni kell a fenntartható hidrogéntermelés megvalósítása érdekében. Erre számos módszer ismert a szakirodalomban, pl. mikrohullámú előkezelés, savas- v. lúgos előkezelés, kémiai inhibitor hozzáadása, levegőztetés, termikus eljárás, fagyasztás és felolvasztás stb. Jóllehet a különböző forrásokból származó iszapok nagyon eltérő tulajdonságai miatt egyik előkezelési módszer sem minősíthető egy egyetemesen legjobban alkalmazható megoldásnak, az eljárások közül az eddig leghatékonyabb módszernek mégis a hőkezelés bizonyult. A termikus kezelés egy egyszerűen és rutin módon alkalmazható, relatív gyorsan elvégezhető és megbízható, hatékony módszer.

Számos mikroba pl. a *Bacillus* és a *Clostridium* képes spórát képezni, mikor a környezeti feltételek számukra kedvezőtlen irányba mozdulnak el, például ha hő-sokk éri őket, megváltozik a tápanyagok mennyisége és minősége vagy a fermentlében a toxikus

anyagok koncentrációja megemelkedik. Endospóra formában a sejtek metabolikusan inaktív állapotban kerülnek s jól ellenállnak a hőnek, a sugárzásnak, a kiszáradásnak, a szélsőséges pH-nak, a vegyi anyagoknak. Oxigénmentes környezetben a spóráképző mikroorganizmusok nagy része a savképző (s hidrogéntermelő) baktériumok családjából származik. Ezt a tényt számos kutató használta fel arra, hogy inhibeálja vagy elpusztítsa az endospórát nem képező mikroorganizmusokat, főként a metanogéneket. Ezt általánosan az inokulum magas hőmérsékleten, néhány tíz percig történő hőkezelésével érték el. Ez az eljárás tehát szelektálja a spóráképző hidrogéntermelő baktériumokat, melyek a környezeti feltételek normalizálódása esetén ismét aktívvá válnak, növekedésnek, szaporodásnak indulnak s így a hidrogénképződés is újra beindul. [Li,2007; Wang 2009]

2.6. Kísérlettervezés

A biohidrogén fermentáció legfontosabb paramétereinek a megtalálása kiemelten fontos, hiszen ezek változtatásán, majd az értékeik optimalizálásán keresztül érhetjük el a vizsgált rendszerünkben a lehető leghatékonyabb üzemvitelt. Az ilyen paraméterek száma azonban igen jelentős lehet, többek között ide tartozhat a hőmérséklet, a pH, a fermentlé összetétele, stb.

Az idő- és gazdasági tényezők szűkössége miatt azonban törekednünk kell arra, hogy ezt a feladatot minél rövidebb idő alatt, minél gazdaságosabban tudjuk megoldani. . [Weuster-Botz, 2000]. Tehát lehetőleg minél kisebb számú kísérleti munka elvégzésével célszerű keresni az egyes input-output változók közötti kapcsolatokat, s az így kapott információk alapján meghatározni az adott szempontból megkívánt optimális rendszer beállításoknak. Tehát az elvégzendő kísérleteket kell úgy megtervezni, hogy a lehető legkisebb költség- és időráfordítással maximalizáljuk a kinyerhető (s megbízható) információk mennyiségét [Márkus, 2012].

A leírt problémák megoldásához nyújtanak segítséget a kísérlettervezéseken alapuló optimalizálási módszerek. Ezen módszerek alapjai a matematikai statisztikához szorosan kötődnek, melynek a célja objektív konklúziók levonása, valamint a valóságot megfelelően leíró modell készítése a megadott paraméterek, valamint a mért vagy megfigyelt adatok alapján. A kísérlettervezés során a vizsgált rendszerünket „fekete doboznak” tekintjük. Ennek fő jellemzője, hogy nem célja a vizsgált objektum belső struktúrájának, folyamatainak feltárása, ok-okozati viszonyok megállapítása, csupán mennyiségi összefüggést keres a független és függő paraméterek között. [Kemény, 2000; Márkus, 2012].

3. Célkitűzések

Elsődleges célom volt, hogy a Pálhalmai Agrospeciál Mezőgazdasági Termelő, Értékesítő és Szolgáltató Kft. anaerob rothasztójából származó iszapot termikusan előkezeljem, mellyel a metanogén, hidrogénfogyasztó baktériumok megfelelően kivonhatók a rendszerből úgy, hogy az minél hatékonyabb hidrogéntermeléssel párosuljon.

Ennek során vizsgálni szándékoztam a termikus előkezelést befolyásoló faktorok (előkezelési idő, hőmérséklet) hidrogénképződésre gyakorolt hatását, valamint célom volt ezen tényezők optimális kombinációjának meghatározása kísérlettervezéssel.

További célul tűztem ki, hogy az optimálisan előkezelt iszap alkalmazásával vizsgáljam a hidrogéntermelő kísérleteket befolyásoló tényezők, a keményítő, mint szubsztrát-, valamint a kiegészítő nitrogén- ill. nyomelem forrásként alkalmazott élesztőkivonat koncentrációjának a folyamatra kifejtett hatását, a hidrogénképződés hatékonyságnövelési lehetőségeit.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Beoltó iszap

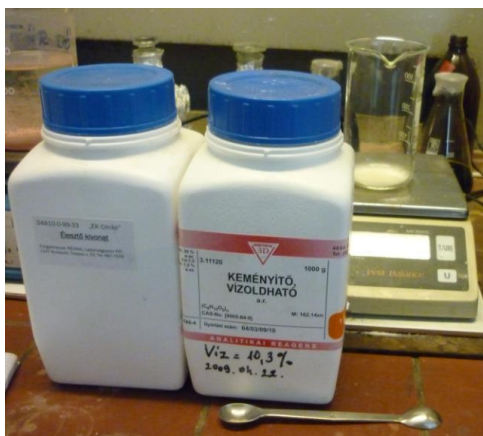
A kísérleteim alapjául Pálhalmi Agrospeciál Mezőgazdasági Termelő, Értékesítő és Szolgáltató Kft anaerob rothasztójából származó mezofil, folyékony iszap szolgált, mely eredetileg főként a mezőgazdaságban (ezen belül is az állattenyésztés során) keletkező hulladék ártalmatlanítását, biogázzá alakítását végezte. A begyűjtött iszap kezdeti pH-ja 8.4 volt.



4.1-1. ábra -Beoltó iszap

4.2 Fermentációs kísérletek

A biohidrogén fermentációhoz szubsztrátként (szénforrásként) keményítőt, nitrogén- és nyomelem forrásként pedig élesztőkivonatot alkalmaztam.



4.2-1. ábra -A fermentációs kísérletekhez felhasznált anyagok

Az előkezelendő iszapot elsőként homogenizáltam, majd előre megállapított mennyiséget (100 mL) egy üveg főzőpohárba öntöttem, melyet alufóliával takartam le. Ezt követően a megfelelő hőmérsékletre felfűtött M 12 LAUDA típusú vízfürdős termosztátba helyeztem a főzőpoharat.



4.2-2. ábra -Vízfürdős termosztát

Az előkezelést követően a főzőpoharat folyó csapvíz víz mellett rögtön kéz melegre hűtöttem, megfelelő mennyiségét (50 mL) az előre kimért keményítővel és élesztőkivonattal összekevertem, s a kezdeti pH-t kénsavval 6.5-re állítottam.

Ezt követően az iszapot a manometrikus gázmérő készülékbe töltöttem, majd a folyadék- és gáztér inert gázzal (nitrogén) való átbuborékolásával biztosítottam az anaerob körülményeket a reaktoron belül. Ez a művelet elősegítette, hogy a gáztérből valamint a folyadéktérből eltávolítsuk a reakció szempontjából inhibitorként jelen lévő oldott és gázfázisban jelenlevő oxigént. Az átbuborékolatást 5 percig folytattam s a reaktorokba egy-egy mágneses keverőt helyeztem. Az 5 perc letelte után az üvegeket egy tömítő gumikosárral láttam el s rácsavartam a manometrikus fejet. A fermentációhoz használt palackokat a mérés előtt alaposan kitisztítottam, acetonnal átmostam és levegőfúvatással kiszárítottam, hogy a rendszerbe ne kerülhessen be semmilyen a reakciót befolyásoló tényező. Ezen mechanizmusokat minden egyes előre megtervezett kísérleti ponthoz tartozó mérésnél megismételtem.

4.3 Manometrikus gázmérő készülék

Fermentációs kísérleteimet a WTW OXITOP 100 típusú manometrikus gázmérő készülékben végeztem. A készülék össztérfogata 500 mL volt, mely térfogatból 50 mL-t a folyadék, 450 mL-t pedig a gázfázis tett ki. A kísérletem során a fermentációs készülékben keletkező gáz(ok) nyomásának emelkedését mértem, a készülékre csavarható mérőfej segítségével. Az összeállított készülékeket egy 37 °C-ra beállított légtermosztátba helyeztem, majd ezt követően 48 órán keresztül figyelemmel kísértem a készülékekben a gázképződés hatására bekövetkező nyomásváltozást 110 rpm keverés mellett.



4.3-1. ábra Manometrikus gázmérő készülék

Ezt követően a fermentációs idő lejártá után, a berendezésekből gázfecskendő segítségével mintát vettem és gázkromatográf segítségével analizáltam a reakció során keletkezett gázösszetételt.

4.4 Gázanalitika

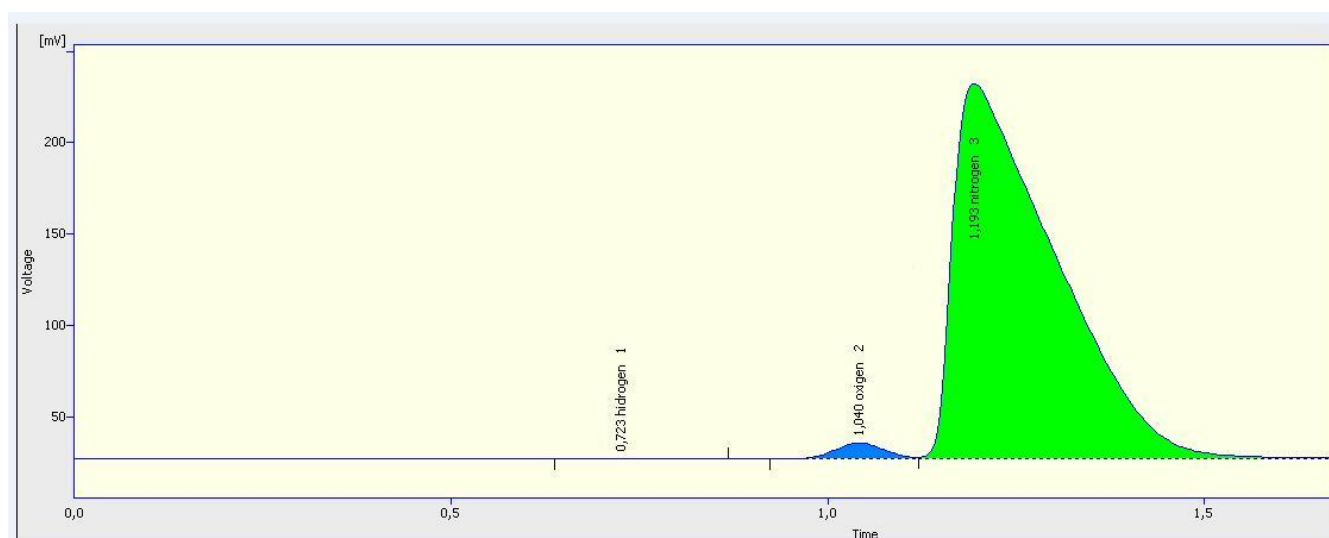
Kísérleteim során a fermentációs folyamatokban képződött gáz összetételét gázkromatográfiás módszerrel határoztam meg. A mérésekhez a laboratóriumban használt GOW-MAC Series 600 típusú gázkromatográfiás berendezést használtam (4.4.1.ábra). A berendezésben hélium volt a vivőgáz, melynek áramlási sebessége 30 mL/perc volt, a kolonna pedig egy 2 m hosszú, zeolit (X13) töltetes elválasztó oszlop volt. A gázok detektálására (TCD) hővezető képességi detektort alkalmaztam.

A mérések megkezdése előtt a gázkromatográfiás berendezést kalibrálni kellett a várható gázkomponensekre nézve. Különböző mennyiségek (50-1000 μL) beinjektálásával kalibrációs egyeneseket készítettem, majd az egyes minták analizálása során alkalmaztam az így kapott összefüggéseket.

Nitrogén és oxigén kalibrációját levegővel végeztem, hidrogén és metán kalibrációjához a gázt gázpalackból nyertem ki. Hidrogén esetében a tisztaság 99,5 % -os, míg metánra ez 99,9% volt. Mindkét gázt a Messer Hungarogáz Kft, Budapest forgalmazza.



4.4-1. ábra A GOW-MAC 600 gázkromatográf



4.4-2-ábra Példa a gázanalitika során kapott kromatogramra

Result Table (ESTD - - 2012.09.14. 9_43_31 - Detector 1)						
	Reten. Time [min]	Response	Amount [mg]	Amount [%]	Peak Type	Compound Name
1	0,723	1,076	24,761	2,5	Ordnr	hidrogen
2	1,040	40,612	16,536	1,7	Ordnr	oxigen
3	1,193	1947,324	944,844	95,8	Ordnr	nitrogen
	Total		986,140	100,0		

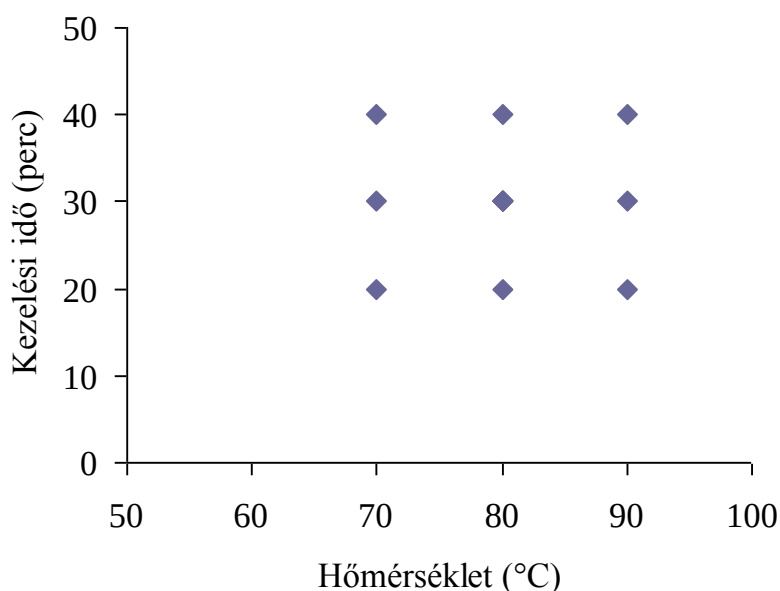
4.4-3.ábra- A 4.4-2 ábrán látható kromatogram értékelése

*A gázkromatográfiás analízis során az egyes gázokra felvett kalibrációs összefüggések a Mellékletek c. fejezetben találhatók.

5. Eredmények és értékelésük

5.1 A termikus előkezelés hatásának vizsgálata a hidrogénhozamra

Az anaerob rothasztóból származó iszapot különböző hőmérsékleti értékeken különböző ideig hőkezelttem (5.1-1. ábra), mellyel célom az volt, hogy az elvégzett kísérletek alapján megtaláljam eme paraméterek optimális kombinációt, mellyel a metanogén (hidrogén-fogyasztó) mikrobák megfelelően eliminálhatók a mikrobapopulációból s a hidrogén hozam pedig ezzel párhuzamosan maximalizálható. Ennek elérésére, vagyis a vonatkozó kísérleteim során egy 3-szintes, teljes faktoriális kísérleti tervet készítettem Statistica 8 szoftver segítségével. Ezen típusú kísérleti terv az irodalmi adatok szerint széles körben alkalmazott a különböző optimalizációs feladatok elvégzéséhez. Mivel 2 faktort vizsgáltam 3 szinten, ez $3^2 = 9$ db kísérlet elvégzését jelentette, amihez hozzáadódott még 2 db ismétlés a terv középpontjában, ami a mérések szórásának becslhetőségéhez járult hozzá, így ez összesen 11 kísérlet elvégzését jelentette (5.1-1. táblázat). Az egyes fermentációkat véletlenszerű sorrendben, 48 óráig futtattam (5.1-2. ábra), majd a keletkezett biogázt gázkromatográfiás módszerrel analizáltam, végül a kapott eredményt statisztikai alapon kiértékeltem. A rendszer optimalizálásához csakis a statisztikailag szignifikáns hatótényezők a fontosak, mivel ezek határozzák meg a lejátszódó folyamat adott szempontú viselkedését.



5.1-1. ábra 3^2 kísérleti terv a termikus előkezelés paramétereinek (előkezelési idő és hőmérséklet) hatásának vizsgálatára

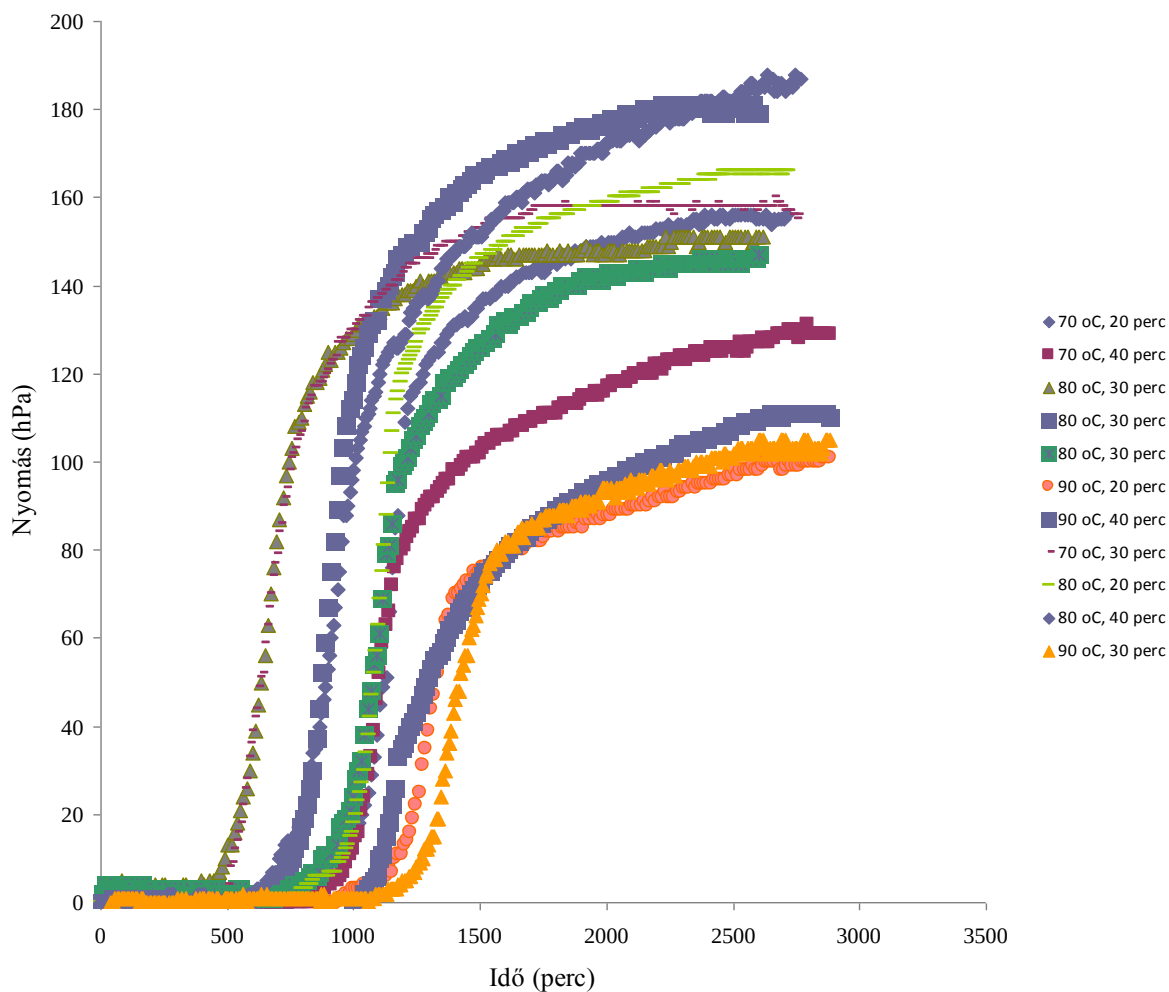
5.1-1. Táblázat. A kísérleti tervben szereplő változók és kódolásuk

Változók	Kódolt értékek		
	-1	0	1
X_1 – Hőmérséklet (°C)	70	80	90
X_2 – Kezelési idő (perc)	20	30	40

5.1-2. Táblázat A 3^2 kísérleti terv mátrix (az elvégzendő kísérleti beállítások)

Kísérlet száma	Hőmérséklet (°C)	Kezelési idő (perc)
1	-1	-1
2	-1	1
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	1	-1
7	1	1
8	-1	0
9	0	-1
10	0	1
11	1	0

Az 5.1-2. táblázatban látható kísérleti beállításokhoz tartozó fermentációk profilját az 5.1-2. ábra reprezentálja, ahol a keletkezett gázok össznyomása látható az idő függvényében.



5.1-2.ábra A különböző kísérleti beállítások melletti fermentációs lefutások

A görbékől jól látszik, hogy az adott kísérleti beállítás függvényében az elérhető össznyomás értékek egy viszonylag széles skálán mozogtak. Az 5.1-2. ábrán bemutatott kísérletek során detektálható mennyiségű metánt nem tapasztaltam, tehát a termikus előkezelés ebből a szempontból minden esetben megfelelőnek bizonyult. A kapott eredményeket – a fermentáció során keletkezett össznyomás illetve a kromatográfiás gázanalízis figyelembevételével – az 5.1-3. és 5.1-4. táblázat szemlélteti:

5.1-3. Táblázat A fermentációk során kapott összgáznyomások, az egyes injektált mintákban mért H_2 (uL/mL)/ $[CO_2$ (uL/mL) + H_2 (uL/mL)] arányok, s az ezekből számolt H_2 és CO_2 gázok parciális nyomása

	Össznyomás [hPa]	egyes injektált mintákban mért H_2 (uL/mL)/ $[CO_2$ (uL/mL) + H_2 (uL/mL)] arányok	H_2 [hPa]	CO_2 [hPa]
1	156	0,707	110	46
2	129	0,6	77	52
3	151	0,425	64	87
4	180	0,765	138	42
5	148	0,437	65	83
6	101	0,091	9	92
7	111	0,07	8	103
8	158	0,641	101	57
9	166	0,591	98	68
10	186	0,392	73	113
11	103	0,077	8	95

Az 5.1-3. táblázatban látható adatokból számoltam, hogy az egyes kísérleti pontokhoz mekkora hidrogénhozam tartozik.

A hidrogénhozam számításának részletes menete egy példán keresztül bemutatva:

$V = 450 \text{ ml} = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3$ (a reaktorban lévő szabad gáztérfogat)

$R = 8,314 \text{ J/mol K}$ (egyetemes gázállandó)

$T = 310 \text{ K}$ (37 °C –on zajlott a fermentáció)

$p_0 = 156 \text{ hPa} = 15600 \text{ Pa}$ (70 °C-on, 20 percig tartó előkezelés során keletkező össznyomás)

Ezen adatokból az ideális gáztörvény alapján számítható a keletkezett gáz összes anyagmennyisége (n_0):

$$p_0 V = n_0 R T$$

$$n_0 = 2,72 \cdot 10^{-3} \text{ mol} = 2,72 \text{ mmol}$$

Azon feltételezéssel, hogy a fermentáció során a H_2 és CO_2 keletkezése a meghatározó, vagyis a többi gáz képződése ezekhez mérten elhanyagolható, a gáztér analízis adataiból (5.1 3. táblázat) számítható az egyes gázok parciális anyagmennyiségei (n_{H_2} , n_{CO_2}). A gázminta H_2 és CO_2 tartalma alapján (70 °C, 20 perc előkezelés esetén) a ($\text{H}_2/\text{H}_2+\text{CO}_2$) arány 0,707, vagyis a keletkezett gáz H_2 tartalma 70,7%, míg a CO_2 tartalma $(1-0,707) \cdot 100 = 0,293 \cdot 100$, vagyis 29,3%.

A H_2 parciális anyagmennyiségének (n_{H_2}): $n_{\text{H}_2} = n_0 \cdot 0,707$

$$2,72 \text{ mmol} \cdot 0,707 = 1,92 \text{ mmol } \text{H}_2$$

A H_2 hozamot a keményítőre (beadott szubsztrátra) vonatkoztattam:

A rendszerhez adagolt keményítő koncentrációja:

$$5 \text{ g} \rightarrow 1000 \text{ mL}$$

$$x \text{ g} \rightarrow 50 \text{ mL}$$

$$x = 0,25 \text{ g}$$

Tehát a számított H_2 hozam: $1,92 \text{ mmol } \text{H}_2 / 0,25 \text{ g keményítő} = 7,68 \text{ mmol } \text{H}_2 / \text{g keményítő}$

5.1-4. Táblázat A kapott hidrogénhozam értékei táblázatban összefoglalva

Hőmérséklet [°C]	Kezelési idő [perc]	H ₂ [mol]	H ₂ [mmol]	mmol H ₂ /g keményítő
70,0	20,00	0,001921	1,9205	7,68
70,0	30,00	0,001763	1,7634	7,05
70,0	40,00	0,001344	1,3444	5,38
80,0	20,00	0,001711	1,7111	6,84
80,0	30,00	0,001117	1,1174	4,47
80,0	30,00	0,002409	2,4095	9,64
80,0	30,00	0,001135	1,1349	4,54
80,0	40,00	0,001275	1,2746	5,10
90,0	20,00	0,000157	0,1571	0,63
90,0	30,00	0,000140	0,1397	0,56
90,0	40,00	0,000140	0,1397	0,56

Az egyes kísérleti beállításhoz számolt hidrogénhozamok értékeinek ismeretében Statistica 8 segítségével, statisztikai alapon (varianciaanalízis – ANOVA) értékeltem ki a 3² kísérleti tervet, a termikus előkezelés hőmérsékletének és idejének hidrogénhozamra vonatkozó hatását. Az eredményeket az 5.1-5. táblázat tartalmazza.

5.1-5. Táblázat – Az egyes faktorok hatásai a hidrogénhozamra

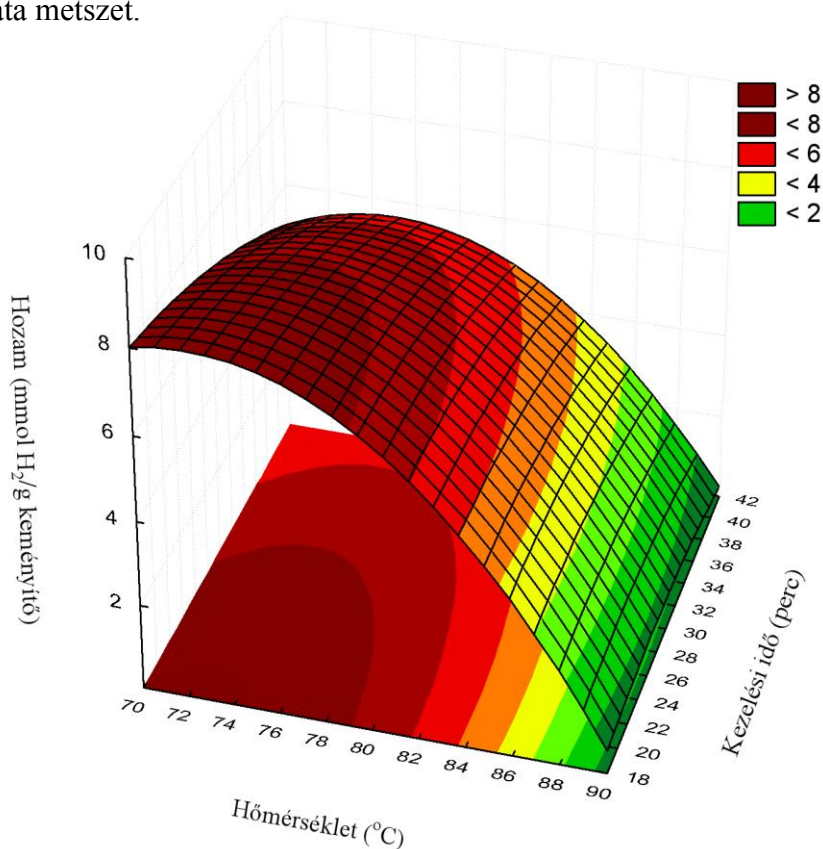
Faktor	Szignifikancia (α)
Hőmérséklet	0,018
Kezelési idő	0,679
Hőmérséklet x Kezelési idő	0,579

Az ANOVA szerint azon változók hatásai tekinthetők statisztikailag szignifikánsnak (vagyis nem a véletlenből adódnak), melyek szignifikancia értékei (α) teljesítik az $\alpha < 0,05$ kritériumot. Így az 5.1-5 táblázat adatai alapján megállapítható, hogy a vizsgált faktorok (előkezelési hőmérséklet és idő) közül a hőmérséklet a szignifikáns hatótényező, vagyis ez az egyetlen kulcsváltozó, mely meghatározza az elérhető hidrogénhozam értékét. A statisztikai

kiértékelés szerint a kezelési idő ugyan nem hat szignifikánsan, de az eredmények alapján célszerű azt csökkenteni, mert hatásának iránya szerint a rövidebb kezelési idő némiképp magasabb hidrogénhozammal párosulhat. Ez magyarázható azzal, hogy adott hőfokon a kezelési idő növelése a hidrogéntermelő mikroorganizmusok szaporodására is negatív hatással lehet, vagyis bár a hidrogén-fogyasztó baktériumokkal összehasonlításban sokkal ellenállóbbak, az elhúzódó előkezeléssel (a kedvezőtlen környezeti feltételek hosszabb fennállásával) ezen szervezetek aktivitása is csökkenhet. A kísérleti terv kiértékelésének eredménye grafikusan az 5.1-3. ábrán látható, mely felület az alábbi modell segítségével került illesztésre:

$$y = b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + Y_0$$

ahol y a válaszváltozó (H_2 hozam); X_1^2 és X_2^2 a független változók (hőmérséklet, kezelési idő) négyzetes hatásai; X_1 és X_2 a független változók lineáris hatásai; X_1X_2 a független változók kölcsönhatása; b_{11} és b_{22} négyzetes, b_1 és b_2 lineáris, míg b_{12} kölcsönhatás együttható; Y_0 pedig az ordináta metszet.



5.1-3. ábra Az előkezelési hőmérséklet és idő hatása a hidrogénhozamra

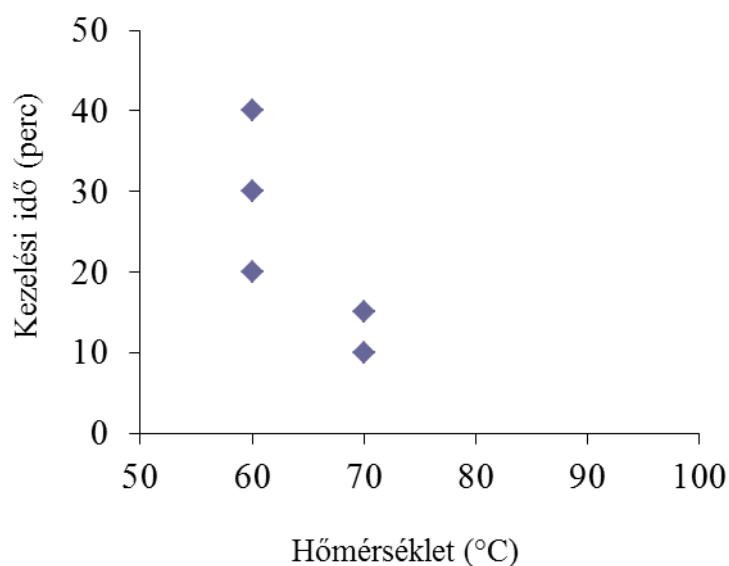
A 5.1-3. ábra színskálája a különböző előkezelési körülmények között eltérő hidrogénhozamot szemlélteti, melynek alapján szemmel is látható, hogy a hőmérséklet szerepe sokkal jelentősebb az előkezelési időhöz mérten. Amint megfigyelhető, a 90 °C –on végzett előkezelések esetén rendkívül alacsony hidrogénhozam érték volt jellemző. Ez azzal magyarázható, hogy ilyen magas hőmérsékleten a spóraformával nem rendelkező metanogén baktériumokon kívül már a spóraformával rendelkező hidrogéntermelő mikroorganizmusok bizonyos hányada is elpusztult, eliminálódott a rendszerből. Tehát megállapítható, hogy ilyen magas hőmérsékleti értéken sem célszerű előkezelést végezni.

Az ábra alapján a termikus előkezelés optimuma – ahol a metanogén mikrobák hatékony visszaszorítása a legnagyobb hidrogén hozammal párosul – 70 °C, 20 percben állapítható meg.

5.2 A termikus előkezelés optimumának validálása

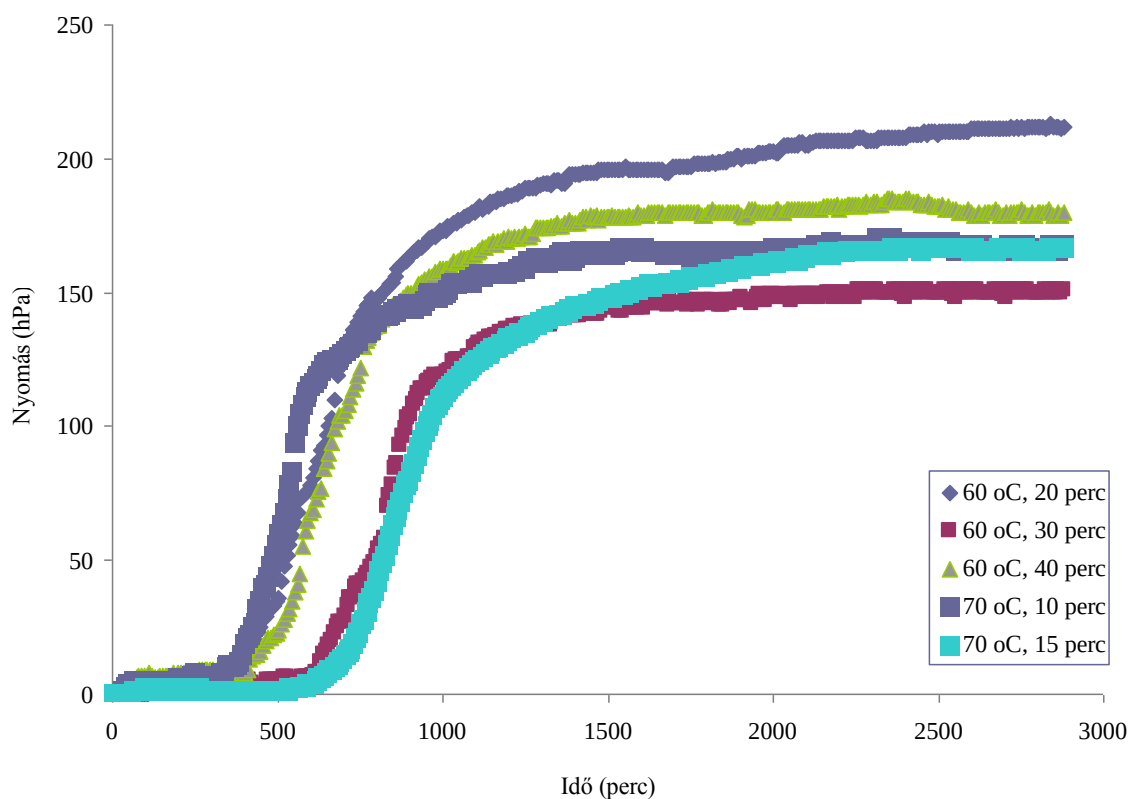
A 70 °C, 20 perc, mint optimálisnak megállapított termikus előkezelési paraméterek validálása érdekében kiegészítő kísérleteket végeztem (5.2-1 ábra). Vagyis ezen kísérletekkel az volt a célom, hogy az előzőleg meghatározott optimális hőmérséklet és kezelési idő kombinációjának hitelességét alátámasszam. Ezen mérésekben az előkezelési hőmérséklet és idő tovább csökkentésének hatását vizsgáltam.

Elsőként a hőmérsékletet csökkentettem 60 °C- ra, majd ezen a hőmérsékleten is elvégeztem a legalacsonyabb (20 perc)-, a legmagasabb (40 perc)-, valamint a középértéken (30 perc) az anaerob rothasztóból származó mezofil iszap termikus előkezelését. Ezt követően 70 °C-on, a kezelési idő csökkentésével (10 és 15 perc) tartó előkezelést végeztem, hiszen a 3² kísérleti terv statisztikai kiértékelése azt mutatta, hogy a kezelési idő csökkentése pozitívan hathat a hidrogénhozamra (5.2-3. ábra).



5.2-1. ábra. A validálási kísérleti beállítások

Az 5 elvégzett kísérlet lefutását az 5.2-2. ábra demonstrálja:



5.2-2. ábra -A fermentációk során kapott gázképződési görbék

Az 5.2-2. diagramon látható, hogy a képződött össznyomások értékei nagyságrendileg megegyeznek az 5.2-3. táblázatban megadott 11 kísérlet elvégzése során kapott értékekkel.

Ezt követően a fermentor gázterének összetételét gázkromatográfias módszerrel analizáltam, majd számolással meghatároztam az egyes gázok hozamát. A számolás menetét az 5.1. fejezetben leírtakkal analóg módon végeztem. A kapott eredményeket az 5.2-1. táblázat foglalja össze:

5.2-1. Táblázat A validálási kísérletek során kapott gázhozamok

Kísérleti körülmények	Össznyomás [hPa]	H ₂ [mmol]	mmol H ₂ /g keményítő	CH ₄ [mmol]	mmol CH ₄ /g keményítő
60 °C, 20 perc	212	-	-	2,3969	9,5875
60 °C, 30 perc	150	-	-	1,1080	4,4322
60 °C, 40 perc	180	-	-	0,6069	2,4279
70 °C, 10 perc	168	-	-	0,8676	3,4703
70 °C, 15 perc	167	0,383	1,533	-	-

Az 5.2-1. táblázat adatai alapján kijelenthető, hogy 60 °C-on, 20-40 perces ideig illetve 70 °C-on, 10 percig tartó előkezelési művelet már nem volt alkalmas az iszap megfelelő kondicionálására, a hidrogéntermelők megfelelő szelektálására a beoltó iszapból, mivel ilyen körülmények között hidrogéntermelést nem, csupán metán és szén-dioxid keletkezést tapasztaltam.

A 70 °C-on 15 percig történő előkezelés volt az egyetlen beállítás, melynek során nem volt mérhető metán mennyiség a rendszerben, vagyis ez alkalmas lehetne termikus előkezelésre. Azonban ahogy látható, az 5.1.5. a statisztikai kiértékelésnél kapott hidrogénhozamok értékétől ez jócskán elmarad (relatív alacsonyabb hidrogén hozam), másrészt annak érdekében, hogy az előkezelés sikerességét minél inkább biztosítsuk nem célszerű ezen határbeállítás mellett dolgozni. Ezek alapján elmondható, hogy optimális előkezelési értéknek a 20 perc tekinthető, mivel bizonytalan lenne a 15 perces előkezelési időt választani. Továbbá, megállapítható az is, hogy az előkezelési hőmérséklet 70 °C-ról 60 °C-ra történő csökkentése már nem hatékony, már nem elegendő a metanogén baktériumok eliminálására. Ezek alapján tehát megerősítést nyert, hogy a 3² kísérleti terv kiértékelése által meghatározott hőmérséklet (70 °C) és kezelési idő (20 perc) értékek valóban a termikus előkezelés optimumának tekinthetők az általam alkalmazott beoltó iszap esetében.

5.3 A hidrogénhozam növelési lehetőségének vizsgálata a keményítő- és élesztőkivonat koncentráció változtatásával

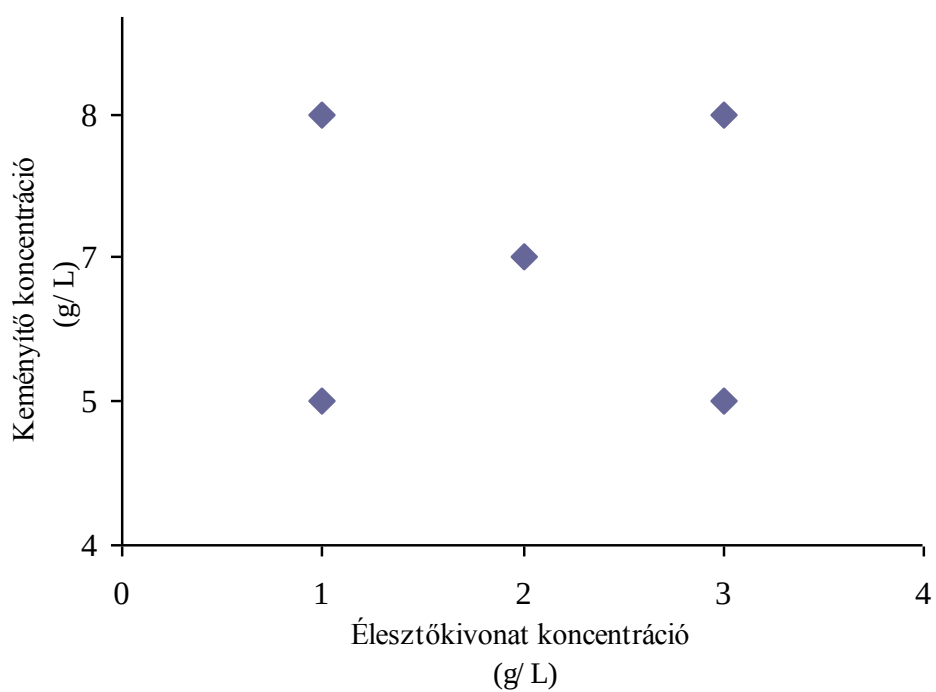
Ezen kísérleteket azon célból végeztem, hogy megvizsgáljam vajon a szubsztrátként használt keményítő-, valamint a kiegészítő nitrogén és nyomelem forrásként alkalmazott élesztőkivonat koncentrációjának változtatásával esetlegesen növelhető-e a hidrogénhozam. Ezen kísérletekben már az optimálisan (70 °C, 20 perc) előkezelt iszapot alkalmaztam inokulumként, s az egyes változók hatásának kimutatására egy 2-szintes, teljes faktoriális kísérleti tervet állítottam össze (5.3-1. táblázat). Ezen típusú kísérleti terv – a termikus előkezelés vizsgálata során alkalmazott 3-szintes tervvel ellentétben – nem alkalmas négyzetes hatások kimutatására, vizsgálatára, azonban a kapott mérési eredmények varianciaanalízissel történő kiértékelésével a szignifikáns hatótényezők és azok hatásának irányai azonosíthatók, vagyis megválaszolható az a kérdés, hogy adott faktor szintértékének változtatása (csökkentése vagy növelése) pozitívan vagy negatívan hat az adott válasz változóra, jelen esetben a hidrogénhozamra. A vonatkozó kísérleteket az 5.3-2. táblázatban és az 5.3-1. ábrán tüntettem fel.

5.3-1. Táblázat A 2^2 kísérleti terv során alkalmazott változók és kódolásuk

Változók	Kódolt értékek		
	-1	0	1
X_1 – Keményítő oldat koncentráció [g/L]	5	6,5	8
X_2 – Élesztőkivonat koncentráció [g/L]	1	2	3

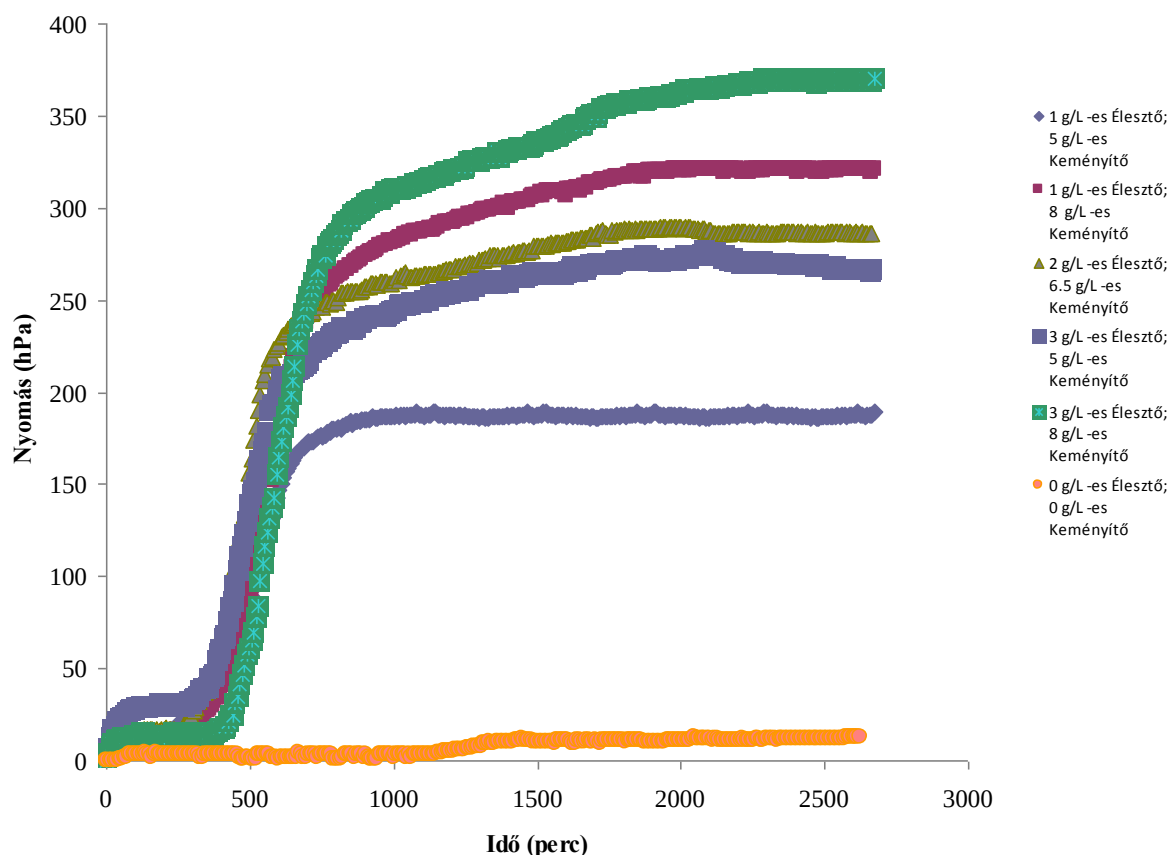
5.3-2. Táblázat A 2^2 kísérleti terv mátrix (az elvégzendő kísérleti beállítások)

Kísérlet száma	Élesztőkivonat konc. [g/L]	Keményítő konc. [g/L]
1	-1	-1
2	-1	1
3	0	0
4	1	-1
5	1	1



5.3-1. ábra A keményítő- és élesztőkivonat hatásának vizsgálatára szolgáló kísérleti terv

A fermentációk időbeli lefutása az 5.3-2. ábrán látható.



5.3-2. ábra A palackokban keletkezett össznyomás

Az 5.3-2. táblázatban megadott mérések mellett, ahogy az 5.3-2. ábrán is látható, elvégeztem egy olyan kísérletet is, melynél sem élesztőkivonatot, sem keményítőt nem adtam a fermentléhez. Ezen kísérletet azon okból végeztem el, mert érdekelt, hogy a szénforrásoktól, valamint a kiegészítő tápanyagoktól mentes beoltó iszapban lévő baktériumok milyen aktivitással rendelkeznek, valamint termelnek-e hidrogént. Ezt a kísérletet az 5.3-2. ábra narancssárga görbéje reprezentálja, s megállapítható, hogy ezen esetben minimális gázképződés történt. Ez arra enged következtetni, hogy megfelelő tápanyagok nélkül nincs baktériumszaporodás és ezzel együtt nem tapasztalható jelentős mennyiségű gázképződés sem.

5.3-3. Táblázat A 2² kísérleti terv során nyert adatok

Kísérleti beállítás	Össznyomás [hPa]	H ₂ /CO ₂ arány	H ₂ [mol]	H ₂ [mmol]	mmol H ₂ /g keményítő
1	187	0,1667	0,000544	0,5441	2,177
2	320	0,2118	0,001183	1,1834	2,959
3	285	0,1948	0,000918	0,9183	2,826
4	270	0,1250	0,000622	0,6220	2,488
5	380	0,2256	0,001496	1,4967	3,742

A 5.3-3. táblázatból jól látszik, hogy a legmagasabb hidrogénhozam, ahhoz a kísérlethez tartozik, melynél maximális koncentrációjú keményítő- és élesztőkivonat oldatot adtam. A legalacsonyabb hidrogénhozam, pedig a legkisebb koncentrációban adott kiegészítő tápanyagokat tartalmazó kísérlethez tartozott. Fontos megjegyezni, hogy ezen kísérleteket a termikus előkezelésre vonatkozó mérésekhez mérten mintegy két héttel később végeztem el. Ezért feltételezhető, hogy az abszolút értékben relatíve alacsonyabb H₂-hozamok elsődleges okának a 4 °C- on tárolt iszapban lévő mikrobakonzorcium aktivitásának csökkenése tekinthető.

Az élesztőkivonat-, valamint keményítő koncentrációjának hatásának statisztikai kiértékelésével kapott szignifikancia értékeket az 5.3-4. táblázat tartalmazza.

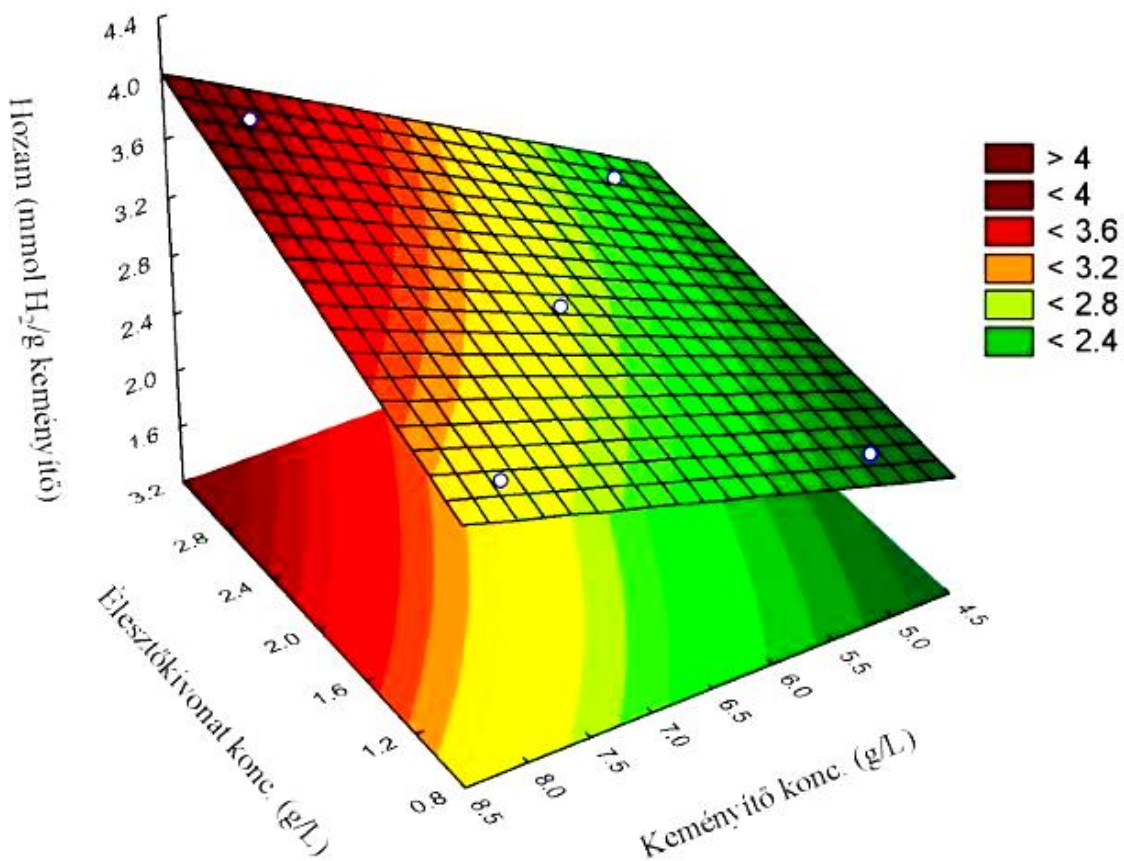
5.3-4. Táblázat Az egyes faktorok hatásai a hidrogénképződésre

Faktor	Szignifikancia szint (α)
Élesztőkivonat koncentráció	0,0163
Keményítő koncentráció	0,0087
Élesztőkivonat x Keményítő	0,0377

A statisztikai kiértékelés eredményeként elmondható, hogy mindkét változó az élesztőkivonat-, és a keményítőoldat koncentrációja is, valamint a két tényező kereszthatása is szignifikánsan ($\alpha < 0,05$) hatnak a rendszerre. Ennek grafikus interpretálása az 5.3-3. ábrán látható, amely felület az alábbi modell alapján készült:

$$y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + Y_0$$

ahol y a válaszváltozó (H_2 hozam); X_1 és X_2 a független változók (élesztőkivonat- és keményítő koncentráció) lineáris hatásai; X_1X_2 a független változók kölcsönhatása; b_1 és b_2 lineáris, míg b_{12} kölcsönhatás együttható; Y_0 pedig az ordináta metszet.



5.3-3. ábra Az élesztőkivonat- és keményítő koncentráció hatása a H_2 -hozamra

Az 5.3-3. ábrán együtt látható a keményítő- és az élesztőkivonat koncentráció hatása a hidrogénhozamra, s megállapítható, hogy a magasabb koncentrációk szignifikánsan pozitívabb hatással vannak a hozam értékére, így ezen faktorok optimalizálásán keresztül a biohidrogén fermentáció hatékonysága jelentősen javítható.

6. Összefoglalás

Munkám során a Pálhalmi Agrospeciál Mezőgazdasági Termelő, Értékesítő és Szolgáltató Kft. anaerob rothasztójából származó iszap termikus előkezelését-, az előkezelést befolyásoló faktorokat, valamint azok hidrogénhozamra gyakorolt hatását vizsgáltam.

Az elvégzett kísérletek eredménye alapján elmondható, hogy a 70 °C-on végzett, 20 percig tartó termikus előkezelési módszer optimális a hidrogéntermelés szempontjából káros metanogén baktériumok eliminálására, s maximális hidrogénhozam elérésére.

Az előkezelési optimum validálása érdekében a hőmérsékleti és előkezelési idő skálán kiterjesztett vizsgálatokat is végeztem, s ezen kísérleti eredmények megerősítették a termikus előkezelés optimumára vonatkozó eredményeket.

További kísérletekkel – az optimálisan előkezelt beoltó iszap alkalmazásával – kimutattam, hogy a fermentlé összetételében meghatározó szerepet játszó keményítő- és élesztőkivonat koncentráció változtatásával az elérhető hidrogénhozam értéke jelentősen növelhető, vagyis ez egy potenciális lehetőség a biohidrogén termelés hatékonyságának fokozására.

7. Irodalomjegyzék

- Argun H, Kargi F, Kapdan IK, Oztekin R. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:1813–9.
- Das D, TN Veziroglu. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hydrogen Energy* 2001;26:13-28.
- Eroglu E, A Melis. Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art, *Bioresour Technol* 2011;102:8403-13.
- Fang HHP and Liu H (2002) Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technol* 82:87–93.
- Hallenbeck PC, Benemann JR. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1185-93
- Hallenbeck PC, D Ghosh, MT Skonieczny, V Yargeau. Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production. *Indian J Microbiol* 2009;49:48-59.
- Hallenbeck PC. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34:7379-89.
- Hawkes F, R Dinsdale, DL Hawkes, I Hussy. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1339-47.
- Kemény S, A Deák. Kísérletek tervezése és értékelése; Műszaki Könyvkiadó; 2000
- Manish S, R Banerjee. Comparison of biohydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33:279-86.
- Lee DJ, KY Show, A Su. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. *Bioresource Technology* 102 (2011) 8393-402.
- Levin DB, Islam R, Cicek N and Sparling R (2006) Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Int J Hydrogen Energy* 31:1496-503.
- Li CL, Fang HHP. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Env Sci Technol* 2007;37:1-39.
- Lin CY, Lay CH. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy* 2004;29:41–5.

- Márkus L. Kísérlettervezés – Az ipari kísérlettervezés statisztikai módszerei. <http://www.math.elte.hu/probability/markus/index.m.html> (2012.02.10.)
- Mathews J, G Wang. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34:7404-16.
- O-Thong S, Prasertsan P, Intrasungkha N, Dhamwichukorn S, Birkeland NK. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:1221–31.
- Wang J, W Wan. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34:799-811.
- Weuster-Botz D. Experimental Design for Fermentation Media Development: Statistical Design or Global Random Search?. *J Biosci Bioeng* 2000;90:473-83.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Bélafiné Dr. Bakó Katalinnak, hogy lehetőséget biztosított számomra a szakdolgozatom elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom továbbá a Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet munkatársainak, hogy helyet biztosítottak számomra kísérleteim megvalósításához.

Külön köszönet jár témavezetőimnek, Bakonyi Péternek és Dr. Nemestóthy Nándornak, akik folyamatosan figyelemmel kísérték munkám és szaktudásukkal segítették az egyes kísérletek elvégzését.

Köszönettel tartozom a Pálhalmi Agrospeciál Mezőgazdasági Termelő, Értékesítő és Szolgáltató Kft- nek, hogy biztosították számomra a kísérletek alapjául szolgáló-, a mikrobakonzorciumot tartalmazó beoltó iszapot.

Külön kiemelném, és ismét köszönetet mondanék témavezetőmnek, Bakonyi Péternek. Szeretném megköszönni áldozatos munkáját, szakmai tudását, mellyel hozzásegített szakdolgozatom elkészítéséhez, valamint szakmai fejlődésemhez. Szeretném megköszönni támogatását, oktatását, valamint építő jellegű kritikáit, melyekkel mikor szükséges volt bírált is.

Továbbá köszönetet mondanék a Családomnak és a Barátaimnak, akik munkám során mindvégig mellettem álltak és támogattak.

8. Mellékletek



Clarity - Chromatography SW

University of Pannonia, BME

www.uni-pannon.hu



Calibration : biohidrogen20120920
 Description :
 Created : 2012.09.20. 10:43:23

By : bme admin
 Modified : 2012.11.21. 15:03:55

Calculation : ESTD
 Calibrate : Automatic
 Change Response : Enable
 Update Reten. Time : Enable
 Default Injected Volume : Not Used

Mode : Calibrate
 Recalibration Type : Average
 Weight : 0,25
 Search Criteria : 0,00%

Calibration Summary Table (ESTD - biohidrogen20120920 - Signal 1)

Used	Compound Name	Reten.Time	Left Window	Right Window	Peak Type	Peak Color	LOD	LOQ	R B	Resp. Factor
☒	hidrogen	0,937	0,200	0,200	Ordnr		0,000	0,000	A	0,0000
☒	oxigen	1,270	0,200	0,200	Ordnr		0,000	0,000	A	0,0000
☒	nitrogen	1,503	0,200	0,200	Ordnr		0,000	0,000	A	0,0000
☒	metán	2,703	0,200	0,200	Ordnr		0,000	0,000	A	0,0000

hydrogen - Signal 1 - 0,937 min.

Peak Type : Ordnr

Left Window : 0,2 min

Right Window : 0,2 min

Response Base : Area

Curve Fit Type : Linear

Zero Type : Curve from Zero

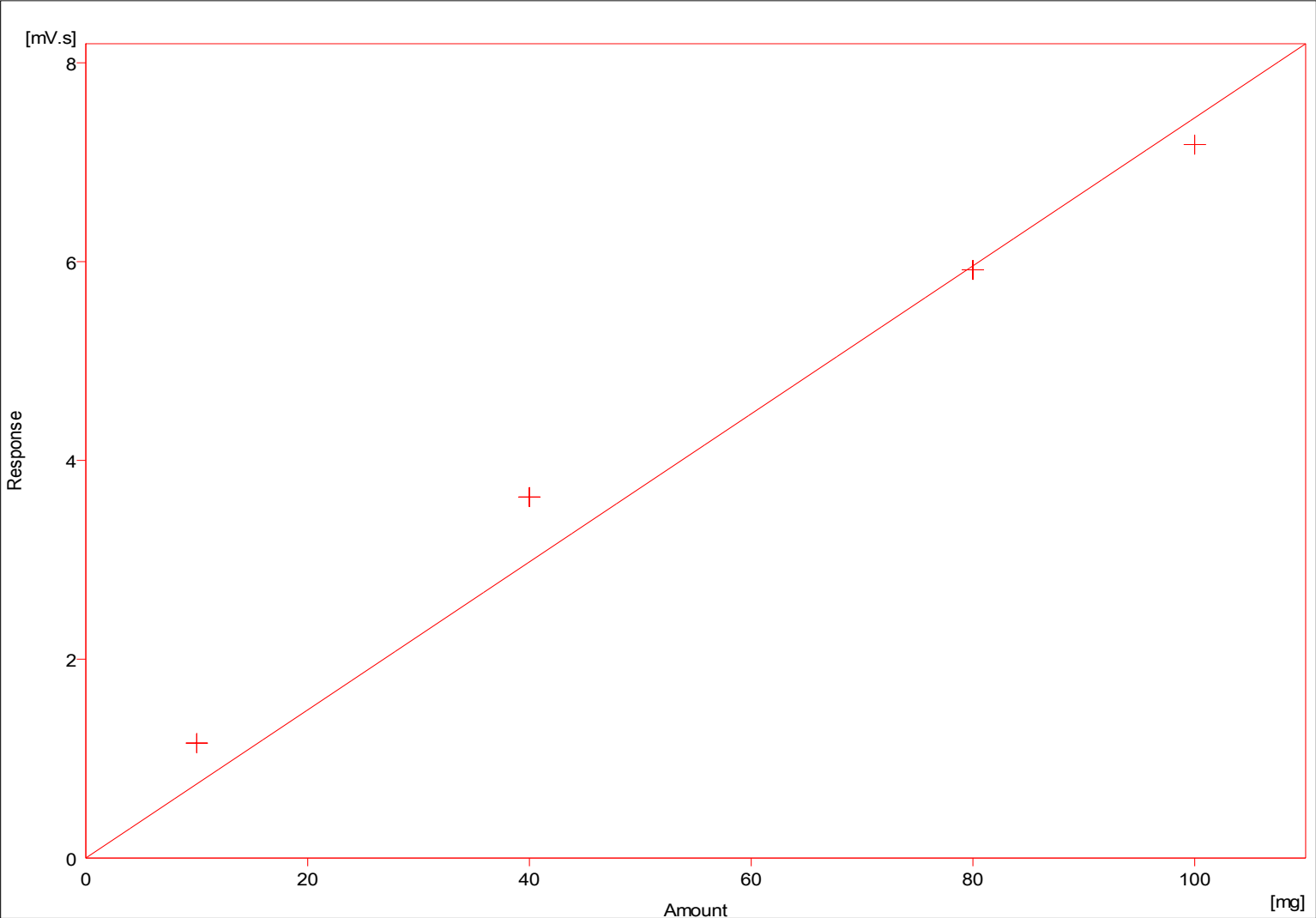
Weighting Method : None

Subst. Equation : $Y = 0,07447 \cdot X$

Correlation Coef. : 0,9956113

Residuum : 0,36558 [mV.s]

	Response	Amount	Resp. Factor	Rec No.	Used
1	1,1550	10,0000	8,6580	1	☒
2	3,6310	40,0000	11,0162	1	☒
3	5,9170	80,0000	13,5204	1	☒
4	7,1770	100,0000	13,9334	1	☒
5	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
6	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
7	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
8	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
9	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
10	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
11	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
12	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
13	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
14	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
15	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
16	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
17	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
18	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
19	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
20	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
BL	0,0000	Blank	0,0000	1	☒



oxygen - Signal 1 - 1,27 min.

Peak Type : Ordnr

Left Window : 0,2 min

Right Window : 0,2 min

Response Base : Area

Curve Fit Type : Linear

Zero Type : Curve from Zero

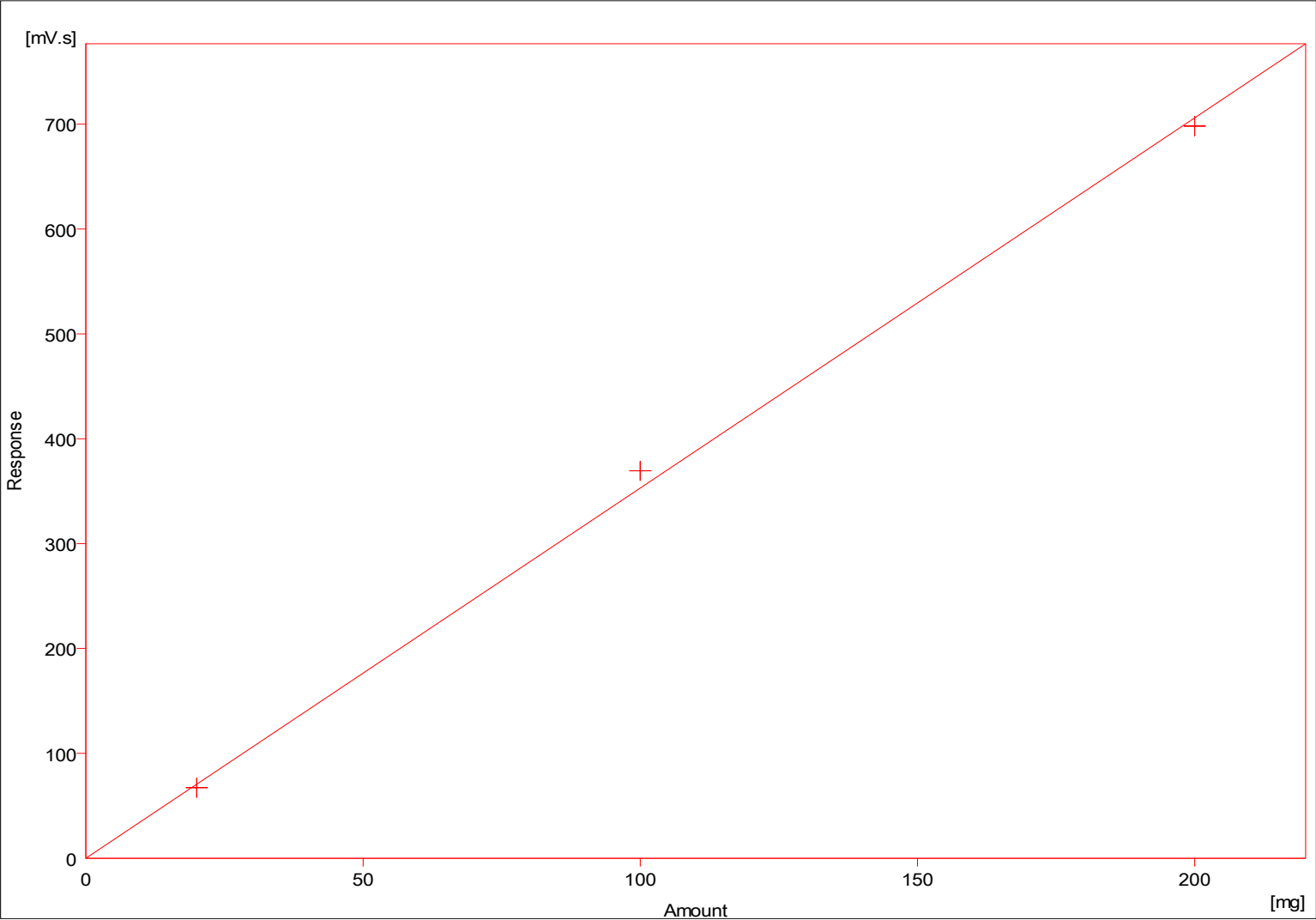
Weighting Method : None

Subst. Equation : $Y = 3,53011 \cdot X$

Correlation Coef. : 0,9992925

Residuum : 9,25208 [mV.s]

	Response	Amount	Resp. Factor	Rec No.	Used
1	67,2180	20,0000	0,2975	1	☒
2	369,4160	100,0000	0,2707	1	☒
3	698,1590	200,0000	0,2865	1	☒
4	1282,3510	0,0000	0,0000	1	☒
5	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
6	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
7	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
8	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
9	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
10	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
11	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
12	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
13	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
14	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
15	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
16	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
17	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
18	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
19	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
20	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
BL	0,0000	Blank	0,0000	1	☒



nitrogen - Signal 1 - 1,503 min.

Peak Type : Ordnr

Left Window : 0,2 min

Right Window : 0,2 min

Response Base : Area

Curve Fit Type : Linear

Zero Type : Curve from Zero

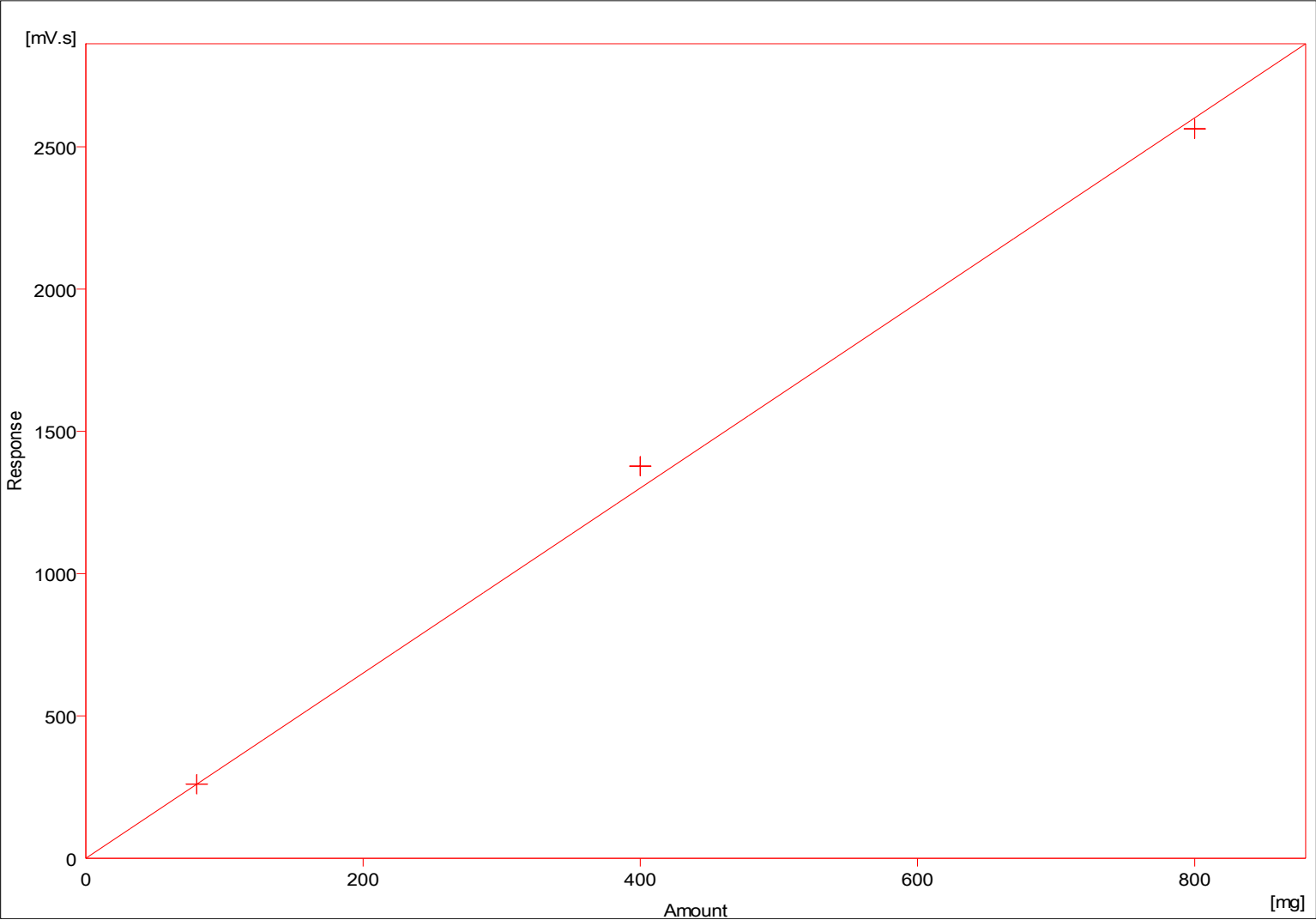
Weighting Method : None

Subst. Equation : $Y = 3,25214 \cdot X$

Correlation Coef. : 0,9989845

Residuum : 42,97774 [mV.s]

	Response	Amount	Resp. Factor	Rec No.	Used
1	260,0180	80,0000	0,3077	1	☒
2	1377,7430	400,0000	0,2903	1	☒
3	2563,2840	800,0000	0,3121	1	☒
4	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
5	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
6	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
7	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
8	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
9	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
10	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
11	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
12	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
13	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
14	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
15	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
16	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
17	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
18	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
19	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
20	0,0000	0,0000	0,0000	1	☒
BL	0,0000	Blank	0,0000	1	☒



metán - Signal 1 - 2,703 min.

Peak Type : Ordnr

Left Window : 0,2 min

Right Window : 0,2 min

Response Base : Area

Curve Fit Type : Linear

Zero Type : Curve from Zero

Weighting Method : None

Subst. Equation : $Y = 0,33369 \cdot X$

Correlation Coef. : 0,9991462

Residuum : 5,42549 [mV.s]

	Response	Amount	Resp. Factor	Rec No.	Used
1	40,0000	142,2090	3,5552	1	☒
2	80,0000	258,8680	3,2359	1	☒
3	200,0000	585,4760	2,9274	1	☒
4	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
5	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
6	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
7	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
8	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
9	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
10	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
11	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
12	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
13	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
14	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
15	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
16	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
17	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
18	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
19	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
20	0,0000	0,0000	0,0000	0	☒
BL	0,0000	Blank	0,0000	0	☒

