POLITECHNIKA POZNAŃSKA

Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki

Instytut Inżynierii Środowiska i Instalacji Budowlanych

Zakład Zaopatrzenia w Wodę i Biogospodarki

Biologiczna produkcja kwasu kapronowego w procesach opartych o mikrobiomy

Autoreferat rozprawy doktorskiej

mgr inż. Anna Duber

Promotor: Prof. dr hab inż. Piotr Oleśkowicz-Popiel

POZNAŃ 2022

Spis treści

Przedmowa 4
Lista publikacji stanowiąca podstawę rozprawy doktorskiej 5
Publikacje naukowe oraz wniosek patentowy, które są istotne dla tematu rozprawy, ale nie są jej częścią 7
Wprowadzenie 8
Cel pracy 11
Materiały i metody 12
Wyniki 14
Wnioski 16
Literatura 19
Osiągnięcia naukowe 21

Przedmowa

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana na Wydziale Inżynierii Środowiska i Energetyki, w Instytucie Inżynierii Środowiska i Instalacji Budowlanych Politechniki Poznańskiej, gdzie prace badawcze trwały od września 2015 do grudnia 2020 pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Piotra Oleśkowicza-Popiela. Badania opisane w niniejszej pracy zostały przeprowadzone i są częścią dwóch projektów naukowych:

- projekt CaproBiome finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu LIDER V, nr kontraktu: LIDER/013/261/L-5/13/NCBR/2014 (PI: Piotr Oleśkowicz-Popiel)

- projekt „Wpływ bioaugmentacji na formowanie średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz mikrobiomu bakteryjnego w procesach fermentacji kultur mieszanych" finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, przyznany w ramach konkursu Preludium 13 dla młodych naukowców, nr kontraktu: 2017/25/N/ST8/01795 (PI: Anna Duber)

Zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce tekst jednolity Dz. U. 2021 poz. 478 Art. 187, ust. 3. „Rozprawę doktorską może stanowić praca pisemna, w tym monografia naukowa, zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, praca projektowa, konstrukcyjna, technologiczna, wdrożeniowa lub artystyczna, a także samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej."

Lista publikacji stanowiąca podstawę rozprawy doktorskiej

Zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce tekst jednolity Dz. U. 2021 poz. 478 Art. 187, ust. 3. „Rozprawę doktorską może stanowić praca pisemna, w tym monografia naukowa, zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, praca projektowa, konstrukcyjna, technologiczna, wdrożeniowa lub artystyczna, a także samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej.” Niniejsza dysertacja składa się z dwóch części. Część pierwsza stanowi wprowadzenie przedstawiające kontekst, główne cele pracy, przedstawienie tematu fermentacji z użyciem kulturach otwartych do produkcji kwasu kapronowego, wnioski. Część druga składa się z następujących publikacji, które są podstawą niniejszej rozprawy:

Publikacja I: Duber, A., Jaroszynski, L., Zagrodnik, R., Chwialkowska, J., Juzwa, W., Ciesielski, S., Oleskowicz-Popiel, P., 2018. Exploiting the real wastewater potential for resource recovery – n-caproate production from acid whey, Green Chemistry 20, 3790–3803. https://doi.org/10.1039/C8GC01759j

Impact Factor 9.405, 45 pkt. MNiSW, udział: 60%.

Anna Duber planowała i prowadziła badania, wykonała analizy chromatograficzne i mikrobiologiczne, interpretowała wyniki i napisała manuskrypt

Publikacja II: Duber, A., Zagrodnik, R., Chwialkowska, J., Juzwa, Oleskowicz-Popiel, P., 2020. Evaluation of the feed composition for an effective medium chain carboxylic acid production in an open culture fermentation, Science of The Total Environment 728, 138814. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138814

Impact Factor 7.963, 200 pkt. MNiSW, udział: 70%.

Anna Duber planowała i prowadziła badania, wykonała analizy chromatograficzne i mikrobiologiczne, interpretowała wyniki i napisała manuskrypt.

Publikacja III: Duber, A., Zagrodnik, R., Gutowska N., Łężyk M., Oleskowicz-Popiel, P. 2022. Lactate and Ethanol Chain Elongation in the Presence of Lactose: Insight into Product Selectivity and Microbiome Composition. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 10, 3407−3416

https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05869

Impact Factor 8.198, 140 pkt. MNiSW, udział: 75%.

Anna Duber zainicjowała i kierowała planowaniem badań, prowadziła badania, wykonywała analizy chromatograficzne i mikrobiologiczne, interpretowała wyniki i napisała manuskrypt.

Publikacje naukowe oraz wniosek patentowy, które są istotne dla tematu rozprawy, ale nie są jej częścią

Publikacja IV: Jankowska, E., Duber, A., Chwialkowska, J., Stodolny, M., Oleskowicz-Popiel, P., 2018. Conversion of organic waste into volatile fatty acids – The influence of process operating parameters, Chemical Engineering Journal, 345, 395–403.
https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.180

Publikacja V: Chwialkowska, J., Duber, A., Zagrodnik, R., Walkiewicz, F., Lezyk, M., Oleskowicz-Popiel, P., 2019. Caproic acid production from acid whey via open culture fermentation – Evaluation of the role of electron donors and downstream processing, Bioresource Technology, 279, 74–83.
https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.086

Publikacja VI: Zagrodnik, R., Duber, A., Lezyk, M., Oleskowicz-Popiel, P., 2020. Enrichment Versus Bioaugmentation – Microbiological production of caproate from mixed carbon sources by mixed bacterial culture and *Clostridium kluyveri*, Environmental Science & Technology, 54, 9, 5864-5873.
https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07651

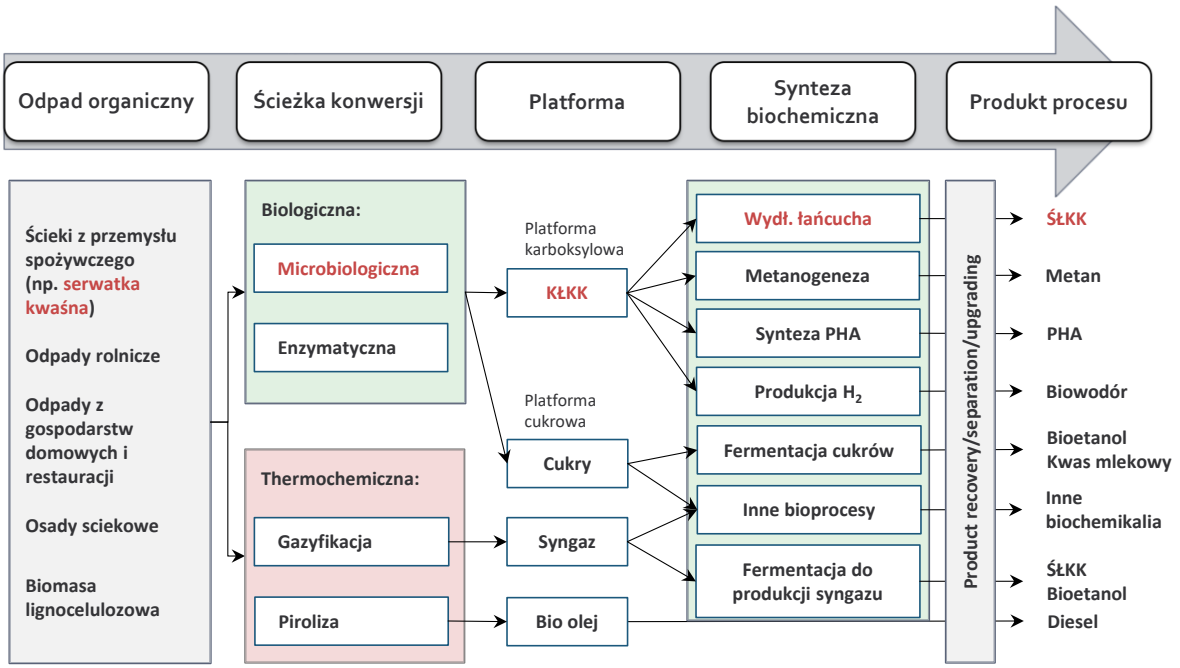
Publikacja VII: Brodowski, F., Duber, A., Zagrodnik, R., Oleskowicz-Popiel, P., 2020. Co-production of hydrogen and caproate for an effective bioprocessing of waste, Bioresource Technology, 318, 123895.
https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123895

Wniosek patentowy (European Patent Office): Oleśkowicz-Popiel P., Zagrodnik R., Duber A., Method for one-pot co-production of caproic acid and hydrogen, data złożenia: 15.07.2018, Application number: 18183574.5.
https://data.epo.org/publication-server/document?iDocId=6112860&iFormat=2

Wprowadzenie

Szybki wzrost populacji na świecie i rosnące zapotrzebowanie na energię wymagają nowatorskich rozwiązań biogospodarczych dla zrównoważonego rozwoju przyszłego świata. Rozwijająca się urbanizacja prowadzi do wyczerpywania się zasobów naturalnych, a także do wytwarzania znacznej ilości bioodpadów (Venkata Mohan et al., 2016). Aktualne podejście gospodarcze nadal odwołuje się do liniowego modelu „weź, wyprodukuj, użyj, wyrzuć" i opiera się na wykorzystaniu konwencjonalnych źródeł energii, takich jak paliwa kopalne, do produkcji chemikaliów i energii. Niesie to ze sobą negatywne konsekwencje, ponieważ rafinerie petrochemiczne i produkty kopalne mają poważny wpływ na środowisko naturalne, co powoduje zanieczyszczenie i szkody, a ogromna ilość odpadów organicznych jest po prostu składowana lub wprowadzana do środowiska w inny sposób. Pojawiającą się alternatywą jest koncepcja biogospodarki. W koncepcji biogospodarki wykorzystywanie zasobów kopalnych do produkcji chemikaliów i energii jest zastępowane przez zasoby odnawialne. Zastosowanie ww. koncepcji umożliwia przejście od modelu gospodarki liniowej do gospodarki o obiegu zamkniętym, w której priorytetem jest zapobieganie, ponowne użycie i recykling w cyklu gospodarowania odpadami (European Commission, 2017; Lago et al., 2019). W takim podejściu odpady stają się więc zasobem, który może zostać poddany waloryzacji do wartościowych produktów (Scarlat and Dallemand, 2019). Odzysk surowców o wartości dodanej można osiągnąć poprzez tworzenie biorafinerii (Scoma et al., 2016). Pojęcie biorafinerii odnosi się do zastąpienia wytwarzania produktów z tradycyjnych rafinerii petrochemicznych produktami opartymi na węglu (np. chemikaliami, paliwami ciekłymi, biomateriałami itp.) wytwarzanymi z bioodpadów przy użyciu różnych zintegrowanych technologii (Fava et al., 2015; Venkata Mohan et al., 2016).

Dużą frakcję odpadów stanowią odpady organiczne. Odpady organiczne mogą zostać przetworzone za pomocą metod termochemicznych i/lub biologicznych (**Rys. 1.**). Konwersja termochemiczna, m.in. piroliza (do produkcji biooleju) lub gazyfikacja (gdzie bioodpady są najpierw podlegają konwersji do gazu syntezowego, a następnie są katalitycznie przekształcane w paliwa), są odpowiednie do przetwarzania biomasy suchej, podczas gdy preferowaną ścieżką przetwarzania biomasa mokrej jest konwersja biologiczna, ponieważ zawarta w nich woda jest wymagana do procesów biochemicznych.



Rysunek 1. Schemat graficzny możliwych dróg konwersji odpadów organicznych. Czcionka w kolorze czerwonym wskazuje na ścieżkę konwersji odpadu organicznego (serwatki kwaśnej) wykorzystanej w niniejszej rozprawie. KŁKK – krótkołańcuchowe kwasy karboksylowe, ŚŁKK – średniołańcuchowe kwasy karboksylowe, PHA – polihydroksyalkaniany.

Konwersja biologiczna opiera się na procesach mikrobiologicznych takich jak fermentacja kultur otwartych, w której złożony surowiec organiczny przechodzi kaskadę szlaków biochemicznych napędzanych przez mikroorganizmy (tzw. mikrobiom reaktorowy) w celu wytworzenia produktu końcowego (Tamis et al., 2015; Coma et al., 2017). Główną zaletą fermentacji kultur otwartych jest możliwość prowadzenia procesu w warunkach niesterylnych. Ponadto, poprzez odpowiednią kontrolę warunków operacyjnych (temperatura, pH, czas retencji hydraulicznej itp.) możliwe jest sterowanie bioprocesem w taki sposób, aby stworzyć korzystne warunki środowiskowe dla rozwoju mikrobiomu, dzięki czemu można zapobiec rozpraszaniu strumienia węgla na konkurencyjne szlaki metaboliczne i osiągnąć wysokie tempo produkcji preferowanego metabolitu (Hoelzle et al., 2014; Kleerebezem et al., 2015; Angenent et al., 2016; Cavalcante et al., 2017; Regueira et al., 2020). Jednym z obiecujących kierunków prowadzenia konwersji biologicznej jest proces fermentacji z udziałem mikroorganizmów beztlenowych, gdzie biomasa organiczna podlega najpierw procesowi hydrolizy, a następnie produkowane są krótkołańcuchowe kwasy karboksylowe (KŁKK), które stanowią tzw. platformę karboksylową (Agler et al., 2011). KŁKK występują w formie zdysocjowanej lub niezdysocjowanej i są to m.in. kwas octowy, propionowy, masłowy, mlekowy. Wytworzone KŁKK mają raczej niską wartość ekonomiczną (Kleerebezem et al.,

2015), stanowią one jednak pośrednią platformę chemiczną do wytwarzania produktów końcowych o wyższej wartości (Agler et al., 2011) i obejmują między innymi polihydroksyalkaniany do produkcji biodegradowalnego bioplastiku (Kleerebezem i van Loosdrecht, 2007), biowodór (Singhania et al., 2013; Yang and Wang, 2018), biogaz (Bong et al., 2018), czy średniołańcuchowe kwasy karboksylowe (ŚŁKK) (Spirito et al., 2014).

Tematem niniejszej rozprawy jest produkcja kwasu kapronowego. Kwas kapronowy (kwas heksanowy) należy do ŚŁKK, jest prostołańcuchowym, nasyconym kwasem tłuszczowym z jedną grupą karboksylową. Jest to komercyjnie atrakcyjna substancja chemiczna do zastosowań przemysłowych i rolniczych (Cavalcante et al., 2017). Może być stosowany jako środek przeciwdrobnoustrojowy, dodatek do pasz, stymulator wzrostu roślin lub jako prekursor do wytwarzania produktów, w tym farmaceutyków, zapachów kosmetycznych, smarów, gum, dodatków do farb i barwników itp.(Angenent et al., 2016; Chen et al., 2017). Inne badania donoszą możliwość wykorzystania kwasu kapronowego jako prekursora do produkcji biodiesla i paliwa do silników odrzutowych, ze względu na jego stosunkowo wysoką wartość kaloryczną (Harvey and Meylemans, 2014; Andersen et al., 2015; Layton and Trinh, 2016). Pomimo szerokiego wachlarza możliwych zastosowań, kwas kapronowy jest obecnie otrzymywany w bardzo małych ilościach. Jest pozyskiwany z olejów roślinnych pochodzących z upraw spożywczych, z oleju kokosowego, czy oleju z ziaren palmowych, gdzie jego zawartość jest niższa niż 1% (Chen et al., 2017).

Cel pracy

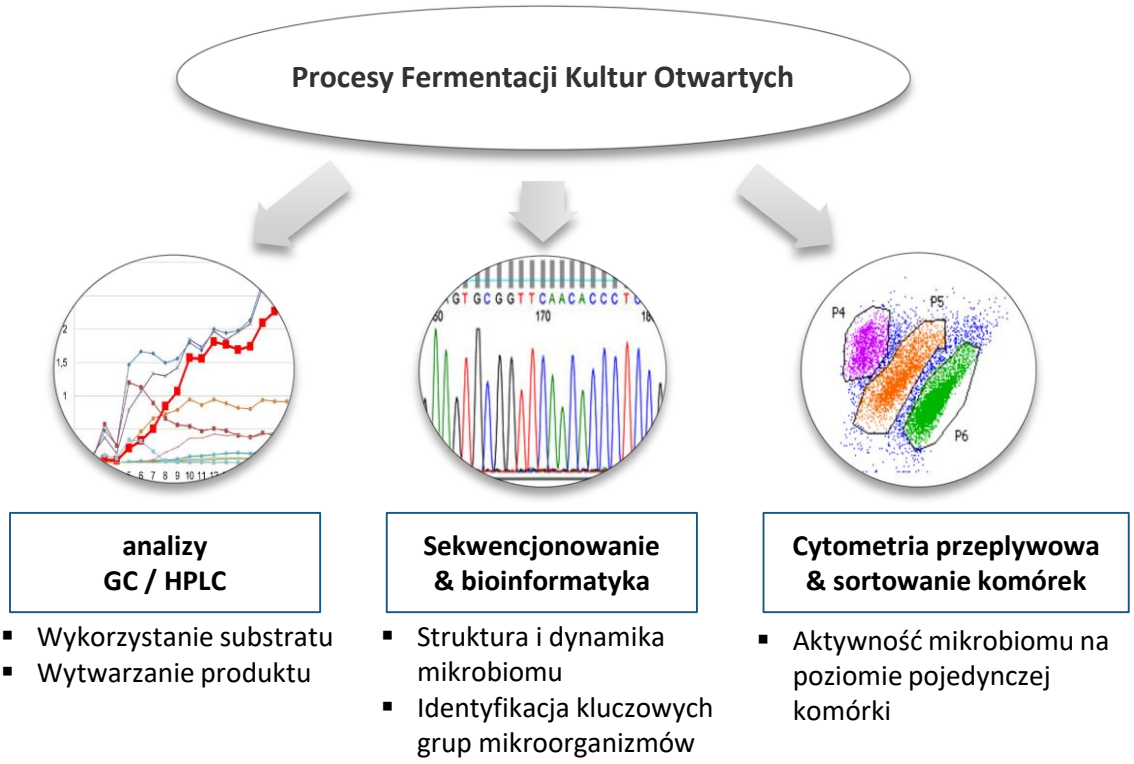
Głównym celem pracy było **opracowanie biologicznego procesu produkcji kwasu kapronowego za pomocą mikrobiomu z odpadów organicznych, tj. serwatki kwaśnej.** Dla osiągnięcia celów zostało zaprojektowane stanowisko badawcze i przeprowadzono dwa długoterminowe procesy fermentacji kultur mieszanych w trybie ciągłym z wykorzystaniem serwatki kwaśnej jako substratu (**Publikacja I, Publikacja II**), oraz procesy okresowe z użyciem pożywki syntetycznej (**Publikacja III**).

Cele szczegółowe procesu były następujące:

- wykazanie możliwości długoterminowej produkcji kwasu kapronowego w jednostopniowym procesie fermentacji kultur mieszanych (jeden reaktor) z rzeczywistego odpadu organicznego – serwatki kwaśnej (**Publikacja I**)
- zbadaniu wpływu parametrów operacyjnych na przebieg procesu (pH, temperatura, czas retencji hydraulicznej, toksyczność produktu) wpływających na produkcję kwasu kapronowego z serwatki kwaśnej dla efektywnej kontroli procesu (**Publikacja I**)
- zbadanie i wyjaśnienie wpływu składu substratu na wydłużenie łańcucha węglowego i produkcję średniołańcuchowych kwasów karboksylowych, w szczególności zbadanie czy obecność dodatkowej zawartości etanolu może zwiększyć wydajność procesu (**Publikacja II**), oraz zbadanie wpływu różnych stężeń laktozy w obecności donorów elektronów (mleczanu, etanolu lub obu) na selektywność procesu i wydajność konwersji (**Publikacja III**)
- identyfikacja możliwych szlaków metabolicznych w procesie fermentacji (**Publikacja I**, **Publikacja II**, **Publikacja III**)
- scharakteryzowanie zbiorowiska drobnoustrojów pod kątem jego struktury, dynamiki i aktywności w procesach ciągłych (**Publikacja I**, **Publikacja II**) oraz zbadanie zmienności mikrobiomu i wzbogacenia grup funkcyjnych odpowiedzialnych za powstawanie określonego produktu przy zastosowaniu różnych kombinacji składu substratów (**Publikacja III**)
- identyfikacja kluczowych grup drobnoustrojów odpowiedzialnych za produkcję kwasu kapronowego (**Publikacja I**, **Publikacja II**).

Materiały i metody

Badania prowadzono w skali laboratoryjnej. Przeprowadzono procesy fermentacji kultur otwartych to zarówno w trybie ciągłym, jak i w trybie okresowym. Do kontroli i analizy przebiegu procesów zastosowano zaawansowane metody analityczne oraz najnowocześniejsze narzędzia biologii molekularnej. Metody analityczne, takie jak chromatografia gazowa oraz wysokosprawna chromatografia cieczowa, realizowane na każdym etapie badań umożliwiły ocenę konwersji substratu i tworzenia produktu w procesach fermentacji beztlenowej kultury otwartej. Do analizy mikrobiologicznej wykorzystano technologie wysokoprzepustowe, takich jak sekwencjonowanie metagenomiczne oraz cytometria przepływowa połączona z sortowaniem komórek. W pierwszej metodzie wykorzystano metasekwencjonowanie amplikonu fragmentu genu 16S rRNA, co umożliwiło scharakteryzowanie mikrobiomu, w tym ocenę struktury i dynamiki drobnoustrojów oraz identyfikację kluczowych grup drobnoustrojów na różnych etapach procesów. Wykorzystanie cytometrii przeplywowej umożliwiła ocenę aktywności mikrobiomu na poziomie pojedynczej komórki. Graficzną prezentację zastosowanej metodyki przedstawiono na **Rys. 2.**



Rysunek 2. Schemat graficzny metodyki zastosowanej w badaniach.

Procesy fermentacji w trybie ciągłym były prowadzone w reaktorze UASB gdzie substratem była serwatka kwaśna, były to procesy długoterminowe, pierwszy trwał 410 dni (Duber et al., 2018), drugi 129 dni (Duber et al., 2020). Badania okresowe były prowadzone na pożywce syntetycznej w butelkach iniekcyjnych (Duber et al., 2022). Szczegółowe przedstawienie konfiguracji procesów oraz wykorzystanej metodyki badań dla każdego procesu jest opisane w rozprawie doktorskiej w rozdziale 3.

Wyniki

Wykonane badania wykorzystały potencjał mikroorganizmów do prowadzenia procesów fermentacji, w tym przypadku tzw. fermentację kultur otwartych. W celu wykonania badań na każdym etapie prac opierano się na wnikliwym przeglądzie literatury dotyczącej produkcji kwasu kapronowego w procesach fermentacji, co zostało przedstawione w rozdziale 4. Na bazie zdobytej wiedzy podejmowano strategię prowadzenia procesów fermentacji, co zostało opisane w kolejnym rozdziale (Rozdział 5.). Główną strategią, było prowadzenie procesu w taki sposób, aby uzyskać wysoką produktywność kwasu kapronowego poprzez uniknięcie konkurencyjnych szlaków metabolicznych (metanogenezy, szlaków fermentacyjnych wytwarzających propionian, takich jak szlak akrylanowy i inne) (Wu et al., 2019), co zostało obszernie opisane w Rozdziale 5.1 (5.1.1-5.1.3). W rozdziale 5.2 scharakteryzowano kluczowe parametry operacyjne procesu, takie jak temperatura, pH i czas retencji hydraulicznej (HRT). Kolejny istotny aspekt dotyczył toksyczności produktu (Rozdział 5.3), co skutkowało zahamowaniem procesu. Następnie opisano wpływ substratu pod względem składu (Rozdział 5.4), w szczególności zbadano wpływ dodatku etanolu jako zewnętrznego donora elektronów na przebieg procesu oraz zawartość laktozy na selektywność procesu i wydajność konwersji. W Rozdziale 6 opisano wyniki analizy mikrobiologicznej, gdzie kluczowym elementem było scharakteryzowanie mikrobiomu.

Wpływ parametrów operacyjnych oraz toksyczność produktu. Rozważając parametry operacyjne procesu, wyniki wykazały, że w procesach bioreaktorowych ciągłych poziom pH 5.5 był wystarczająco niski, żeby skutecznie hamować metanogenezę – główny konkurencyjny szlak metaboliczny w fermentacji kultur otwartych. Ponadto wykazano, że stopniowe skracanie HRT z 20 do 2.5 dnia przyczyniło się do wypłukania większości metanogenów z reaktora i wyraźnie poprawiło tempo wytwarzania kwasu kapronowego. Zaprojektowany system umożliwił produkcję kwasu kapronowego gdzie najwyższa średnia szybkość produkcji wyniosła 134.3 ± 30.9 mmol C/L/dobę (0.11 g/L/h), mediana 146.1 mmol C/L/dzień, a specyficzność od 58% do 83% (mediana 79%). Niemniej jednak wysokie stężenie kwasu kapronowego w bioreaktorze (do 8.5 g/L) było czynnikiem limitującym ze względu na toksyczność produktu i powodowało zahamowanie procesu pomimo dostępności substratów.

Wpływ składu substratu. Produkcja kwasu kapronowego w oparciu o wydłużanie łańcucha opiera się na dwóch kluczowych donorach elektronów potrzebnych w procesie, tj. etanolu lub

mleczanie. W niniejszej pracy powstawanie kwasu kapronowego zależało głównie od wydłużenia łańcucha węglowego z mleczanu, pomimo wytwarzania etanolu w reaktorze lub jego zewnętrznego dostarczania do układu wraz z substratem. Niemniej jednak pewna produkcja etanolu w reaktorze wydawała się istotna dla procesu, ponieważ zbiegła się z produkcją kwasu kapronowego, a obniżone stężenie etanolu zbiegało się z zaburzeniem produkcji kwasu kapronowego. Dozowanie serwatki kwaśnej z rosnącą szybkością dozowania etanolu prowadziło do utleniania etanolu z wytworzeniem octanu i maślanu oraz wodorotroficznym tworzeniem się metanu. Zmiana składu substratu (większa zawartość mleczanów i laktozy oraz brak etanolu) spowodowała gwałtowny spadek tworzenia krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych i przyspieszyła produkcję średniołańcuchowych kwasów karboksylowych z kwasem kapronowym jako głównym produktem. Procesy okresowe wykazały, że obecność laktozy, może zmienić kierunek wykorzystania źródła węgla i wpłynąć na selektywność produktu końcowego poprzez dostarczenie dodatkowych związków pośrednich dla reakcji biochemicznych.

Analiza mikrobiologiczna. Analiza mikrobiomu reaktorowego wykazała, że funkcjonalne wzbogacenie specyficznego mikrobiomu zdolnego do tworzenia kwasu kapronowego jest możliwe poprzez odpowiednią kontrolę parametrów operacyjnych procesu, tj. pH i HRT. Co więcej, wyniki wykazały silną zależność bioróżnorodności i struktury populacji drobnoustrojów od składu substratu. W prowadzonych procesach wykazano dominację rodzin Coriobacteriaceae, Ruminococcaceae (*Ruminococcus, Oscillospira*), Prevotellaceae i Veillonellaceae, które najprawdopodobniej przyczyniły się do wydłużania łańcucha węglowego.

Wnioski

Badania w ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono w specjalnie zaprojektowanym bioreaktorze, a zastosowane analizy wykonano przy użyciu najnowocześniejszej technologii o wysokiej przepustowości, aby zapewnić wysoką jakość wyników. Przedstawiona praca pozwoliła na wyciągnięcie następujących wniosków:

- waloryzacja ścieków bogatych w laktozę i mleczany (kwaśna serwatka) do kwasu kapronowego w trybie ciągłym w nowatorskim procesie biotechnologicznym z wykorzystaniem fermentacji w otwartej kulturze jest możliwa
- wykazano, że możliwe jest jednoczesne zachodzenie fermentacji laktozy, jak i wydłużanie łańcucha węglowego w bioprocesie jednostopniowym (pojedynczy reaktor);
- w procesie fermentacji serwatki kwaśnej nie były potrzebne ani inhibitor metanogenów, ani zewnętrzny donor elektronów do długotrwałej produkcji kwasu kapronowego
- dla procesów prowadzonych w trybie ciągłym pH utrzymane na poziomie 5,5 było wystarczająco niskie, aby skutecznie hamować metanogenezę, gdzie metanogeny acetoklastyczne były całkowicie zinhibowane
- wykazano, że obniżanie HRT przyczyniło się do wypłukania większości metanogenów z reaktora UASB
- wyniki wykazały przyspieszenie tworzenia kwasu kapronowego wraz ze skracaniem HRT, a dokładnie stopniowe skracanie HRT z 20 do 2,5 dnia wyraźnie poprawiło tempo produkcji kwasu kapronowego i pozwoliło na wyeliminowanie akumulacji kwasu kapronowego
- HRT 1,25 dnia pozwoliło na eliminację inhibicji kwasem masłowym, jednak czas ten był zbyt krótki dla wzrostu i rozwoju drobnoustrojów
- zaprojektowany system umożliwił produkcję kwasu kapronowego, którego najwyższa średnia szybkość produkcji wynosiła 134,3 ± 30,9 mmol C/L/dzień (0,11 g/L/h) i trwała 37 dni (przy medianie 146,1 mmol C/L/ dzień), a specyficzność wynosiła od 58 do 83% (przy medianie 79%);
- wysokie stężenie kwasu kapronowego (do 8,5 g/L) powodowało zahamowanie procesu pomimo dostępności substratów;

- biorąc pod uwagę możliwe szlaki metaboliczne, w procesie fermentacji serwatki kwaśnej produkcja kwasu kapronowego zależała od wydłużania łańcucha węglowego z mleczanu, a nie z etanolu, mimo że etanol był produkowany w reaktorze lub dostarczany zewnętrznie do układu z substratem. Niemniej jednak pewna produkcja etanolu w reaktorze była istotna dla procesu wydłużania łańcucha węglowego, ponieważ zbiegało się to z produkcją kwasu kapronowego, a jej spadek zbiegał się z wystąpieniem zaburzenia procesu
- rosnące tempo dozowania etanolu prowadziło do utleniania etanolu wraz z generowaniem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i wodorotroficznym tworzeniem się metanu;
- wyższa zawartość mleczanów i laktozy oraz brak zewnętrznego dozowania etanolu skutkowały gwałtownym spadkiem powstawania krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i pobudzeniem produkcji średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych z kwasem kapronowym jako głównym produktem;
- w procesie jednoetapowym (jednofazowym) konieczne było utrzymanie niskiego stężenia etanolu w reaktorze (około 1-2 g/L) oraz dużej zawartości mleczanu i laktozy w substracie (do 20 g/L i 30 g /L, odpowiednio) dla wydajnej produkcji kwasu kapronowego;
- wykazano, że nie tylko dostępność donorów elektronów w substracie wpływała na wybór ścieżki metabolicznej, ale także obecność dodatkowego substratu tj. laktozy i pH, może zmienić bieg strumienia węgla w procesach biochemicznych i wpłynąć na selektywność produktów końcowych poprzez dostarczenie dodatkowych półproduktów do reakcji biochemicznych, co jest szczególnie ważne w projektowaniu procesów waloryzacji odpadów i ścieków;
- funkcjonalne wzbogacenie specyficznego mikrobiomu do tworzenia kwasu kapronowego było możliwe dzięki odpowiedniej kontroli parametrów operacyjnych, tj. pH i HRT;
- skład pożywki miał silny wpływ na bioróżnorodność i strukturę populacji drobnoustrojów;
- badania ciągłe wykazały dominację rodzin Coriobacteriaceae, Ruminococcaceae (Ruminococcus, Oscillospira), Prevotellaceae i Veillonellaceae, które uczestniczyły w rekcjach biochemicznych prowadzących do tworzenia kwasu kapronowego;

- w procesach ciągłych prowadzonych na serwatce kwaśnej, jedyny znany producent kwasu kapronowego został przypisany do gatunku *Caproiciproducens spp*.;
- połączenie pomiarów za pomocą cytometrii przepływowej z sortowaniem komórek wraz z sekwencjonowaniem metagenomicznym pozwoliło na zdobycie wszechstronnej wiedzy na temat aktywnych podgrup drobnoustrojów, które były bezpośrednio zaangażowane w proces wydłużania łańcucha węglowego i produkcję kwasu kapronowego. Zaproponowane podejście rzuciło nowe światło na analizę różnych podgrup mikrobiomu i otworzyło nowe ścieżki dla jego pogłębionej charakterystyki.

Prowadzone badania pozwoliły scharakteryzować kluczowe parametry sterowania procesem fermentacji kultur otwartych do produkcji kwasu kapronowego z serwatki kwaśnej. Korzyści, które obniżają ogólne nakłady eksploatacyjne i można je przypisać procesom przedstawionym w tej pracy, to możliwość prowadzenia procesu w warunkach niesterylnych, brak konieczności dodawania tlenu i jakichkolwiek zewnętrznych substratów (takich jak etanol), brak konieczności stosowania obróbki cieplnej lub środków chemicznych do hamowania procesu metanogenezy. Przedstawiona praca wykazała, że zastosowanie fermentacji kultur otwartych umożliwia waloryzację odpadu jakim jest serwatka kwaśna do kwasu kapronowego. Osiągnięte wyniki mogą przyczynić się do opracowania nowatorskich strategii odzyskiwania zasobów poprzez utylizację bioodpadów przy użyciu zaawansowanych metod biotechnologicznych. Ostatecznie prowadzi to do zmniejszenia naszej zależności od zasobów petrochemicznych i toruje drogę dla stworzenia innowacyjnego, zintegrowanego systemu biorafinerii.

Literatura

Agler, M.T., Wrenn, B.A., Zinder, S.H., Angenent, L.T., 2011. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. Trends Biotechnol. 29, 70–78. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.11.006

Andersen, S.J., Candry, P., Basadre, T., Khor, W.C., Roume, H., Hernandez-Sanabria, E., Coma, M., Rabaey, K., 2015. Electrolytic extraction drives volatile fatty acid chain elongation through lactic acid and replaces chemical pH control in thin stillage fermentation. Biotechnol. Biofuels 8, 221. https://doi.org/10.1186/s13068-015-0396-7

Angenent, L.T., Richter, H., Buckel, W., Spirito, C.M., Steinbusch, K.J.J., Plugge, C.M., Strik, D.P.B.T.B., Grootscholten, T.I.M., Buisman, C.J.N., Hamelers, H.V.M., 2016. Chain Elongation with Reactor Microbiomes: Open-Culture Biotechnology To Produce Biochemicals. Environ. Sci. Technol. 50, 2796–2810. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04847

Bong, C.P.C., Lim, L.Y., Lee, C.T., Klemeš, J.J., Ho, C.S., Ho, W.S., 2018. The characterisation and treatment of food waste for improvement of biogas production during anaerobic digestion – A review. J. Clean. Prod. 172, 1545–1558. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.199

Cavalcante, W. de A., Leitão, R.C., Gehring, T.A., Angenent, L.T., Santaella, S.T., 2017. Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review. Process Biochem. 54, 106–119. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.024

Chen, W.S., Strik, D.P.B.T.B., Buisman, C.J.N., Kroeze, C., 2017. Production of Caproic Acid from Mixed Organic Waste: An Environmental Life Cycle Perspective. Environ. Sci. Technol. 51, 7159–7168. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06220

Coma, M., Martinez-Hernandez, E., Abeln, F., Raikova, S., Donnelly, J., Arnot, T.C., Allen, M.J., Hong, D.D., Chuck, C.J., 2017. Organic waste as a sustainable feedstock for platform chemicals. Faraday Discuss. 202, 175–195. https://doi.org/10.1039/C7FD00070G

Duber, A., Jaroszynski, L., Zagrodnik, R., Chwialkowska, J., Juzwa, W., Ciesielski, S., Oleskowicz-Popiel, P., 2018. Exploiting the real wastewater potential for resource recovery – n-caproate production from acid whey. Green Chem. 20, 3790–3803. https://doi.org/10.1039/C8GC01759J

Duber, A., Zagrodnik, R., Chwialkowska, J., Juzwa, W., Oleskowicz-Popiel, P., 2020. Evaluation of the feed composition for an effective medium chain carboxylic acid production in an open culture fermentation. Sci. Total Environ. 728, 138814. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138814

Duber, A., Zagrodnik, R., Gutowska, N., Łężyk, M., Oleskowicz-Popiel, P., 2022. Lactate and Ethanol Chain Elongation in the Presence of Lactose: Insight into Product Selectivity and Microbiome Composition. ACS Sustain. Chem. Eng. 10, 3407–3416. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05869

European Commission, 2017. Review of the 2012 European Bioeconomy Strategy.

Fava, F., Totaro, G., Diels, L., Reis, M., Duarte, J., Carioca, O.B., Poggi-Varaldo, H.M., Ferreira, B.S., 2015. Biowaste biorefinery in Europe: opportunities and research & development needs. New Biotechnol. 32, 100–108. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.11.003

Harvey, B.G., Meylemans, H.A., 2014. 1-Hexene: a renewable C6 platform for full-performance jet and diesel fuels. Green Chem. 16, 770–776. https://doi.org/10.1039/C3GC41554F

Hoelzle, R.D., Virdis, B., Batstone, D.J., 2014. Regulation mechanisms in mixed and pure culture microbial fermentation. Biotechnol. Bioeng. 111, 2139–2154. https://doi.org/10.1002/bit.25321

Kleerebezem, R., Joosse, B., Rozendal, R., Loosdrecht, M.C.M.V., 2015. Anaerobic digestion without biogas? Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 14, 787–801. https://doi.org/10.1007/s11157-015-9374-6

Lago, C., Herrera, I., Caldés, N., Lechón, Y., 2019. Chapter One - Nexus Bioenergy–Bioeconomy, in: Lago, C., Caldés, N., Lechón, Y. (Eds.), The Role of Bioenergy in the Bioeconomy. Academic Press, pp. 3–24. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813056-8.00001-7

Layton, D.S., Trinh, C.T., 2016. Microbial synthesis of a branched-chain ester platform from organic waste carboxylates. Metab. Eng. Commun. 3, 245–251. https://doi.org/10.1016/j.meteno.2016.08.001

Regueira, A., Bevilacqua, R., Lema, J.M., Carballa, M., Mauricio-Iglesias, M., 2020. A metabolic model for targeted volatile fatty acids production by cofermentation of carbohydrates and proteins. Bioresour. Technol. 298, 122535. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122535

Scarlat, N., Dallemand, J.-F., 2019. Chapter Ten - Future Role of Bioenergy, in: Lago, C., Caldés, N., Lechón, Y. (Eds.), The Role of Bioenergy in the Bioeconomy. Academic Press, pp. 435–547. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813056-8.00010-8

Scoma, A., Rebecchi, S., Bertin, L., Fava, F., 2016. High impact biowastes from South European agro-industries as feedstock for second-generation biorefineries. Crit. Rev. Biotechnol. 36, 175–189. https://doi.org/10.3109/07388551.2014.947238

Singhania, R.R., Patel, A.K., Christophe, G., Fontanille, P., Larroche, C., 2013. Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation. Bioresour. Technol., Special Issue: IBS 2012 & Special Issue: IFIBiop 145, 166–174. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.137

Spirito, C.M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A.J., Angenent, L.T., 2014. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. Curr. Opin. Biotechnol. 27, 115–122. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.003

Tamis, J., Joosse, B.M., Loosdrecht, M.C.M. van, Kleerebezem, R., 2015. High-rate volatile fatty acid (VFA) production by a granular sludge process at low pH. Biotechnol. Bioeng. 112, 2248–2255. https://doi.org/10.1002/bit.25640

Venkata Mohan, S., Nikhil, G.N., Chiranjeevi, P., Nagendranatha Reddy, C., Rohit, M.V., Kumar, A.N., Sarkar, O., 2016. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. Bioresour. Technol., Waste Biorefinery - Advocating Circular Economy 215, 2–12. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.130

Wu, Q., Bao, X., Guo, W., Wang, B., Li, Y., Luo, H., Wang, H., Ren, N., 2019. Medium chain carboxylic acids production from waste biomass: Current advances and perspectives. Biotechnol. Adv. 37, 599–615. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.003

Yang, G., Wang, J., 2018. Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: A review. Renew. Sustain. Energy Rev. 95, 130–146. https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.029

Osiągnięcia naukowe

Publikacje

1. Juzwa, W., **Duber, A.**, Myszka, K., Białas, W., Czaczyk, K., 2016. Identification of microbes from the surfaces of food-processing lines based on the flow cytometric evaluation of cellular metabolic activity combined with cell sorting. Biofouling 32, 841–851. https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1201657

2. Jankowska, E., **Duber, A.**, Chwialkowska, J., Stodolny, M., Oleskowicz-Popiel, P., 2018. Conversion of organic waste into volatile fatty acids – The influence of process operating parameters, Chem. Eng. J. 345, 395–403. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.180

3. **Duber, A.**, Jaroszynski, L., Zagrodnik, R., Chwialkowska, J., Juzwa, W., Ciesielski, S., Oleskowicz-Popiel, P., 2018. Exploiting the real wastewater potential for resource recovery – n-caproate production from acid whey. Green Chem. 20, 3790–3803. https://doi.org/10.1039/C8GC01759J

4. Chwialkowska, J., **Duber, A.**, Zagrodnik, R., Walkiewicz, F., Łężyk, M., Oleskowicz-Popiel, P., 2019. Caproic acid production from acid whey via open culture fermentation – Evaluation of the role of electron donors and downstream processing. Bioresour. Technol. 279, 74–83. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.086

5. **Duber, A.**, Zagrodnik, R., Chwialkowska, J., Juzwa, W., Oleskowicz-Popiel, P., 2020. Evaluation of the feed composition for an effective medium chain carboxylic acid production in an open culture fermentation. Sci. Total Environ. 728, 138814. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138814

6. Zagrodnik, R., **Duber, A.**, Łężyk, M., Oleskowicz-Popiel, P., 2020. Enrichment Versus Bioaugmentation—Microbiological Production of Caproate from Mixed Carbon Sources by Mixed Bacterial Culture and Clostridium kluyveri. Environ. Sci. Technol. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07651

7. Brodowski, F., **Duber, A.**, Zagrodnik, R., Oleskowicz-Popiel, P., 2020. Co-production of hydrogen and caproate for an effective bioprocessing of waste. Bioresour. Technol. 318, 123895. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123895

8. Zagrodnik, R., **Duber, A.**, Seifert, K., 2021. Hydrogen production during direct cellulose fermentation by mixed bacterial culture: The relationship between the key process parameters using response surface methodology. J. Clean. Prod. 314, 127971. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127971

9. **Duber, A.**, Zagrodnik, R., Gutowska, N., Łężyk, M., Oleskowicz-Popiel, P., 2022. Lactate and ethanol chain elongation in presence of lactose: Insight into Product Selectivity and Microbiome Composition. ACS Sustain. Chem. Eng. 10, 3407−3416. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05869

Aktywność naukowa

- **Wykonawca** w projekcie: WasteValue finansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu POLNOR (Norway grants and EEA) Anaerobic biorefinery for resource recovery from waste feedstock, nr kontraktu: NOR/POLNOR/WasteValue/0002/2019-00 (PI: Prof. dr hab. inż. Piotr Oleśkowicz-Popiel), 12/2020 – 12/2023

- **Główny wykonawca** w projekcie: CaproBiome finansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu LIDER V, nr kontraktu: LIDER/013/261/L-5/13/NCBR/2014 (PI: Prof. dr hab. inż. Piotr Oleśkowicz-Popiel), 01/2015 – 06/2018

- **Kierownik projektu:** Wpływ bioaugmentacji na formowanie średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz mikrobiomu bakteryjnego w procesach fermentacji kultur mieszanych**;** finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, przyznany w ramach konkursu Preludium 13 dla młodych naukowców, nr kontraktu: 2017/25/N/ST8/01795, (PI: Anna Duber), 02/2018 – 02/2022

- **Wykonawca** w projekcie: SBMK 2020/2021 pt.: „Badanie wstępne potencjału sekwencjonowania nanoporowego jako przystępnej metody analizy składu wybranych kultur mieszanych", nr projektu: 504101/0713/SBAD/0934, PI: dr inż. Mateusz Łężyk

- **Kierownik projektu:** DSMK 2018 'Biologiczna produkcja kwasów karboksylowych ze strumieni odpadowych', nr projektu: 01/13/DSMK/0884, PI: mgr inż., **Anna Duber**

- **Wykonawca** w projekcie: DSMK 2017 'Wykorzystanie nowoczesnych metod identyfikacji mikroorganizmów do badań biologicznie aktywnych filtrów węglowych', nr projektu: 01/13/DSMK/0864, PI: dr Beata Mądrecka

- **Wykonawca** w projekcie: 2016 'Metody usuwania mikrozanieczyszczeń i utylizacja osadów w systemach oczyszczania ścieków', nr projektu: 01/13/DSMK/0836, PI: dr inż. Wojciech Góra

Staże naukowe

- Staż naukowy w ramach programu *Erasmus+* (09/2016 - 12/2016) w projekcie **ERC Advanced Grant 'Novel anaerobes for biobased economy'**. Temat badań naukowych 'study of anaerobic microorganisms for the valorisation of waste-glycerol' in the research group BRIDGE – Bioresources, Bioremediation and Biorefinery, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

- Staż naukowy z metod biologii molekularnej stosowanych w biotechnologii środowiskowej (04/2016) Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska, Olsztyn

- Staż naukowy z metody PCR-DGGE (04/2015), Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Śląska, Gliwice, Poland

Udział w konferencjach naukowych – prezentacje ustne

- **Duber A.**, Zagrodnik R., Oleskowicz-Popiel P.: Acid whey wastewater valorisation to caproate using reactor microbiome. IWA Wastewater, Water and Resource Recovery (WWRR) Conference, 10-13.04.2022, Poznan University of Technology, Poznan, Poland. Autor prezentujący.

- **Duber A.**, Chwialkowska J., Jaroszynski L., Zagrodnik R., Juzwa W., Ciesielski S., Oleskowicz-Popiel P.: Biologiczna produkcja kwasu kapronowego z serwatki w procesie fermentacji przy użyciu kultur mieszanych, II Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów BioOrg 2017, 02.12.2017, Politechnika Poznańska, Polska. Autor prezentujący.

- **Duber A.**, Chwialkowska J., Zagrodnik R., Jaroszynski L., Ciesielski S., Oleskowicz-Popiel P.: The microbiome structure in mixed culture fermentation for caproic acid production from acid whey. Symposium "Novel Anaerobes 2017", 10th November 2017, University of Minho, Braga, Portugal. Autor prezentujący.

- **Duber A.**, Chwialkowska J.,Jaroszynski L., Juzwa W., Ciesielski S., Oleskowicz-Popiel P.:Biological production of caproate from whey in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor**.** 5th IWA Young Water Professionals BeNeLux Conference, 05-07 July 2017, Ghent, Belgium. Autor prezentujący.

- **Duber A.**, Chwialkowska J., Jaroszynski L., Oleskowicz-Popiel P.: Resource recovery from organic-rich waste streams – does it have to be biogas? VII International Conference of Biotechnology Students, 20-22.11.2015, Poznan University of Life Sciences, Poznan. Autor prezentujący.

Udział w konferencjach naukowych – prezentacje posterów

- **Duber A.**, Zagrodnik R., Gutowska N., Oleskowicz-Popiel P.: Impact Of The Carbon Substrates Ratio On The Carboxylic Acid Production In Open Culture Fermentation. 25 May - 04 June 2021, IWA Digital World Water Congress, Copenhagen, Denmark, on-line

- **Duber A.**, Zagrodnik R., Gutowska N., Oleskowicz-Popiel P.: Evaluation of a bioaugmentation technique for biochemicals production. 26-28 April 2021, 43rd Symposium on Biomaterials, Fuels and Chemicals, USA, on-line

- Lezyk M., **Duber A**., Brodowski F., Gutowska N., Chwialkowska J., Zagrodnik R., Oleskowicz-Popiel P.: Open culture fermentation for biofuels and biochemicals production – caproic acid production. 21-24 July 2019, SIMB Annual Meeting, Marriott Wardman Park Hotel, Washington, DC, UAS

- **Duber A.**, Zagrodnik R., Chwialkowska J., Oleskowicz-Popiel P.: The role of ethanol in carboxylic fatty acids production from acid whey. 2nd International Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability Biorestech, 16-19 September 2018, Sitges, Spain

- Jankowska E., Chwialkowska J., **Duber A**., Oleskowicz-Popiel P.: Conversion of organic wastes and wastewaters to carboxylic acids. 2nd International Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability Biorestech, 16-19 September 2018, Sitges, Spain

- Łężyk M., Gutowska N., **Duber A**., Jankowska E., Kabasakal T., Oleskowicz Popiel P.: Designing reactor microbiomes for chemical production from organic waste. 2nd International Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability Biorestech, 16-19 September 2018, Sitges, Spain

- **Duber A.**, Chwiałkowska J., Jaroszyński Ł., Juzwa W., Ciesielski S., Oleśkowicz-Popiel P.: Caproic acid production from whey in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. 39th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 1-4 May 2017, San Francisco, USA

- **Duber A.**, Chwiałkowska J., Jaroszyński Ł., Juzwa W., Oleśkowicz-Popiel P.: Chain elongation by undefined mixed microbial cultures. IWA Specialist Conference Microbial Ecology and Water Engineering: A joint conference of the MEWE and Biofilm specialist groups, 4-7 Sept 2016, Copenhagen, Denmark

- **Duber A**., Chwiałkowska J., Jaroszyński Ł., Oleśkowicz-Popiel P.: Organic acids recovery from sludge and agri-industrial residues. 3rd IWA Specialised International Conference Ecotechnologies for Wastewater Treatment, 27-30 June 2016, Cambridge, UK

- **Duber A.**, Chwiałkowska J., Jaroszyński L., Oleskowicz-Popiel P.: From ethanol to caproic acid – evaluation of process re-integration. Eco-BIO2016 – Challenges in Building a Sustainable Biobased Economy, 6-9 March 2016, Rotterdam, the Netherlands

- **Duber A.**, Chwiałkowska J., Jaroszyński L., Oleskowicz-Popiel P.: Caproic acid production with use of microbiome. 14th World Congress of Anaerobic Digestion, 15-18 Nov. 2015 Vina del Mar, Chile

- **Duber A**., Chwiałkowska J., Jaroszyński Ł., Oleśkowicz-Popiel P Produkcja kwasu kapronowego za pomocą mikrobiomu. Hydromikro conference, 14-16 Sept. 2015, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland

- Jankowska E., Chwiałkowska J., **Janicka A.**, Stodolny M., Oleśkowicz-Popiel P. Impact of external factors on the catabolic pathways in mixed-culture fermentation. Environmental Technology for Impact conference. 29-30 April 2015, Wageningen, Netherland