



Wpływ odczynu pH kultury bakterii *Rhodospirillum rubrum* na produkcję wodoru z gazu syntezowego

Effect of Culture's Initial pH on Hydrogen Production from Synthesis Gas Using *Rhodospirillum rubrum*

Ghasem NAJAFPOUR¹⁾, Habibollah YOUNESI²⁾

¹⁾ School of Chemical Engineering, Engineering Campus, Universiti Sains Malaysia Seri Ampangan, Nibong Tebal, 14300 Penang, Tel: 04 -593 7788 Ext. 6412, Fax: 04 - 594 1013; email: chghasem@eng.usm.my, najafpour@hotmail.com

²⁾ School of Chemical Engineering, Engineering Campus, Universiti Sains Malaysia Seri Ampangan, Nibong Tebal, 14300 Penang, Tel: 04 -593 7788 Ext. 6412, Fax: 04 - 594 1013

RECENZENCI: Prof. dr ing. Peter FEČKO; dr inż. Ewa KISIELOWSKA

Streszczenie

Badania dotyczą możliwości wytwarzania wodoru z gazu syntezowego (mieszanka CO i H₂) z udziałem fotosyntetycznych bakterii beztlenowych *Rhodospirillum rubrum*, w procesie fermentacji. Doświadczenia były prowadzone przy różnych wartościach początkowych pH z wykorzystaniem jabłczanu jako źródła węgla w środowisku ciekłym. Uzyskane wyniki świadczą, że produkcja wodoru radykalnie spada w środowisku silnie alkalicznym i kwaśnym w zakresie pH od 3–5 i 11–12. Stwierdzono, że ilość bakterii *Rhodospirillum rubrum* silnie wzrasta przy pH od 6 do 9. *R. rubrum* wytwarzają wodór w środowisku alkalicznym. Stwierdzono, że przy wartości początkowej pH równej 9, najwyższy uzysk wodoru wyniósł 61%. Zależność pomiędzy jonami wodoru a wartością specyficzną produkcji wodoru została określona formułą matematyczną. Określono parametry kinetyki przy ściśle określonym tempie fermentacji wodorowej. Pożądana wielkość szybkości (prędkości) produkcji wodoru wyniosła $pK_H = 7,85$ oraz $pK_{OH} = 10,4$. Dla optymalnej wartości pH równej 9, maksymalna wartość specyficzną produkcji wodoru wyniosła 1,1 mmola H₂/mmola CO·h.

Słowa kluczowe: Produkcja wodoru, wpływ pH, fotosyntetyczne bakterie, gaz syntetyczny, *Rhodospirillum rubrum*.

Summary

Biological hydrogen production from synthesis gas by photosynthetic anaerobic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*, was carried out in batch fermentation. The experiment was conducted at various initial pH of the medium using malate as carbon source in liquid media. The results indicated that the hydrogen production was drastically reduced at acidic and alkaline conditions, pH range of 3 – 5 and 11 – 12. It was found that *Rhodospirillum rubrum* was well grown on pH range of 6 to 9. *R. rubrum* was able to produce hydrogen at alkaline region. It was found that at an initial pH value of 9, the highest hydrogen production yield was 61%. The relationship between the hydrogen ion and the specific hydrogen formation rate has been mathematically defined. The kinetics parameters on the specific hydrogen fermentation rate has been evaluated. The desired kinetics parameters for the specific hydrogen production rate were $pK_H = 7.85$ and $pK_{OH} = 10.4$. At the optimum pH value of 9, the maximum specific hydrogen production rate was 1.1 mmole H₂/mmole CO·h.

Keywords: Hydrogen production, Effect of pH, Photosynthetic bacteria, Synthesis gas, *Rhodospirillum rubrum*.

1. Wprowadzenie

Wodór jest paliwem najbardziej przyjaznym dla środowiska i jest głównie produkowany z paliw naturalnych takich jak gaz ziemny, nafta, węgle niskouwęglone. Niemniej jednak produkcja wodoru z paliw kopalnych powoduje powstanie takiej samej ilości dwutlenku węgla jak w procesie spalania [1].

Produkcja wodoru w procesie fermentacji jest bardzo korzystną metodą na tle innych metod z uwagi na to, że zachodzi w temperaturze i przy ciśnieniu otoczenia [2]. Kilka czynników wpływa na efektywność produkcji wodoru w procesie mikrobiologicznym. Są to stężenie pożywki, pH środowiska, źródło węgla oraz obecność stymulatorów wzrostu.

1. Introduction

Hydrogen is the most environmental friendly fuel and it is mainly produced from fossil fuel such as natural gas, naphtha, and low rank coal. However, the production of hydrogen from fossil fuel releases the same amount of carbon dioxide as it is formed from combustion of fossil fuels [1].

Hydrogen production via fermentation is a very acceptable method among other methods of production of hydrogen, since the process operates at ambient temperature and pressure [2]. There are several factors improvement of on yield of microbial hydrogen production, such as concentration of nutrients, pH of media, carbon sources and microbial growth stimulants. It has been reported that micro-

Stwierdzono, że produkcja wodoru w procesie degradacji sacharozy z mąki sojowej z wykorzystaniem mikroflory, zwiększała się, jeżeli wartość początkowa pH była zmieniana od kwaśnego (pH = 4) do zasadowego (pH = 9) [3]. Stwierdzono również, że maksymalne przetworzenie sacharozy zachodziło przy pH równym 9 i wynosiło około 95% [3, 4].

Najnowsze badania nad procesami biologicznymi były skierowane na zamianę substratów gazowych w produkty użytkowe [5, 6]. Biologiczne procesy wymiany woda-gaz mogą stanowić alternatywną metodę produkcji wodoru z gazu syntetycznego z wykorzystaniem bakterii reagujących na światło. Mikroorganizmy mogą być katalizatorem w reakcji. W procesie przechodzenia tlenku węgla w dwutlenek węgla, woda jest redukowana do wodoru, zgodnie z reakcją [7]:



Tlenek węgla może podlegać przemianom metabolicznym z udziałem bakterii takich jak *Rhodospirillum rubrum* [8], *Carboxydotherrmus hydrogenformans* [9], *Rhodopseudomonas* sp., i *Rhodopseudomonas palustris* [10]. Głównym enzymem odpowiedzialnym za mechanizm wykorzystania tlenku węgla przez bakterie jest węglowo-tlenowa dehydrogenaza CODH [12].

Celem przedstawianej pracy jest określenie wpływu początkowej wartości pH podłoża na zwiększenie produkcji wodoru z zastosowaniem fotosyntetycznych bakterii *R. rubrum*. Doświadczenia były prowadzone w sterylnych butlach jako bioreaktorze okresowo beztlenowym. Optymalne pH podłoża odpowiadało maksymalnej wydajności wodoru z wysoką gęstością optyczną komórek bakteryjnych.

2. Podejście i metoda badawcza

Mikroorganizmy

Do badań używano bakterie *Rhodospirillum rubrum* ATCC 25903 otrzymane z American Type Culture Collections (USA). Bakterie gram ujemne *R. rubrum* były hodowane na jabłczanowej pożywce w temperaturze 30°C w zamkniętej korkiem, sterylnej butli (163 ml). Próbkę podłoża o objętości 50 ml były przenoszone do oddzielnych sterylnych butli w atmosferze azotu. Butle z ciekłym podłożem były sterylizowane w temperaturze 121°C przez 15 minut. Po autoklawizacji sterylne butle były przedmuchiwane syntetycznym gazem (55% CO, 20% H₂, 15% Ar, 10% CO₂) z argonem jako gazem obojętnym. Podłoże było zaszczerpione w 5% obj. inoculum bakteryjnym.

Skład ciekłej pożywki (w 1 dm³ roztworu) był następujący: kwas jabłkowy 2,5g neutralizowany przy pomocy NaOH do pH = 6,9, ekstrakt

bial hydrogen production by sucrose degradation using a mixed microbial flora from a soybean-meal silo, was enhanced as the initial pH of the media was shifted from acidic region (pH=4) to alkaline condition (pH=9) [3]. It was also observed that the maximum sucrose conversion at pH value of 9 was stated about 95% [3, 4].

Recent research on biological processes were used to convert gaseous substrate to useful products [5, 6]. The biological water-gas shift reaction products may provide an alternative method to produce hydrogen from synthesis gas by using photosynthetic bacteria. The microorganisms may catalyze the water-gas shift reaction. In this phenomenon in which carbon monoxide is oxidized to carbon dioxide, while simultaneously water is reduced to hydrogen, the reaction is shown as following [7]:

Carbon monoxide can be metabolized by varies bacteria such as *Rhodospirillum rubrum* [8], *Carboxydotherrmus hydrogenformans* [9], *Rhodopseudomonas* Sp., and *Rhodopseudomonas palustris* [10]. The key enzyme related to mechanism of carbon monoxide utilization in the bacteria is carbon monoxide dehydrogenase (CODH) [12].

The purpose of this study was to investigate the effect of initial pH of the media to enhance hydrogen production with implementation of photosynthetic bacterium, *R. rubrum*. The experiments were carried out in the serum bottles as anaerobic batch bioreactor. The optimal pH of the media is defined as maximum productivity of hydrogen with high optical cell density.

2. Approach and Methods

Microorganisms

Rhodospirillum rubrum ATCC 25903 obtained from the American Type Culture Collections (USA) was used in this study. For batch studies, gram negative bacterium, *R. rubrum* was grown on malate incubated at 30°C in a sealed stopper serum bottle (163 ml). A 50 ml medium was transferred into each serum bottle under nitrogen gas. The bottles with liquid media were sterilized at 121°C for 15 minutes. After autoclave, the serum bottles were purged with synthetic gas (55% CO, 20% H₂, 15% Ar, 10% CO₂) with argon as the internal standard. The media were injected with 5% (v/v) of inoculum.

The composition of liquid media in one liter was as follows: Malic acid 2.5g neutralized with NaOH at pH 6.9, Yeast Extract 1g, (NH₄)₂SO₄ 1.25g,

drożdży 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,25g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,07g, cytrynian żelazowy 0,01g, EDTA 0,02g, KH_2PO_4 0,6g, K_2HPO_4 0,9g. Roztwór metali śladowych (1 ml); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,02g, H_3BO_3 0,01g, cytrynian żelazowy 3g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01g, EDTA 0,5g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2g. Roztwór witaminy B (7,5 ml); Kwas nikotynowy 0,2g, Tiamina (B1) HCl 0,4g, Kwas pantotenowy (B5) 0,2g, Biotyna 0,008g, uzupełnione wodą destylowaną do 1 litra. Badania prowadzono w przedziale wartości pH od 3 do 12. Jeżeli pożywka zawierała kwas jabłkowy to odczyn początkowo był kwaśny. Regulację pH przeprowadzono przy pomocy 1M roztworu NaOH. Wartość pH pożywki była mierzona pH-metrem WTW 320.

Metody analityczne

Do pobierania próbek była używana automatyczna strzykawka (Hamilton CO., Reno, Nevada), pobierano 200ml fazy gazowej z każdej butli co 12 godzin. Butle były wysterylizowane i napełniane gazem syntezowym dostarczonym przez Sitt Tatt Industrial Gases, Penang. Do analizy gazu używano chromatografu gazowego (Perkin Elmer, Autosystem XL), wyposażonego w czujnik konduktometryczny termiczny (TCD) oraz system gromadzenia danych, z oprogramowaniem (Total Chrom). Używano kolumn Carboxen 1000, 100/120 mesh (Supelco). W czasie pomiaru temperatura początkowa kolumn wynosiła 40°C , po 3,5 min, zaprogramowano wzrost temperatury — temperatura rosła o $20^\circ\text{C}/\text{min}$ aż do osiągnięcia 180°C . Zainstalowano czujniki temperatury 200 i 150°C . Przepływ gazu (He) w kolumnie wynosił 30 ml/min.

Koncentracja komórek *R. rubrum* była określona poprzez oznaczenie gęstości optycznej za pomocą spektrofotometru (Cecil 1000). Sterylne butle były napełnione 50 ml świeżej pożywki z 2,5 ml bakterii hodowanymi przez 20 godzin. Próbki płynnego podłoża były pobierane co 12 godzin. Butle były wstrząsane w mieszalniku (B. Braun) z prędkością 200 obrotów/min. Butla z pożywką była oświetlana przez żarówkę 60W z natężeniem 1000 luxów mierzonym przez Lux-meter (Sper Scientific, Taiwan).

3. Wyniki i dyskusja

Celem doświadczeń było określenie ilości wytworzenia wodoru, wzrostu ilości komórek bakterii *R. rubrum* oraz ilości tlenku węgla dla określenia optymalnej wartości pH, która mogłaby być stosowana w procesie produkcji w dużej skali. Wartość pH w trakcie doświadczeń określała kwasowość i zasadowość środowiska. Celem doświadczeń było wyznaczenie pożądanej wartości pH, umożliwiającej

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,07g, Ferric Citrate 0,01g, EDTA 0,02g, KH_2PO_4 0,6g, K_2HPO_4 0,9g. Trace metal solution (1 ml); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,02g, H_3BO_3 0,01g, Ferric Citrate 3g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01g, EDTA 0,5g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2g. B-Vitamin Solution (7.5 ml); Nicotinamide 0,2g, Thiamine HCl 0,4g, Nicotinic acid 0,2g, Biotin 0,008g, added distilled water to 1 liter. The range pH study was 3 to 12. Since the media contained malic acid, it was Initially acidic pH. The pH of liquid media was adjusted to the desired value using 1M sodium hydroxide solution. The pH of media was measured by WTW pH 320 pH probe.

Analytical methods

A gastight syringe (Hamilton CO., Reno, Nevada) was used to take samples, 200ml from the gas phase of each serum bottle at every 12 hours time interval. The serum bottles were change initially with synthesis gaseous substrates supplied by Sitt Tatt Industrial Gases, Penang. Gas chromatograph (Perkin Elmer, Autosystem XL), equipped with thermal conductivity detector (TCD) and data acquisition system, with suitable software (Total Chrom) was used to analyze the gas. The column used was Carboxen 1000, 100/120 mesh (Supelco). During the analysis, the column temperature was initially maintained at 40°C , after 3.5 min, the temperature was programmed with a rate of $20^\circ\text{C}/\text{min}$ until it reached to 180°C . The detector and injector temperatures were 200 and 150°C , respectively. Flow rate of the carrier gas (He) was set at 30 ml/min.

The cell concentration of *R. rubrum* was determined by reading the optical density using a spectrophotometer (Cecil 1000) and measuring in a standard calibration curve. The serum bottles were filled with 50 ml of fresh media seeded and incubated with 2.5 ml of the microorganism grown for 20 hours. The liquid samples time were also taken at every 12 hours time interval. The serum bottles were shaken on an orbital shaker (B Braun) at 200 rpm. The light was supplied by a tungsten lamp (60W) to the serum bottles at 1000 lux measured by a Lux-meter (Sper Scientific, Taiwan).

3. Results and Discussion

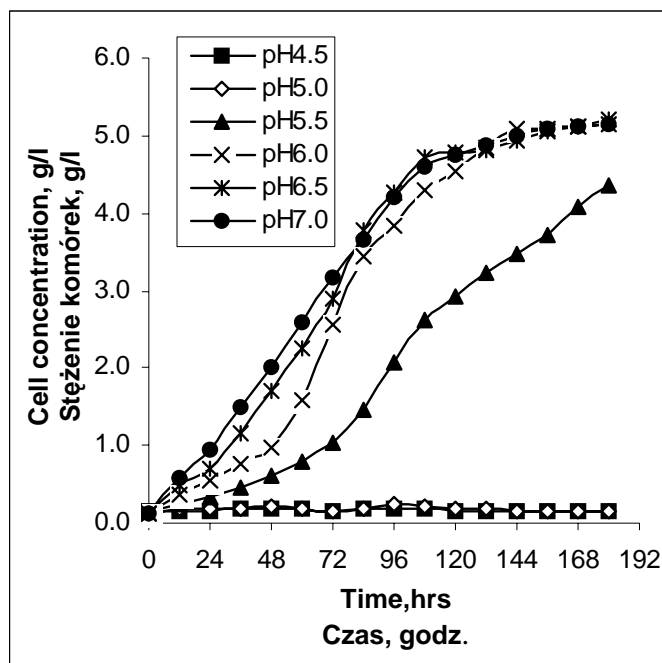
Batch experiments were carried out for hydrogen production, cell growth of *R. rubrum* and carbon monoxide uptake to determine the optimal pH value to be used for continuous hydrogen production in large scale operation. The range of pH used in liquid media were defined acidic and alkaline condition. The aim of the experiments were to distinct a desired value of pH with maximum yield of

otrzymanie maksymalnego uzysku w produkcji wodoru oraz odpowiedniej gęstości komórek mikroorganizmów. Warunki kwasowości badano w zakresie pH od 3 – 7, warunki zasadowe w zakresie pH od 7 – 12. Uzyskane wyniki zostały przedstawione na odpowiednich wykresach. Przeprowadzono trzykrotne powtórzenie każdego doświadczenia. Przetworzone wyniki są średnimi dla trzech powtórzeń.

Na rysunku 1 przedstawiono stężenie komórek *R. rubrum* dla różnych wartości początkowych pH pożywki, dla warunków kwaśnych, pH 4,5, 5 do 7, z przedziałem 0,5. Koncentracja komórek bakterii przy pH 3 do 4 była zbyt mała dla ich identyfikacji w czasie doświadczenia. Zaobserwowano nieznaczną zmianę koncentracji komórek mikroorganizmów przy pH 4,5 i 5, pokazaną na rysunku 1. Ze wzrostem odczynu pH od 5,5 do 7, gęstość komórek rośnie. Faza opóźnienia na krzywej wzrostu dla *R. rubrum* została stwierdzona przy pH = 5,5 po 60 godzinach. Taka tendencja była również zaobserwowana przy pH = 6 po 48 godzinach. Na podstawie danych doświadczalnych można stwierdzić, że istotny wzrost ilości bakterii następuje przy pH = 6,5 oraz 7. Przyrost stężenia komórek *R. rubrum* ma charakter wykładniczy w czasie 108 godzin. Wtedy rozwój mikroorganizmów osiąga stan stabilny, koncentracja komórek jest stała. Koncentracja komórek po 144 godzinach, przy pH początkowym równym 7 wyniosła 5,1 g/l.

hydrogen productivities and suitable cell density. The acid range was defined the pH value of 3 – 7 and the alkaline pH range was 7 – 12. The obtained data related to acidic and alkaline regions are discussed in the respective graphs. The average experimental data have been calculated for repetition of three times in batch experiments.

Figure 1 shows the cell density of *R. rubrum* with various initial pH of media in acidic condition, pH 4.5, 5 to 7, interval of 0.5. The cell concentrations of bacteria at pH 3 to 4 were unable to detect from the experimental data. There was no significant changes of microbial cell concentrations at pH values of 4.5 and 5 as the data shown in figure 1. The pH of initial liquid media was increased from pH 5.5 to 7, the cell density also increased. The lag phase on growth curve for *R. rubrum* was terminated at pH value of 5.5 after 60 hours. This situation was also observed at pH of 6 after 48 hours. From the collected experimental data, significant growth of bacteria cells was obtained at pH 6.5 and 7 with exponential growth within 108 hours. Then, The microbial growth has reached to stationary phase where the cell density was constant. The cell concentration for liquid media with initial pH value of 7 after 144 hours of incubation was 5.1 g/l.



Rys.1
Stężenie komórek *Rhodospirillum rubrum*
w środowisku kwaśnym

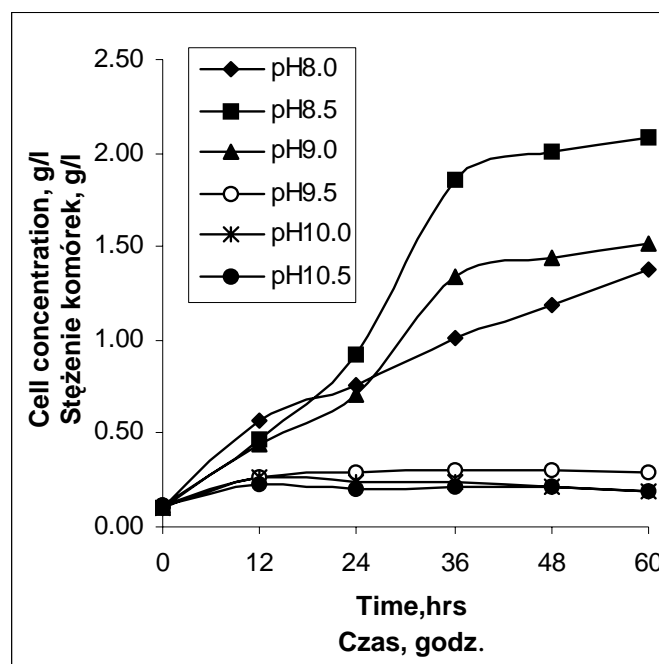
Fig. 1
Cell Density of *Rhodospirillum rubrum*
at Acidic Region

Na rysunku 2 przedstawiono wyniki doświadczeń przeprowadzonych w środowisku alkalicznym,

Figures 2 shows the experiments conducted in alkaline condition, with initial pH values in the

przy wartości pH w zakresie 8 do 10,5 i interwale 0,5. Wyniki wskazują, że rozwój *R. rubrum* jest największy w środowisku alkalicznym dla pH od 8 do 9. Wyniki wskazują również, że wzrost *R. rubrum* w wyższym pH (pH od 9,5 do 12) był utrudniony. Wzrost komórek mikroorganizmów został zahamowany przy pH powyżej 9. Stężenie komórek utrzymywało się na minimalnym poziomie 0,2 g/l. Zaobserwowano jednocześnie, że wzrost *R. rubrum* był niemożliwy w środowisku o pH od 11 do 12. Maksymalna koncentracja komórek wyniosła 2,1 g/l przy pH = 8,5 dla okresu inkubacji wynoszącym 60 godzin. Okres przejścia do stanu równowagi we wzroście komórek trwał 36 godzin. Otrzymane wyniki pozwoliły na określenie warunków kolejnych eksperymentów na wartość pH od obojętnego do lekko alkalicznego (pH = 7 – 8,5).

range of 8 to 10.5, in 0.5 intervals, in repeated batch experiments. The results showed that *R. rubrum* was able to grow at alkaline pH values from 8 to 9. The results also indicated that the growth of *R. rubrum* was hindered at higher pH (pH 9.5 to 12). The microbial cell growth was inhibited at pH values more than 9. The cell density was held at minimum level about 0.2 g/l. It was also observed that *R. rubrum* was unable to show significant growth at pH values of 11 to 12. The maximum cell concentration was 2.1 g/l at pH of 8.5 for incubation period of 60 hours. The transition of cell growth to stationary phase was after 36 hours. These results lead the future experiments to be conducted at the pH range of neutral to slightly alkaline condition with sufficient growth of *Rhodospirillum rubrum* which lied at pH range of 7 – 8.5.



Rys. 2
Stężenie komórek *R. rubrum* w środowisku alkalicznym

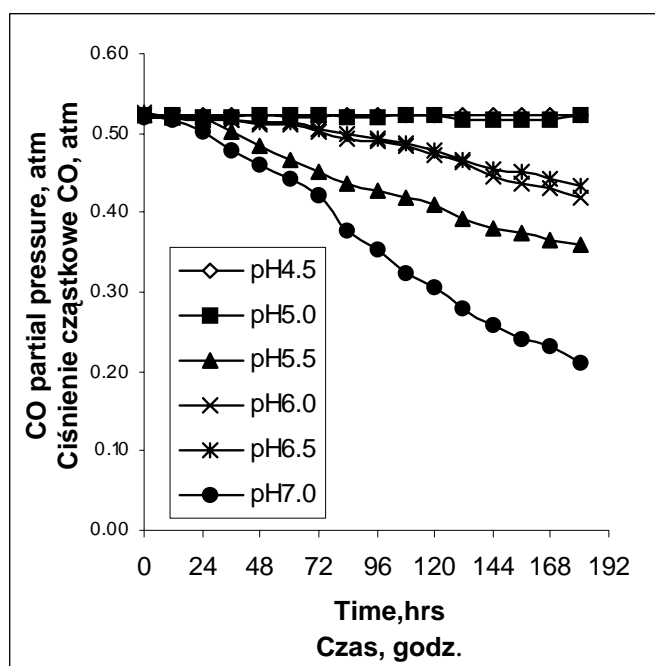
Fig. 2
Cell Density of *R. rubrum* at Alkaline Region

Na rysunku 3 przedstawiono ciśnienie cząstkowe tlenku węgla (CO) w zależności od czasu namnażania oraz jego zależność od wartości początkowej pH podłoża w zakresie kwasowym, pH 4,5 do 7 z interwalem 0,5. Współczynnik pobierania CO był proporcjonalny do stężenia komórek. Bazując na tym założono, że koncentracja CO w ciekłym podłożu przy początkowej wartości pH 3 – 4, była stała w czasie prowadzonego doświadczenia. W związku z tym nie przedstawiono danych dla przyjętych zakresów kwasowości. Wspomniane ciśnienie cząstkowe CO było wyliczone na podstawie analizy gazu używając jako standardu argonu. Kalkulacja była przeprowadzona automatycznie w arkuszu kalkulacyjnym excel.

Figures 3 shows the partial pressure of carbon monoxide (CO) with respect to incubation time as it depends on initial pH values of culture media in acidic region, pH 4.5 to 7 with 0.5 interval. The CO uptake rate was proportional to cell density. Based on the above fact the CO concentration in liquid media with initial pH values of 3 – 4, was constant during the experimental run. Therefore, there were no data to present the above mentioned acidic range. The remaining CO partial pressure in the gas phase was calculated based on gas analysis using argon as an internal standard. The calculation was automatically carried out in excel spread sheet.

Możliwe jest, że w warunkach kwaśnych stężenie jonów wodoru w fazie ciekłej jest hamowane przez ilość wykorzystywanego CO. Zużycie CO rośnie ze wzrostem wartości początkowej pH podłoża. Szybkość reakcji CO rośnie w trakcie przechodzenia ze środowiska kwaśnego do neutralnego. Ilość przereagowanego CO przy pH = 6, po 196 godzinach inkubacji wyniosła 20%. Ilość przereagowanego CO wzrasta do 67% dla pH = 7. Reakcja nie zachodzi dla pH od 4,5 do 5.

It is possible that at acidic condition, the ionic strength of hydrogen in liquid phase was inhibited by the CO utilization rate. However, the CO consumption was increased as the initial pH value was increased. The CO conversion has increased as the acidic condition of the liquid media was shifted to neutral pH value. The conversion of CO at pH value of 6 after 196 hours incubation was 20%. The CO conversion was increased to 67% once the pH of the liquid media was 7. There was no CO conversion for the liquid media with pH of 4.5 and 5.



Rys. 3
Wpływ wartości początkowej pH na wykorzystanie CO przez *R. rubrum* w warunkach kwaśnych

Fig. 3
Effect of Initial pH of Utilization on CO by *R. rubrum* at Acidic Condition

Na rysunku 4 przedstawiono również ciśnienie cząstkowe CO w zależności od czasu inkubacji dla wartości początkowej pH podłoża hodowlanego od 8 do 10,5 ze zmianą pH co 0,5. Koncentracja CO była stała dla pH od 11 do 12. Również dla wartości pH 10 i 10,5 nie zachodziła reakcja CO. Dane zamieszczone na rysunku 4 pokazują, że dla pH = 9,5 około 21% CO podlega reakcji. Ilość CO podlegającego reakcji wzrasta do 100% dla wartości pH = 8,5, w czasie 60 godz. Należy podkreślić, że ilość uzyskanego CO była najwyższa dla pH = 8,5. Powyższe dane eksperymentalne wskazują, że *R. rubrum* jest katalizatorem reakcji poprzez utlenianie CO do dwutlenku węgla i redukcję wody do wodoru cząsteczkowego w środowisku o pH od 7 do 8,5.

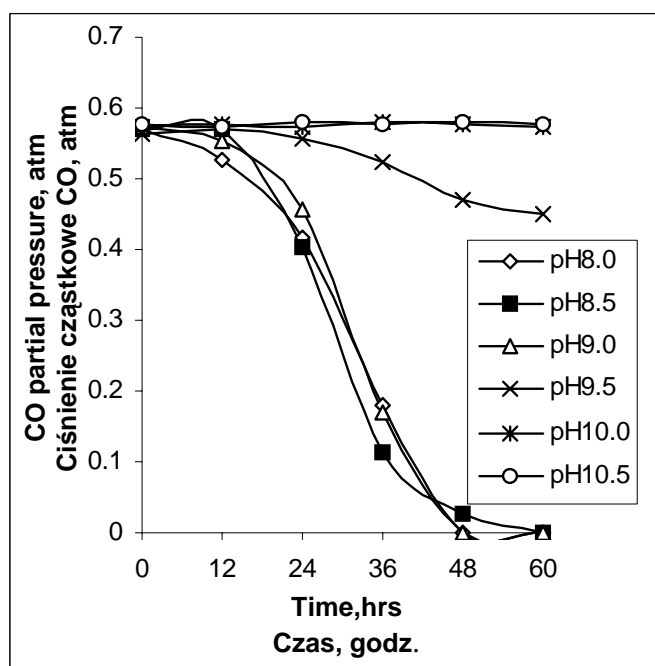
Dokładne badania nad określeniem ciśnienia cząstkowego CO jest przedstawiono na rys. 4 gdzie CO jest gwałtownie zużywane dla okresu inkubacji wynoszącego 48 godz. Stwierdzono, że bakterie

Figures 4 also shows the partial pressure of CO with respect to incubation time based on initial pH values of culture media in alkaline region, pH 8 to 10.5 with 0.5 interval. The CO concentration was constant for pH of 11 – 12. Also there was no CO conversion with pH of 10 and 10.5, as the data shown in Figure 4. The CO conversion with pH of 9.5 was about 21%. The CO conversion has reached to 100% with pH value of 8.5 in the liquid media for incubation period of 60 hours. It is important to note that the rate of CO uptake was higher at pH value 8.5. The above experimental results showed that *R. rubrum* has catalyzed the water gas shift reaction by oxidation of CO to carbon dioxide and reduction of water to molecular hydrogen at pH value range from 7 to 8.5.

Indeed, a close examination of the partial pressure of CO has been illustrated in Figure 4, where CO was rapidly consumed for incubation period of

R. rubrum dobrze rozwijają się na pożywce z jabłczanem w środowisku o pH = 8,5 co pozwala uzyskać dużą absorpcję CO.

48 hours. It was concluded that *R. rubrum* was well grown on malate at pH value of 8.5 to yield high CO uptake rate based.



Rys. 4
Wpływ wartości początkowej pH na wykorzystanie CO przez *R. rubrum* w warunkach alkalicznych

Fig. 4
Effect of Initial pH of Utilization on CO by *R. rubrum* at Alkaline Condition

Na rysunku 5 pokazano ilość powstającego wodoru w powtarzonym procesie fermentacji okresowej z wykorzystaniem bakterii *R. rubrum*, które wyrosły na pożywce z jabłczanem. Wyniki doświadczeń pokazują, że optymalna wartość pH dla wytwarzania wodoru z gazu syntetycznego za pomocą fotosyntetycznych bakterii wynosi od 8 do 9. Ciśnienie cząstkowe cząsteczek wodoru w fazie gazowej spada w warunkach kwaśnych po czasie inkubacji 3 dni i osiąga wartość końcową 30%. Dodatkowo zaobserwowano, że ciśnienie cząstkowe wodoru spada przy niskich wartościach pH, po czym osiąga początkową wartość. Maksymalna ilość wodoru produkowana jest przy pH = 7. Wyniki wskazują, że ilość wytworzonego H₂ nieznacznie wzrasta w okresie 84 godzin, osiągając wartość 44% po 192 godzinach.

Maksimum wykorzystania CO i maksimum produkcji H₂ uzyskane w środowisku lekko alkalicznym, przedstawiono na rys. 6.

Wyniki badań doświadczalnych wskazują, że w warunkach kwaśnych przy pH poniżej 6 produkcja wodoru jest hamowana.

Początkowa wartość pH w zakresie kwaśnym spowodowała opóźnienie wzrostu mikroorganizmów, co spowodowało zahamowanie w wykorzystaniu CO i produkcji H₂. Z drugiej strony w środowisku alkalicznym, przy pH około 9,5 wzrost mikroorga-

Figures 5 shows hydrogen production of repeated batch fermentation using *R. rubrum* grown on malate. The experimental data indicated that the optimum pH value for hydrogen production from synthesis gas using photosynthetic bacterium was 8 to 9. The partial pressure of molecular hydrogen in the gas phase was decreased at acidic pH 5.5 after incubation period of 3 days, and then reached to the latest value, 30%. In tandem, it was observed that the partial pressure of Hydrogen decreased at the lowest pH value, after that reached to the initial value. The maximum hydrogen production was obtained at pH 7. The results showed H₂ production was slightly increased up to period of 84 hours, following increased 44% from initial value after 192 hours.

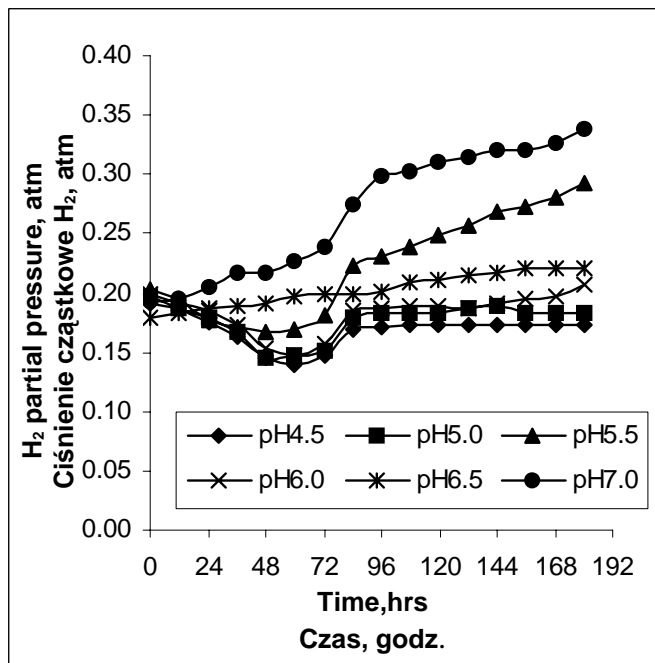
The maximum CO utilization and the maximum H₂ production were obtained at slightly alkaline condition in figure 6.

The experimental results showed that at acidic condition below pH 6, the hydrogen production was inhibited.

The initial acidic pH has inhibited the growth of microorganism, which caused prevention of the carbon monoxide utilization and hydrogen production. On the other hand, initial pH of the media at alkaline condition, pH of above 9.5 has inhibited the growth

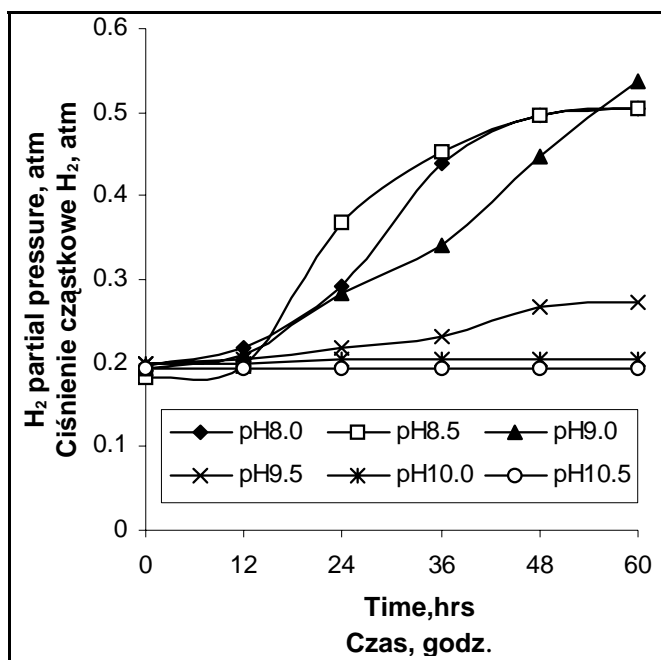
nizmów również był zahamowany. Produkcja wodoru, wykorzystanie CO i wzrost mikroorganizmów były drastycznie zredukowane w środowisku zasadowym i kwaśnym przy pH poniżej 5 i powyżej 9. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych z początkowym podłożem o pH 8,0; 8,5 i 9,0 wskazują na dużą wydajność produkcji wodoru w porównaniu z innymi wartościami początkowymi pH podłoża.

of microorganism. However, hydrogen production, carbon monoxide utilization, and growth of microorganism were drastically reduced at the slightly acidic and alkaline pH values, below 5 and above 9. Experiments with the batches of initial media pH of the media at values of 8.0, 8.5, 9.0 achieved a large amount of hydrogen production compared to other initial media pH values.



Rys. 5
Wpływ wartości początkowej pH na produkcję wodoru przez *R. rubrum* (środowisko kwaśne i neutralne)

Fig. 5
Effect of Initial pH on Hydrogen Production by *R. rubrum*



Rys. 6
Wpływ wartości początkowej pH na produkcję wodoru przez *R. rubrum* (środowisko zasadowe)

Fig. 6
Effect of Initial pH on Hydrogen Production by *R. rubrum*

Produkcja wodoru spada w czasie fermentacji w warunkach kwaśnych. W środowisku słabo kwaśnym i obojętnym (pH = 6; 6,5; 7) *Rhodospirillum rubrum* rosną dobrze, natomiast produkcja wodoru zmienia się nieznacznie. Obserwacje empiryczne wskazują, że znacząca ilość wodoru jest wytwarzana w środowisku słabo alkalicznym.

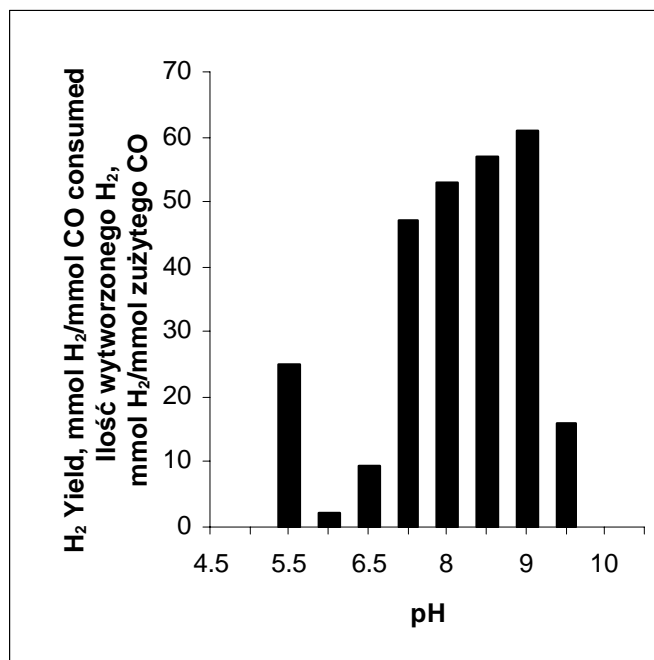
Rysunek 6 pokazuje, że przy wartości początkowej pH podłoża równej 10 i 10,5, aktywność mikroorganizmów przy produkcji wodoru nie była zahamowana z powodu toksyczności słabo alkalicznego środowiska.

Na rysunku 7 pokazano ilość wytworzonego wodoru w oparciu o dwie serie fermentacyjnych doświadczeń. Odczyn pH jest ważnym parametrem dla określenia efektywności produkcji wodoru. Stwierdzono, że dla początkowej wartości pH = 9 osiąga się najwyższą wydajność produkcji, wynoszącą 61%.

The hydrogen production was decreased during batch fermentation at the acidic pH values. The mild and neutral conditions indicated that *Rhodospirillum rubrum* grown well at pH of 6, 6.5, and 7 but there were no significant differences in hydrogen production. These empirical observations suggested that significant rate of hydrogen production was achieved at slightly alkaline condition.

Figure 6 shows that the initial pH of the media at 10 and 10.5, the activity of microorganisms for hydrogen production was not prevented due to toxicities of the media at slightly alkaline condition.

Figure 7 shows yield of hydrogen production based on two sets of batch fermentation experiments. Effect of pH on hydrogen production yield is an important parameter that reflects on process yield. It has been found that at the initial pH of media at 9 has exhibited the highest hydrogen production yield of 61%.



Rys. 7
Wpływ wartości początkowej pH na efektywność produkcji wodoru

Fig. 7
Effect of Initial pH on Hydrogen Production Yield by *R. rubrum*

Oddziaływanie katalityczne mikroorganizmów, opiera się na enzymach wytwarzanych w środowisku in vitro w optymalnych warunkach kwasowości. Jeżeli enzymy mają grupy funkcyjne ujemne lub dodatnie ich aktywność jest uwarunkowana przez wartość pH podłoża oraz pH cytoplazmy wewnątrz komórek. Określono korelację pomiędzy pH podłoża a prędkością wzrostu mikroorganizmów. Może to opisać równanie przydatne dla określenia wpływu pH na parametry związane z kinetyką produkcji i określenia jonów działających jako inhibitory w określonym środowisku. Wybrano prosty model centrów

The catalytic activity of the microorganism is based on enzymes generated at in vivo condition and also is activated with optimal pH value. Since enzyme possesses positive and negative functional groups, the activities is based on pH of media and pH of the cytoplasm inside the cells. It is required to correlate a relation between pH of the media and the rate of microbial growth. It may describe a useful equation to represent the effect of pH on kinetic data of hydrogen production and define any existing ionic inhibition resulted by pH of the media. The simple active site ionization model has

aktywnych. Aktywna frakcja złoża mikrobiologicznego z endo-enzymami jest związana bezpośrednio z produkcją wodoru:

$$R = \frac{R_{max}[H^+]}{[H^+] + K_{OH} + \frac{[H^+]^2}{K_H}} \quad (2)$$

gdzie:

R – produkcja właściwa wodoru (mmol H₂/ mmol CO·h),

R_{max} – maksymalna szybkość produkcji wodoru (mmol H₂/ mmol CO·h),

K_{OH} i K_H – stałe równowagi reakcji dla aktywnych i nieaktywnych form otrzymanych przez oddawanie lub przyłączanie protonów.

Powyższe równanie jest wynikiem funkcji Michaelisa określającej pH. „ R ” zależy od pH, jak pokazano w powyższym równaniu, jako funkcji $[H^+]$. Istnieje jedna wartość maksimum „ R ” w zależności od pH — jest to optymalna wartość pH. Optimum pH zostało zdefiniowane jako pierwiastek kwadratowy stałej równowagi ($K_{OH} \cdot K_H$). Zgodnie z równaniem (1) optymalna wartość pH może być obliczona z następującego równania:

$$pH_{Optimum} = \frac{1}{2}(pK_H + pK_{OH}) \quad (3)$$

gdzie:

pK_H jest zdefiniowane jako $-\log K_H$.

Funkcja „ R ” płynnie maleje zgodnie ze spadkiem pH dla przedziału wartości pH od 8,5 do 9,0. Na rysunku 8 przedstawiono wpływ wartości początkowej pH na szybkość produkcji wodoru przez mikroorganizmy *Rhodospirillum rubrum*. Pokazuje on, że prędkość produkcji wodoru pozostaje w prostej zależności od formy jonowej substratu (jabłczanu).

Z drugiej strony początkowa wartość pH środowiska wpływa na specyficzną prędkość produkcji wodoru przez mikroorganizm, który skatalizuje reakcję biochemiczną. Dodatkowo, wzrost *R. rubrum* na pożywce organicznej katalizuje reakcję w słabo alkalicznych warunkach przy pH od 8 – 9.

Na podstawie otrzymanych danych, w oparciu o koncepcję analizy graficznej Dixon-Webb'a (1964) [11] można określić pK_H i pK_{OH} . Wykresy dla niskich i wysokich wartości pH zostały przedstawione oddzielnie. Najlepsze parametry kinetyki, stałe równowagi reakcji dla szybkości wytwarzania wodoru mają następujące wartości: $pK_H = 7,85$ i $pK_{OH} = 10,4$. Zgodnie z równaniem (3) model korelacyjny nie jest ściśle dopasowany do danych eksperymentalnych. Dla wszystkich zakresów wartości pH istnieje maksimum prędkości wzrostu dla

been selected. The active fraction of microbial sites of endo-enzymes are directly related to hydrogen production:

where:

R – the specific hydrogen production rate (mmol H₂/ mmol CO·h),

R_{max} – the maximum specific hydrogen production rate (mmol H₂/ mmol CO·h),

K_{OH} and K_H – the equilibrium constants of acid-base reactions for active and inactive forms obtained by protonation and deprotonation, respectively.

Actually, the above equation is the effect of Michaelis pH function. „ R ” is dependent on pH as shown in the above equation as a function of $[H^+]$. There is a single maximum „ R ” with respect to pH that is optimum pH values. The optimum pH value has been defined as square root of equilibrium constants of ($K_{OH} \cdot K_H$). According to Equation (1) the optimum pH value has been derived by the following equations:

where:

pKH is defined as $-\log KH$.

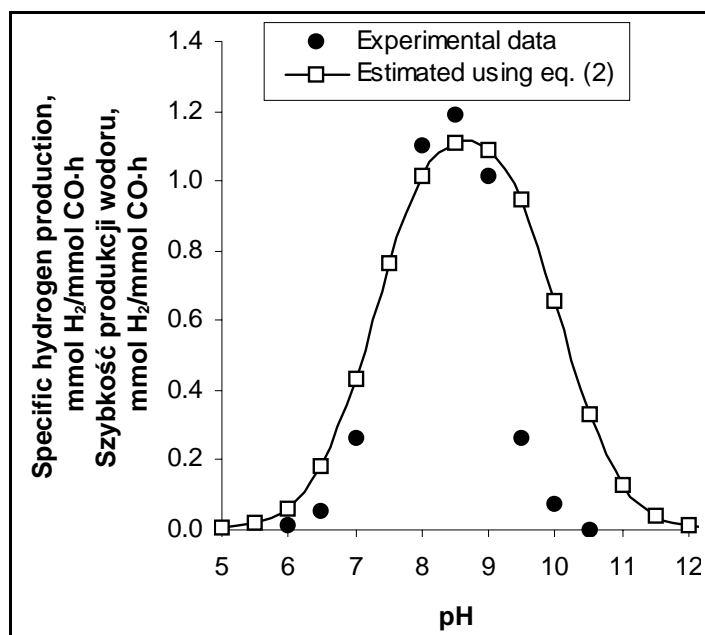
The „ R ” function declines smoothly and symmetrically as the pH values of the media varied from the optimum pH of 8.5 – 9, defined from the presented data in the following Figure 8. Figure 8 shows effect of initial pH on specific hydrogen production rate by *Rhodospirillum rubrum*. It represents that the specific hydrogen production rate must be in the proper ionic form of substrate, malate.

On the other hand, initial pH value of media has influenced the specific hydrogen production rate of a microorganism which has catalyzed the biochemical reaction. Furthermore, the growth of *R. rubrum* on organic substrate has catalyzed the water-gas shift reaction at slightly alkaline condition pH of 8 – 9.

From the plotted data based on concepts drawn by Dixon-Webb plots (1964) [11] it can be used to calculate pK_H and pK_{OH} . The log Plots at low and high pH value were separately prepared. The best kinetics parameters, equilibrium constants of acid-base reaction for the specific hydrogen production rate were $pK_H = 7.85$ and $pK_{OH} = 10.4$. According to eq. (3) the model correlates not really well to the experimental data at all pH ranges and also shows maximum specific growth rate lying at pH value of 9. According to the equation (2), the optimum pH

wartości pH = 9. Zgodnie z równaniem (2) optimum pH wynosiło 9 a maksimum szybkości produkcji wodoru 1,1 mmol H₂/mmol CO·h.

and maximum specific hydrogen production rate for the specific hydrogen production rate was 9 and 1.1 mmole H₂/mmole CO·h, respectively.



Rys. 8
Specyficzny wpływ pH na szybkość produkcji wodoru

Fig. 8
Specific Hydrogen Production Rate Versus pH

Zgodnie z rozwiniętym modelem Monoda, prostym modelem wzrostu mikroorganizmów, pH wywiera wpływ przez współczynnik szybkości wzrostu i może nieznacznie wpływać na wielkość Stałej Monoda K_M .

According to an extension of Monod model, the simplest microbial growth model, the pH is affected by the specific growth rate and may slightly affect the Monod constant K_M .

4. Wnioski

Bakterie *R. rubrum* rozwijają się dobrze w środowisku obojętnym i lekko alkalicznym. Natomiast *R. rubrum* nie wykazują wzrostu w środowisku kwaśnym przy pH od 5,0 do 6,5 oraz zasadowym przy pH od 9,5 do 10,5. Produkcja wodoru jest niezadowolająca w zakresie wartości pH od 5,0 do 6,5 i 9,5 do 10,5. Wodór jest produkowany w satysfakcjonującej ilości w środowisku neutralnym, pH = 7,0. Maksymalne wykorzystanie tlenu węgla zachodzi w środowisku alkalicznym dla wartości pH = 8 – 9 w ciągu 48 godzin inkubacji. Uzysk w produkcji wodoru równy 61% został osiągnięty przy pH = 9. Najlepsze parametry kinetyki i stałe równowagi reakcji środowiska kwaśnego dla specyficznego wymiaru produkcji wodoru wyniosły $pK_H = 7,85$ i $pK_{OH} = 10,4$. Odpowiednio dla optymalnego pH = 9 maksymalna szybkość produkcji wodoru wyniosła 1,1 mmole H₂/mmole CO·h.

4. Conclusions

R. rubrum was grown well at neutral region and mild alkaline area. However, *R. rubrum* did not grow at acidic pH values of 5.0 to 6.5 and alkaline pH values of 9.5 to 10.5. Hydrogen production was unsuccessful in the ranges of pH values of 5.0 to 6.5 and 9.5 to 10.5. Hydrogen was successfully produced at neutral pH of 7.0. The maximum carbon monoxide utilization was achieved at alkaline range of pH values of 8 – 9 within 48 hours of incubation. The yield of hydrogen production, 61% was achieved at pH value of 9. The best kinetics parameters on equilibrium constants of acid base reaction for the specific hydrogen production rate was $pK_H = 7.85$ and $pK_{OH} = 10.4$. According to the optimum pH and maximum specific hydrogen production rate for the specific hydrogen production rate was 9 and 1.1 mmole H₂/mmole CO·h, respectively.

Podziękowania

Prezentowana praca została zrealizowana w ramach grantu IRPA sponsorowanego przez Ministry of Science, Technology & Environment of Malaysia and Universiti Sains Malaysia. Autorzy chcą podziękować Wydziałowi RCMO Uniwersytetu Sains Malaysia za wsparcie w trakcie realizacji projektu.

Tłumaczenie na język polski: dr inż. Barbara Tora

Acknowledgment

The present research was made possible through an IRPA grant sponsored by the Ministry of Science, Technology & Environment of Malaysia and Universiti Sains Malaysia. The authors wish to thank RCMO sector of, Universiti Sains Malaysia for their full support of on conducting the research project.

Literatura — References

1. Feik, C. J., French R., Czernik S., and Chornet E. 200. *Production of Hydrogen from Biomass-Derived Liquids*. *Solar Energy*, 175-179. June 16-21, 2000, Madison, Wisconsin.
2. Tanisho, S., Kuromoto M., and Kadokura N. 1998. *Effect of CO₂ Removal on Hydrogen Production by Fermentation*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 23 (7): 559-563.
3. Lee, Y. J., Miyahara T., and Noike. 2002. *Effect of pH on Microbial Hydrogen Fermentation*. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 77: 694-698.
4. Sung, S., Raskin L., Duanmanee T., Padmasiri S., and Simmons J. J. 2002. *Hydrogen Production by Anaerobic Microbial Communities Exposed to Repeated Heat Treatments*. *Proceeding of the 2002 U.S. DOE Hydrogen production Review*.
5. Vega, J. L., Clausen E. C., and Gaddy J. L. 1988. *Study of Gaseous Substrate Fermentations : Carbon Monoxide Conversion to Acetate. 1. Batch Culture*. *Biotechnology and Bioengineering* 34: 774-784.
6. Klasson, K. T., Ackerson M. D., Clausen E. C., and Gaddy J. L. 1992. *Bioconversion of Synthesis Gas into Liquid or Gaseous Fuels*. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 602-607.
7. Wolffrum, E. J., Watt A. S., and Huang J. 2002. *Bioreactor Development for Hydrogen Production*. *Proceeding of the 2002 U.S. DOE Hydrogen production Review*.
8. Najafpour G, Younesi H, Ku Ismail KS, Mohamed AR, Kamaruddin AH. 2002. *Production of Hydrogen from Synthetic Gas Using Rhodospirillum rubrum, Batch Fermentation*. *Proc. of Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE 2002), 16th Symposium of Malaysia Chemical Engineers (SOMChE 2002), 28-30 October, Malaysia, 87-94*.
9. Gonzalez, J. M., and Robb F. T. 2000. *Genetic Analysis of Carboxydothemus hydrogenformans Carbon Monoxide Dehydrogenase Genes cooF, cooS*. *FEMS Microbiology Letters*, 191: 243-247.
10. Barbosa, M. J., Rocha J. M. S., Tramper J., and Wijffels R. H. 2001. *Acetate as a Carbon Source for Hydrogen Production by Photosynthetic Bacteria*. *Journal of Biotechnology*, 85: 25-33.
11. Segel, I. H. 1975. *Enzyme kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-state Enzyme Systems*. John Wiley, New York.
12. Braun M, Mayer F, Gottschlk G. 1981. *Clostridium aceticum (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide*. *Arch. Microb* 123:288-293.