

Streszczenie

Obiecującą strategią efektywnego wykorzystania odnawialnych źródeł energii jest hydroliza mikrobiologiczna odpadów ligninocelulozowych i ich beztlenowe przetwarzanie. Natomiast ocena zbiorowiska metanogenów w masie fermentacyjnej jest jednym ze sposobów monitorowania przebiegu procesu metanogenezy i może być wskazówką podczas zwiększania wydajności produkcji biogazu. Dlatego zagadnienia podjęte w ramach niniejszej pracy doktorskiej objęły: (1) opracowanie biopreparatu pochodzenia mikrobiologicznego do poprawy efektywności procesu fermentacji metanowej mieszanki odpadów organicznych; (2) poznanie zmian składu konsorcjum metanogenów w biomacie fermentacyjnej.

Część dotyczącą opracowania biopreparatu przeprowadzono w kilku etapach. W pierwszym etapie zrealizowano mikrobiologiczne badania skringowe, koncentrujące się na poszukiwaniu, w biomacie odpadów organicznych, szczepów mikroorganizmów o wysokich uzdolnieniach hydrolitycznych (celulolitycznych, pektynolitycznych, amylolitycznych, proteolitycznych). Skringing polegał także na doborze odpowiedniego podłoża do produkcji enzymów celulolitycznych. Pod uwagę wzięto podłoże suche na bazie wysłodków buraczanych i otrąb pszennych, oraz dwa podłoża płynne: mineralne i sojowo-celulozowo-laktozowe.

Z osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich wyizolowano szczep grzyba *Trichoderma atroviride* G79_11, który wykazywał relatywnie wysokie aktywności kompleksu celulolitycznego. Izolat ten scharakteryzowano pod względem właściwości fenotypowych. Następnie skomponowano dla niego podłoże hodowlane na bazie mąki sojowej, celulozy i laktozy, dobierając zawartość poszczególnych składników, stanowiących podstawę pożywki. Badania objęły również optymalizację źródła azotu oraz dodatek detergentu do podłoża. W kolejnym etapie ustalono warunki prowadzenia hodowli, które nasilają produkcję pożądaných enzymów (temperaturę hodowli, ilość inokulum, pH podłoża, sposób przygotowania inokulum). Określono także najkorzystniejsze warunki pH i temperatury dla katalitycznego działania enzymów celulolitycznych *T. atroviride* G79_11.

W oparciu o płyn pochodzący z hodowli szczepu G79_11 opracowano dwie formy biopreparatu *metaferm* (płynną i zagęszczoną), chronione znakiem towarowym. Sposób otrzymywania biopreparatu opisano także w treści zgłoszenia patentowego.

Przeprowadzono szczegółową charakterystykę właściwości biopreparatu *metaferm*, oceniając pH-stabilność i termostabilność, obecność enzymów takich jak ksylanazy, β -glukozydaza i karboksymetylocelulaza, a także enzymów towarzyszących o aktywnościach pektynoesterazy, poligalaktouronazy, amylazy, laktazy i proteazy. Różnorodność aktywności enzymatycznych, wchodzących w skład biopreparatu *metaferm*, stanowi o jego konkurencyjności w stosunku do komercyjnych biopreparatów enzymatycznych.

Zaproponowano sposób prowadzenia kondycjonowania odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu w kierunku zwiększenia produkcji biogazu. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono aplikacyjny potencjał biopreparatu *metaferm*, ponieważ po jego zastosowaniu odnotowano poprawę efektywności procesu fermentacji metanowej odpadów organicznych (mieszanki bioodpadów o następującym składzie: odpady z przetwórstwa owoców (25%), osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich (25%), kiszonka kukurydziana (12%) oraz wywar zbożowy (38%)). Biopreparat, zarówno w formie płynnej, jak też w postaci liofilizowanej stosowany do wstępnej hydrolizy biomasy spowodował wzrost wydajności produkcji biogazu od około 4% do około 30% w zależności od formy, dawki oraz sposobu aplikacji preparatu.

Wykazano wpływ biopreparatu na strukturę zbiorowiska metanogenów w biomacie pofermentacyjnej, polegający na zwiększeniu udziału *Methanosaeta* i zmniejszeniu *Methanosarcina* w masie pofermentacyjnej. Z kolei monitoring zmian strukturalnych tego zbiorowiska w trakcie prowadzenia procesu fermentacji metanowej pozwolił na ocenę stopniastabilności procesu.

Słowa kluczowe: biopreparat enzymatyczny, aktywność celulolityczna, fermentacja metanowa, *Trichoderma atroviride*, struktura zbiorowiska metanogenów, t-RFLP, sekwencjonowanie nowej generacji

Abstract

A promising strategy for efficient use of renewable energy sources is the microbiological hydrolysis of lignocellulosic waste materials and its anaerobic processing. What is more, the evaluation the methanogens community structure in fermentation biomass is regarded as an approach to monitor the process of methanogenesis and may be one of the crucial issues in order to increase the efficiency of biogas production. Therefore, the aspects taken in the framework of this dissertation included: (1) the biopreparation development of microbial origin, to improve the methane fermentation efficiency of organic waste compounds (2); the knowledge acquisition of changes in the methanogens composition in the fermentation biomass.

The part concerning the biopreparation development was carried out in several steps. The first one included microbiological screening tests, such as organic waste exploration for microorganisms with high hydrolytic properties (cellulolytic, pectinolytic, amylolytic, proteolytic). Additionally, screening was also based on the microbiological media selection for the high efficiency of cellulolytic enzymes production among the following: the solid state fermentation-type medium based on the dried sugar beet and wheat bran, and two liquid media: mineral and the other one based on soybean flour, cellulose and lactose.

The fungus strain *Trichoderma atroviride* G79_11, which was isolated from dairy sewage sludge, showed relatively high activity of cellulolytic enzymes. This strain was characterized for phenotypic properties. Then it was a proper culture medium selected based on soybean flour, cellulose and lactose, and that basic component optimization was performed. The study included also the optimization of nitrogen source content, and a detergent additive. In the next step the proper *T. atroviride* G79_11 culture conditions were established (temperature, the amount of inoculum, pH of the medium or the mode inoculum preparation), in order to increase the production of the desired types enzymes. The optimal pH and temperature conditions for the nonspecific cellulolytic activity of *T. atroviride* G79_11 were evaluated.

Subsequently, basing on post-culture liquid of the G79_11 strain, the biopreparation named *metaferm* was prepared. A procedure of *metaferm* biopreparation consortium was submitted as a patent application and protected with trademark.

Successively, a detailed characterization of the *metaferm* biopreparation properties were performed, as follows: pH-stability and thermostability, the presence of enzymes such as xylanases, β -glucosidase and carboxymethylcellulase, and accompanying enzyme activities

such as pectinesterase, polygalactouronase, amylase, lactase i protease. The variety of enzymatic activities included in *metaferm* biopreparation, it is about its competitiveness in relation to commercial enzymatic preparations.

A method for carrying out the enzymatic conditioning process of organic waste using biopreparation was proposed. This was a part of the methane fermentation optimization to increase the biogas yield. The studies revealed the applicability of the *metaferm* biopreparation. Forasmuch after its application the efficiency of anaerobic digestion of organic waste (waste from the processing of fruit (25%), dairy sewage sludge (25%), corn silage (12%) and the broth grain (38%)) has been improved. *Metaferm*, either as a liquid or in a lyophilized form has increased the efficiency of biogas production from about 4% to about 30% depending on the type, dose and the style of its application.

Furthermore, the influence of *metaferm* biopreparation on the methanogens community structure in the fermented biomass was revealed. The increased share of *Methanosaeta* and reduced *Methanosarcina* after application of the biopreparation was met. On the other hand, the monitoring of structural changes in the methanogens community during the process of methane fermentation allowed assessing the course of stability.

Keywords: enzyme preparation, cellulolytic activity, methane fermentation, *Trichoderma atroviride*, methanogens community structure, t-RFLP, next-generation sequencing