

Anna Sikora

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
tel. (022) 592-33-37, annaw@ibb.waw.pl

Wpłynęło w maju 2008 r.

1. Wprowadzenie. 2. Produkcja wodoru w procesach biologicznych. 2.1. Bezpośrednia biofotoliza. 2.2. Pośrednia biofotoliza. 2.3. Fermentacje bakteryjne. 2.3.1. Powstawanie pirogronianu. 2.3.2. Fermentacja masłowo-butanolowa. 2.3.3. Fermentacja kwasów mieszanych. 2.3.4. Regulacja produkcji wodoru w czasie fermentacji kwasów mieszanych. 2.3.5. Substraty fermentacji. 2.3.6. Wydajność produkcji wodoru w procesie fermentacji. 2.3.7. Sposoby zwiększania wydajności produkcji wodoru w procesach fermentacji. 2.4. Fotofermentacja. 2.5. Procesy fermentacyjne zachodzące w żwaczu. 2.6. Hydrogenosomy. 2.7. Hydrogenazy. 2.8. Bakterie redukujące siarczyn. 3. Podsumowanie

Hydrogen production by microorganisms

Abstract: Hydrogen is considered as an attractive energy carrier that can replace conventional fossil fuels in the future. Current methods of hydrogen production are based on conventional fossil fuels like natural gas, petroleum and coal. These methods are energy-expensive and cause environmental pollution. This is the reason behind the great interest in hydrogen production from biomass by microorganisms under anaerobic conditions. This direction seems to be very attractive because biomass is a versatile and renewable energy source and can be a method of utilization of various organic wastes. The article presents known biological processes leading to hydrogen production: dark fermentation, photofermentation, direct and indirect biophotolysis, anaerobic respiration of sulphate-reducing bacteria under conditions of sulphate depletion. Dark fermentation and dark fermentation followed by photofermentation seem to be the most promising concepts for the future applications. Many investigations now are focused on improving the yield of hydrogen during fermentation. Molecular techniques like the analysis of 16S rRNA gene or fluorescent *in situ* hybridization (FISH) are employed to identify and isolate new species of hydrogen-producing bacteria. Hydrogenases are key enzymes responsible for hydrogen evolution in all of the known biological processes. They are metalloenzymes carrying out a simple chemical reaction: $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$. In anaerobic hydrogen-producing eukaryotic microorganisms hydrogenases are usually located in special organelle – hydrogenosomes. Hydrogenosomes are an adaptation to anaerobic conditions and become energetic centers of the cell. Microorganisms responsible for hydrogen production in rumen, a specific fermentative chamber, are also described.

1. Introduction. 2. Hydrogen production in biological processes. 2.1. Direct biophotolysis. 2.2. Indirect biophotolysis. 2.3. Dark fermentation. 2.3.1. Pirogronian formation. 2.3.2. Butyrate-butanol fermentation. 2.3.3. Mixed-acid fermentation. 2.3.4. Regulation of hydrogen production during mixed-acid fermentation. 2.3.5. Substrates for hydrogen fermentation. 2.3.6. Hydrogen yield during fermentation. 2.3.7. Improvement of hydrogen yield during fermentation. 2.4. Photofermentation. 2.5. Rumen fermentation. 2.6. Hydrogenosomes. 2.7. Hydrogenases. 2.8. Sulphate reducing bacteria. 3. Summary

Słowa kluczowe: wodór, fermentacja, biomasa, hydrogenazy, fotoprodukcja

Key words: hydrogen, fermentation, biomass, hydrogenases, fotoproduktion

1. Wprowadzenie

Wodór, najlżejszy ze znanych gazów, pierwiastek chemiczny rozpoczynający układ okresowy, uważany jest za jeden z istotniejszych nośników energii przyszłości, określane jest nawet mianem paliwa XXI wieku. Zainteresowanie wodorem jako paliwem energetycznym wynika z perspektywy wyczerpania się złóż tradycyjnych źródeł energii, jakimi są węgiel czy ropa naftowa. Wodór stanowi czyste źródło energii, bowiem jedynym produktem jego spalania jest woda, nie powstaje przy tym dwutlenek węgla. Reakcja spalania cząsteczki wodoru przebiega według wzoru opisanego przez równanie 1:



Dzięki temu spalanie wodoru nie przyczynia się do powstawania dziury ozonowej, efektu cieplarnianego i kwaśnych deszczy [48, 59].

Wodór jest również bardzo wydajnym źródłem energii. Jego energia właściwa wynosi 33 Wh/g i jest najwyższa spośród wszystkich paliw. Dla porównania energia właściwa metanu wynosi 14,2 Wh/g a węgla 9,1 Wh/g. Jednak gęstość energii paliwa, która jest iloczynem energii właściwej paliwa i gęstości paliwa w g/cm³, dla skroplonego wodoru jest dość niska i wynosi 2,7 Wh/cm³, dla porównania skroplonego metanu 6,0 Wh/cm³ a węgla 19,2 Wh/cm³. Wynika to z niskiej gęstości skroplonego gazu [64]. Wodór może być przekształcany w energię w silnikach spalinowych oraz w chemicznych ogniach paliwowych. Jednak tej pory wodór nie jest wykorzystywany jako paliwo energetyczne na większą skalę. Wchodzi natomiast w skład paliw raketowych. Pewne nadzieje wiąże się z wykorzystaniem wodoru jako paliwa samochodowego. Jednak istnieją dziś poważne ograniczenia w zastosowaniach wodoru jako nośnika energii. Są to

wybuchowość substancji, konieczność zmniejszenia objętości wodoru przez kompresję czy skroplenie, problemy z jego przechowywaniem i dystrybucją oraz obecne metody jego otrzymywania. Wodór wykorzystywany jest w przemyśle chemicznym, m.in. do produkcji amoniaku, chlorowodoru, metanolu, w reakcjach redukcji jak redukcja tlenków do wolnych metali, w usuwaniu związków siarki i azotu, w reakcjach uwodornienia, wysycania wiązań jak utwardzanie tłuszczów ciekłych, do usuwania śladowych ilości tlenu w zapobieganiu procesom utleniania i powstawaniu korozji. Wodór stosowany jest też w palnikach tlenowo-wodorowych [17].

Mimo że wodór jest najbardziej rozpowszechnionym pierwiastkiem w przyrodzie to w czystej postaci nie występuje, istnieje jedynie w związkach chemicznych. Obecnie wodór otrzymuje się głównie z konwencjonalnych źródeł energii. Do tradycyjnych sposobów produkcji wodoru należą:

- konwersja z parą wodną (reforming parowy) gazu i ropy naftowej; jest to reakcja węglowodorów z parą wodną w bardzo wysokich temperaturach 700–1100°C w obecności katalizatora metalicznego, czego wynikiem jest powstanie mieszaniny gazów (ang. *syngas*), tlenku węgla, dwutlenku węgla i wodoru; w wyniku w dalszej reakcji tlenku węgla z parą wodną powstaje dwutlenek węgla i wodór.
- gazyfikacja węgla lub koksu (również oparta na reakcji z parą wodną, proces analogiczny do reformingu parowego);
- elektroliza wody, czyli rozkład wody pod wpływem stałego prądu elektrycznego;

Znana jest też technologia plazmowa, czyli rozdzielanie węglowodorów na wodór i czysty węgiel w temperaturze 1600–2000°C. Wszystkie te procesy są energochłonne, opierają się na nieodwracalnych źródłach energii i powodują zatrucie środowiska. Otrzymanie czystego paliwa energetycznego takim kosztem jest bezzasadne. Stąd duże zainteresowanie produkcją wodoru z biomasy, w tym procesami prowadzonymi przez drobnoustroje [48, 59].

Biomasa jest to ogólna masa materii organicznej pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, w której w wyniku procesu fotosyntezy akumulowana jest energia słoneczna. Ilość lasów na kuli ziemskiej szacuje się na 700 bilionów ton. Jest to odpowiednik energetyczny 5 bilionów ton ropy naftowej. Do celów energetycznych można wykorzystać odpady produkcji rolnej jak słoma, niejadalne części roślin uprawnych; odchody zwierząt; odpady przemysłu cukrowniczego, mięsnego, tłuszczowego, drzewnego, skórzanego, papierniczego; osady ściekowe; rośliny szybko rosnące uprawiane specjalnie na potrzeby produkcji biomasy (np. wierzba wiciowa, trawy). Listę tą można jeszcze

znacznie wydłużyć. Cechą biomasy jako źródła energii jest odnawialność i uniwersalność. Dwutlenek węgla, który jest produktem ubocznym rozkładu biomasy, nie przyczynia się do powstania efektu cieplarnianego, gdyż pochodzi z bieżącej produkcji roślinnej i może być zaabsorbowany w procesach fotosyntezy. To wszystko sprawia, że biomasę uważa się za ważne odnawialne źródło wodoru w niedalekiej przyszłości. Wodór z biomasy można otrzymać w wyniku następujących typów procesów [12, 59]:

- gazyfikacja biomasy, jest to reakcja z parą wodną w wysokiej temperaturze ok. 800–1000°C podobnej do reformingu parowego i gazyfikacji węgla;
- piroliza, czyli przekształcenie biomasy w mieszaninę gazów, frakcję płynną biooil (bio-olej) oraz węgiel drzewny pod wpływem wysokiej temperatury 500–700°C bez udziału tlenu, frakcja płynna poddawana jest następnie reformingowi parowemu;
- nadkrytyczne przekształcenie biomasy do dwutlenku węgla i wodoru, które polega na tym, że mieszanina biomasy i wody o jednolitej konsystencji poddawana jest działaniu bardzo wysokiego ciśnienia 22MPa (krytyczne ciśnienie wody), temperatura procesu jest niższa niż w przypadku gazyfikacji i pirolizy.

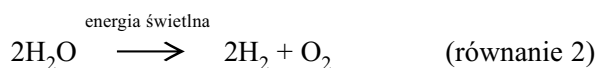
Jak widać wszystkie te procesy wymagają dostarczenia energii. Rozważa się wykorzystanie energii słonecznej w procesach gazyfikacji biomasy.

- procesy prowadzone przez mikroorganizmy.

2. Produkcja wodoru w procesach biologicznych

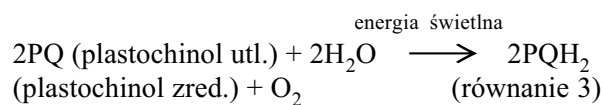
2.1. Bezpośrednia biofotoliza

Bezpośrednia biofotoliza, czyli fotosyntetyczna produkcja wodoru z wody jest procesem biologicznym, w którym energia świetlna jest wykorzystywana do rozbicia cząsteczki wody na wodór i tlen według równania 2:



Zjawisko to wykryto i opisano dla mikroskopijnych glonów, np. zielenic w warunkach beztlenowych. Przykładowymi gatunkami są *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella fusca*, *Scenedesmus obliquus*. Fotoprodukcja wodoru przez mikroskopijne glony znajduje się w centrum zainteresowania badaczy, gdyż stanowi potencjalne źródło odnawialnego wodoru z wody i energii słonecznej. Mechanizm tego zjawiska wygląda w następująco. Energia świetlna absorbowana jest przez transbłonowy kompleks polipeptydów zwany fotosystemem II, który katalizuje transport elektronów

z wody do plastochinolu według reakcji opisanej przez równanie 3. Proces ten stymulowany jest światłem.

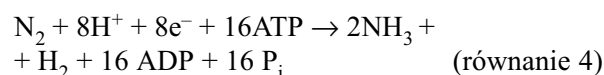


Następnie elektrony są przenoszone z plastochinolu na plastocyjaninę przez cytochrom *bf*. A dalej inny transbłonowy kompleks peptydowy zwany fotosystemem I przenosi je na ferredoksynę. Hydrogenaza, enzym odpowiedzialny za produkcję wodoru (patrz rozdz. 2.7), odbiera elektrony ze zredukowanej ferredoksyny i redukując protony uwalnia wodór. W warunkach tlenowych wodór wykorzystywany jest do redukcji dwutlenku węgla. Aby nastąpiła produkcja wodoru przez zielenice wymagana jest inkubacja glonów w warunkach beztlenowych od kilku minut do kilku godzin. Czas ten jest niezbędny do indukcji białek odpowiedzialnych za produkcję wodoru, w tym najważniejszego, czyli hydrogenazy. Hydrogenazy są bardzo wrażliwe na tlen. Tak więc aby nastąpiła produkcja wodoru musi istnieć oddzielenie czasowe i przestrzenne etapu prowadzącego do powstawania tlenu od etapu prowadzącego do tworzenia wodoru. Taki stan może być osiągnięty, gdy hodowla zielenic zostanie umieszczona w środowisku ubogim w siarkę. W warunkach niedoboru siarki następuje zahamowanie syntezy białka D1, podjednostki części rdzeniowej fotosystemu II, która ulega częstej wymianie. Białko D1 jest bogate w aminokwasy zawierające siarkę jak cysteina i metionina. W opisanych warunkach w krótkim czasie produkcja tlenu i absorpcja dwutlenku węgla ustają i tworzy się wodór. Uwalnianie wodoru stymuluje syntezę ATP w komórce. Konstruowane są mutanty, które posiadałyby hydrogenazy odporne na tlen i produkowałyby wodór w warunkach tlenowych [25, 30, 44]. W komórkach zielenic wykryto liazę pirogronian:mrówczan (PFL) jak również oksydoreduktazę pirogronian : ferredoksyna i inne enzymy umożliwiające oddychanie w warunkach beztlenowych [6].

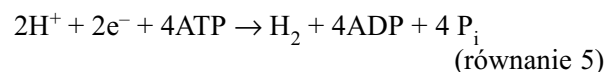
2.2. Pośrednia biofotoliza

Wodór produkowany jest również przez sinice, prokariotyczne fotosyntetyzujące organizmy. Fotosynteza przebiega podobnie jak u roślin. Proces, który prowadzi do powstawania wodoru to tzw. pośrednia fotoliza. Wiele gatunków sinic potrafi wiązać azot atmosferyczny redukując go do amoniaku. Sinice mają bardzo ubogie wymagania pokarmowe. Potrzebują dwutlenku węgla i azotu z powietrza, wody, soli mineralnych i światła jako jedyne źródła energii. Fotoliza pośrednia jest procesem dwuetapowym. Pierwszym etapem jest normalna fotosynteza w wyniku której następuje redukcja dwutlenku węgla do węglowodanów. Dwu-

tlenek węgla jest więc nośnikiem elektronów i protonów powstałych w wyniku rozkładu cząsteczki wody. W drugim etapie węglowodany ulegają rozkładowi częściowo na drodze fermentacji a częściowo przy udziale fotosystemu I pod wpływem światła. Następuje przeniesienie elektronów z cząsteczki cukru na ferredoksynę za pośrednictwem białek fotosystemu I pod wpływem energii świetlnej. W powstawaniu wodoru w procesie pośredniej fotolizy istotną rolę odgrywają trzy enzymy, nitrogenaza i dwie hydrogenazy NiFe, jedna pobierająca, która rozkłada cząsteczkę wodoru do dwóch protonów i dwóch elektronów (ang. *uptake hydrogenase*), druga prowadząca dwukierunkową reakcję: $\text{H}_2 \leftrightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$. Nitrogenaza katalizuje reakcje redukcji azotu atmosferycznego do amoniaku z jednoczesną redukcją protonu i uwolnieniem wodoru według reakcji opisanej przez równanie 4. Jest to reakcja bardzo energochłonna.



Nitrogenaza może również redukować protony do wodoru cząsteczkowego zgodnie z reakcją opisaną przez równanie 5:



Nitrogenaza jest kompleksem białkowym składającym się z dwóch białek, reduktazy dinitrogenazy (zwanej białkiem Fe) zbudowanej z dwóch podjednostek, produktów genu *nifH* oraz dinitrogenazy (zwanej białkiem MoFe), która jest heterotetramerem $\alpha_2\beta_2$ utworzonym z białek kodowanych przez geny *nifD* (podjednostka α) i *nifK* (podjednostka β). Dinitrogenaza reduktaza odbiera elektrony od zewnętrznego donora typu ferredoksyna i przekazuje je dinitrogenazie, która przeprowadza właściwą reakcję redukcji substratu. Proces wiązania azotu jest kontrolowany i regulowany przez wiele innych jeszcze białek. Nitrogenaza jest bardzo wrażliwa na tlen. Wielokomórkowe sinice np. z rodzaju *Nostoc*, *Anabaena*, *Oscillatoria* czy *Calothrix*, które tworzą filamenty, posiadają wyspecjalizowane komórki, tzw. heterocysty, w których zachodzi proces absorpcji azotu cząsteczkowego. Heterocysty zapewniają warunki beztlenowe niezbędne dla funkcjonowania nitrogenazy. Są otoczone grubą ścianą komórkową ograniczającą dyfuzję tlenu, nie posiadają kompleksu białkowego fotosystemu II, odznaczają się podwyższoną konsumpcją tlenu w oddychaniu komórkowym. Substratem dla hydrogenazy katalizującej reakcję jednokierunkową, czyli rozkład cząsteczki wodoru do protonów i elektronów, jest wodór produkowany w trakcie redukcji azotu. Powstałe protony mogą być wykorzystane do redukcji kolejnej cząsteczki azotu. Hydrogenaza ta składa się z dwóch

białek HupL oraz HupS i jest mało wrażliwa na tlen. Zawsze towarzyszy ona nitrogenazie. Konstruuje się mutanty z nieaktywną hydrogenazą pobierającą w celu zwiększenia produkcji wodoru przez sinice. Druga hydrogenaza, prowadząca reakcję dwukierunkową, występuje zarówno u gatunków mających jak i nie mających zdolności do wiązania azotu atmosferycznego. Zbudowana jest ona z dwóch podjednostek, diaforazy, która odbiera elektrony z cząsteczki NADH, w skład której wchodzi białka HoxU i HoxF oraz hydrogenazy utworzonej przez białka HoxH i HoxY. Jej rola nie jest dokładnie poznana. Prawdopodobnie usuwa nadmiar siły redukującej w postaci NADH w warunkach beztlenowych. Najintensywniejsza produkcja wodoru ma miejsce w warunkach niedoboru azotu. Są też gatunki wiążące azot a nie tworzące heterocyst. Należą do nich jednokomórkowe sinice z rodzaju *Synechococcus*, *Microcystis*, *Gloebacter*, *Aphanocapsa*. Aby była możliwa produkcja wodoru musi nastąpić oddzielenie w czasie tego procesu od procesu fotosyntezy [9, 68, 77]. Wydajność produkcji wodoru w procesach biofotolizy bezpośredniej i pośredniej jest niska [34].

2.3. Fermentacje bakteryjne

Fermentacja jest typem oddychania beztlenowego o niskiej wydajności energetycznej, w którym ostatecznym akceptorem elektronów są produkty rozkładu substratu oddechowego (donora elektronów). Brak jest zewnętrznego akceptora elektronów. W czasie fermentacji tworzą się różnorodne, zależne od typu fermentacji, związki organiczne oraz gazy (dwutlenek węgla i wodór). Obecność i ilość powstałego wodoru zależy od rodzaju fermentacji. Na podstawie dominującego charakterystycznego produktu końcowego wyróżniamy następujące typy fermentacji bakteryjnej: mlekowa (homo- i heterofermentacja), propionowa, alkoholowa, kwasów mieszanych (mrówkowa), masłowo-butanolowa. Fermentacje mlekowa, propionowa, alkoholowa nie mają znaczenia w produkcji wodoru. Fermentacjami wodorowymi są fermentacja masłowo-butanolowa oraz fermentacja kwasów mieszanych. Podczas fermentacji masłowo-butanolowej tworzą się kwas masłowy, butanol, wodór, dwutlenek węgla, kwas octowy oraz inne związki jak aceton, 2-propanol, etanol, kwas mlekowy, kwas kapronowy, acetoina. Z dotychczasowej wiedzy wynika, że fermentacja ta jest charakterystyczna przede wszystkim dla przetrwalnikujących bakterii z rodzaju *Clostridium* oraz innych nie tworzących zarodników, np. bakterii żwaczowych. Znanymi bakteriami prowadzącymi fermentację kwasów mieszanych są bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, także gatunki rodzaju *Bacillus*, a do końcowych produktów procesu należą kwas mrówkowy, kwas octowy, etanol, wodór, dwutlenek węgla, kwas mlekowy, a także kwas bursztynowy,

glicerol, acetoina i 2,3-butanodiol. *Enterobacteriaceae* są dużą rodziną bakterii, do której należy wiele gatunków symbiotycznych zamieszkujących przewód pokarmowy ludzi i zwierząt oraz patogennych. Należą tu następujące przykładowe gatunki: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, rodzaj *Citrobacter* i wiele innych. Są to Gram-ujemne, nie tworzące przetrwalników fakultatywne beztlenowce [72].

2.3.1. Powstawanie pirogronianu

Większość fermentacji to fermentacje glikolityczne, czyli ich pierwszym etapem jest glikoliza inaczej szlak fruktozo-1,6-bifosforanowy (szlak Embdena-Meyerhoffa-Parnasa). W wyniku glikolizy następuje przekształcenie glukozy w pirogronian. Pierwszym etapem glikolizy jest przekształcenie glukozy we fruktozo-1,6-bifosforan w wyniku reakcji fosforylacji i izomerizacji. Następnie fruktozo-1,6-bifosforan jest rozszczepiany na dwa izomeryczne związki trójwęglowe: aldehyd 3-fosfoglicerynowy i fosfodihydroksyaceton. W efekcie działania izomerazy triozofosforanowej z fosfodihydroksyacetonu tworzy się aldehyd 3-fosfoglicerynowy. Dwie cząsteczki aldehydu 3-fosfoglicerynowego ulegają przekształceniu do dwóch cząsteczek 1,3-bifosfoglicerynianu. Kolejną reakcją katalizuje kinaza fosfoglicerynianowa, w wyniku czego z 1,3-bifosfoglicerynianu powstaje ATP i 3-fosfoglicerynian. Ostatnim etapem jest przekształcenie 3-fosfoglicerynianu w pirogronian przy jednoczesnym powstaniu cząsteczki ATP. Podsumowując, produktami rozkładu 1 cząsteczki glukozy w procesie glikolizy są 2 cząsteczki pirogronianu, 2 cząsteczki ATP (zysk netto) i 2 cząsteczki NADH [76].

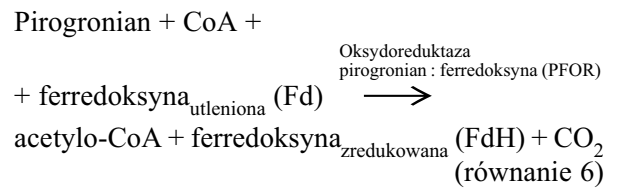
Pirogronian może powstać też w szlaku 2-keto-3-deoksy-6-fosfoglukanowym (szlak Entnera-Doudoroffa) a aldehyd 3-fosfoglicerynowy w szlaku pentozofosforanowym (szlak Warburga-Dickensa-Horeckera). W szlaku Entnera-Doudoroffa glukozo-6-fosforan ulega odwodorowaniu do 6-fosfoglukanianu przez dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową. Powstaje wtedy 1 cząsteczka NADPH. Następnie w wyniku działania dehydratazy fosfoglukanionowej powstaje 2-keto-3-deoksy-6-fosfoglukanian, który rozszczepiany jest do pirogronianu i aldehydu 3-fosfoglicerynowego przez aldolazę 2-keto-3-deoksyfosfoglukanionową. Dalej aldehyd 3-fosfoglicerynowy przekształcany jest do pirogronianu. W szlaku Entnera-Doudoroffa z 1 cząsteczki glukozy powstają 2 cząsteczki pirogronianu, 1 cząsteczka NADPH, 1 cząsteczka NADH i 1 cząsteczka ATP. U bakterii fermentacyjnych mogą występować różne odmiany tego szlaku. Pirogronian jest substratem wyjś-

ciowym do dalszych przemian w procesach fermentacji. W fermentacji mlekowej ulega przekształceniu w mleczan, w fermentacji alkoholowej w etanol, w fermentacji propionowej w szczawiooctan. W fermentacjach masłowo-butanolowej i kwasów mieszanych pirogronian jest utleniany do acetylo-koenzymu A (acetylo-CoA) [72, 76]. Pirogronian może powstać też z innych substratów co zostało opisane w rozdziale 2.3.5.

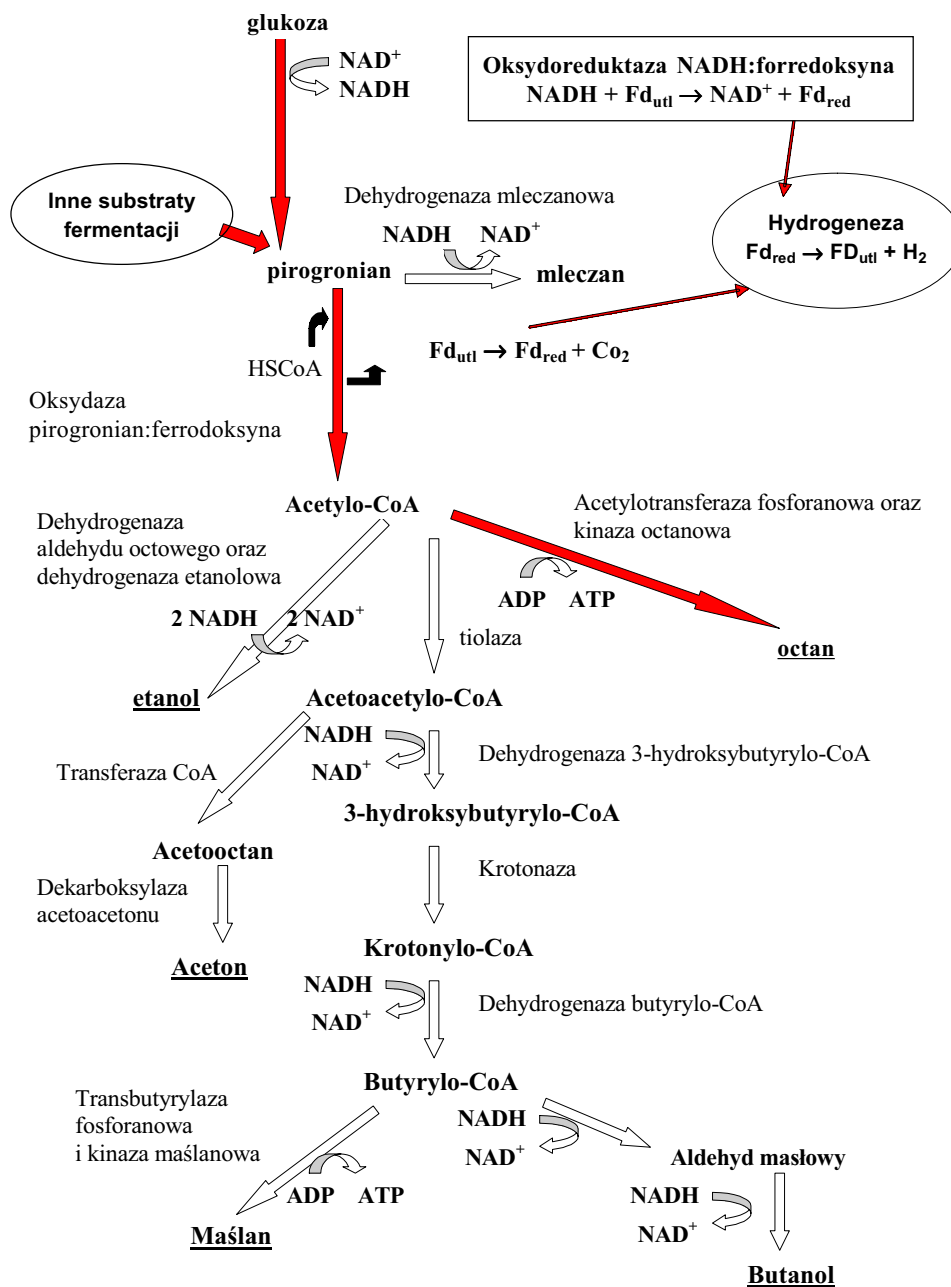
2.3.2. Fermentacja masłowo-butanolowa

Wzorcowy schemat przebiegu fermentacji masłowo-butanolowej na przykładzie *Clostridium acetobutylicum* przedstawia rysunek 1. Reakcja utleniania pirogro-

nianu do acetylo-CoA katalizowana jest przez oksydoreduktazę pirogronian:ferredoksyna (PFOR, *pyruvate:ferredoxin oxidoreductase*) przy udziale ferredoksyny, która ulega redukcji według równania 6:

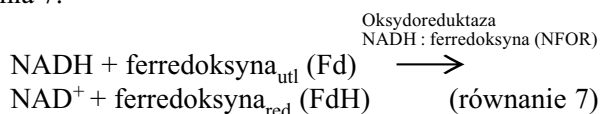


Ferredoksyna jest niewielkim rozpuszczalnym w wodzie białkiem zawierającym centrum żelazowo-siarkowe [4Fe-4S] połączone z resztami cysteiny. Z acetylo-CoA tworzy się szereg produktów fermentacji jak



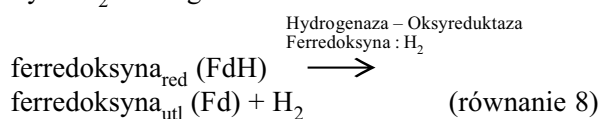
Rys. 1. Schemat przebiegu fermentacji masłowo-butanolowej prowadzonej przez *Clostridium acetobutylicum*. Zaznaczono szlaki prowadzące do powstania wodoru

kwasy organiczne, etanol czy butanol. Zredukowana ferredoksyna może też powstać w reakcji z NADH przy udziale oksydoreduktazy NADH:ferredoksyna (NFOR, ang. *NADH:ferredoxin oxidoreductase*) według równania 7:



NADH pochodzi z procesu glikolizy lub szlaku Entnera-Doudoroffa.

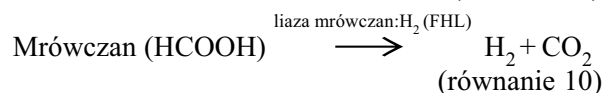
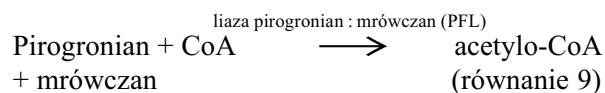
Następnie wodór jest uwalniany w reakcji prowadzonej przez hydrogenazę – oksydoreduktazę ferredoksyna:H₂ według równania 8:



Hydrogenazy przenoszą elektrony z wewnątrzkomórkowych nośników elektronów na protony. Protony są akceptorami elektronów i ulegają redukcji. Protony są słabymi akceptorami elektronów i wymagają silnego czynnika redukującego. Aktywność enzymów PFOR i NFOR jest regulowana przez stężenie wyprodukowanego wodoru. Ciśnienie cząsteczkowe wodoru wyższe niż 60 Pa hamuje aktywność białka NFOR. W tych warunkach w komórce występuje równowaga stężeń utlenionych oraz zredukowanych form ferredoksyny i NADH. Produkcja wodoru staje się niekorzystna termodynamicznie, więc powstają inne produkty fermentacji jak maślan, mleczan, czy etanol. Białko PFOR jest natomiast aktywne, gdy ciśnienie cząsteczkowe wodoru wynosi do 3×10^4 Pa. Zatem im niższe ciśnienie cząsteczkowe wodoru tym wydajniejsza produkcja wodoru [4, 29]. Mleczan tworzy się w wyniku redukcji pirogronianu. Etanol powstaje w wyniku redukcji acetylo-CoA przez dehydrogenazę aldehydu octowego oraz dehydrogenazę etanolową. Acetylotransferaza fosforanowa oraz kinaza octanowa przekształcają acetylo-CoA do octanu. Tiolaza katalizuje reakcję kondensacji dwóch cząsteczek acetylo-CoA w wyniku czego tworzy się acetoacetylo-CoA, który ulega redukcji przez dehydrogenazę 3-hydroksybutyrylo-CoA do 3-hydroksybutyrylo-CoA. Ten związek ulega dalej dehydratacji przez krotonazę do krotonylo-CoA, który z kolei jest redukowany do butyrylo-CoA przez dehydrogenazę do butyrylo-CoA. Przy udziale transbutyrylasy fosforanowej i kinazy maślanowej powstaje maślan. Dehydrogenaza aldehydu masłowego i dehydrogenaza butanolowa przekształcają butyrylo-CoA w butanol. Z acetoacetylo-CoA może powstać też aceto-octan, z którego po dekarboksylacji tworzy się aceton. Aceton może ulec redukcji do 2-propanolu. Końcowymi produktami fermentacji masłowo-butanolowej są więc maślan, octan, mleczan, etanol, butanol, aceton, dwutlenek węgla i wodór [26, 29].

2.3.3. Fermentacja kwasów mieszanych

W fermentacji kwasów mieszanych w wyniku przekształcenia pirogronianu katalizowanej przez liazę pirogronian : mrówczan (PFL, *pyruvate formate-lyase*) według równania 9 oprócz acetylo-CoA powstaje też mrówczan, który ulega rozkładowi do dwutlenku węgla i wodoru pod wpływem liazy mrówczan:H₂ (FHL, *formate hydrogenlyase*) według równania 10.

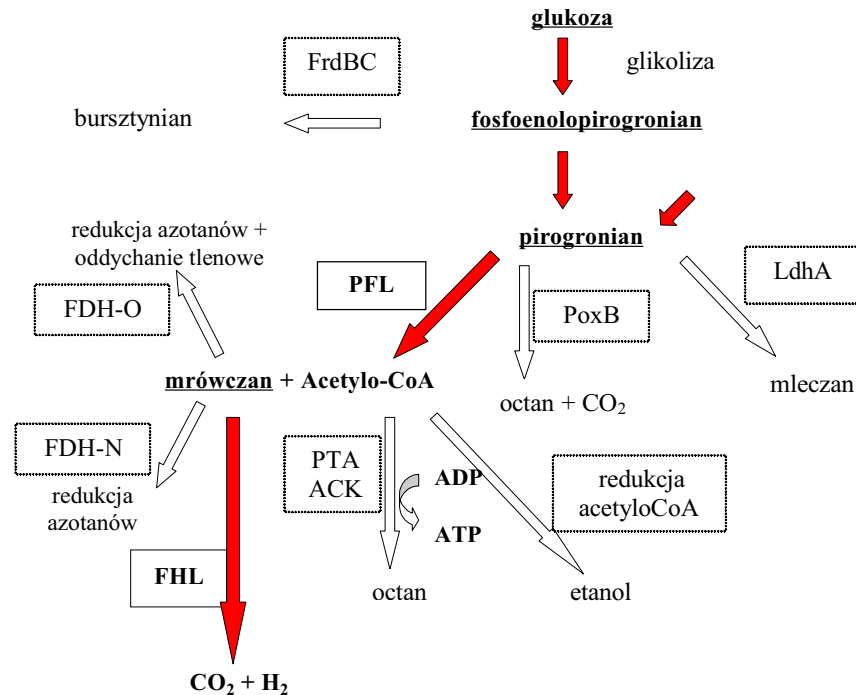


Wyróżniamy 2 typy fermentacji mieszanej, typ *E. coli* i typ *Enterobacter*. Produktami fermentacji typu *E. coli* są etanol, octan, mleczan i bursztynian. Bursztynian powstaje w wyniku przekształcenia fosfoenolpirogronianu przez reduktazę fumaranową FrdBC, mleczan w wyniku przekształcenia pirogronianu przez dehydrogenazę mleczanową LdhA, octan w wyniku przekształcenia pirogronianu przez oksydazę pirogronianu PoxB oraz acetylo-CoA przez acetylotransferazę fosforanową PTA i kinazę octanową ACK a etanol w wyniku redukcji acetylo-CoA (rys. 2) [49, 71]. Natomiast w fermentacji typu *Enterobacter* kwasów tworzy się niewiele a przeważają acetoina, 2,3-butanodiol oraz diacetyl. Acetoina powstaje z dwóch cząsteczek pirogronianu, 2,3-butanodiol to produkt redukcji acetonu, diacetyl tworzy się w efekcie utleniania się acetoiny na powietrzu [72]. Ponadto uważa się, że w fermentacji typu *Enterobacter* wodór powstaje również z NADH przy udziale oksydoreduktazy NADH:ferredoksyna jak opisano dla fermentacji masłowo-butanolowej. Tworzy się wtedy zredukowana ferredoksyna (wg równania 7) a wodór jest uwalniany w reakcji prowadzonej przez hydrogenazę – oksydoreduktazę ferredoksyna:H₂ (wg równania 8). Ma to miejsce przy wysokim poziomie NADH w komórce [58].

Do *Enterobacteriaceae* należy rodzaj *Citrobacter*. Są to fakultatywne beztlenowce o wysokiej wydajności produkcji wodoru (2.49 mola H₂ na 1 mol glukozy). Bakterie te zdolne są również do produkcji wodoru z tlenku węgla i wody [62]. Zjawisko to jest dobrze poznane dla bakterii fotosyntetyzujących i opisane w rozdziale 2.4.

2.3.4. Regulacja produkcji wodoru w czasie fermentacji kwasów mieszanych

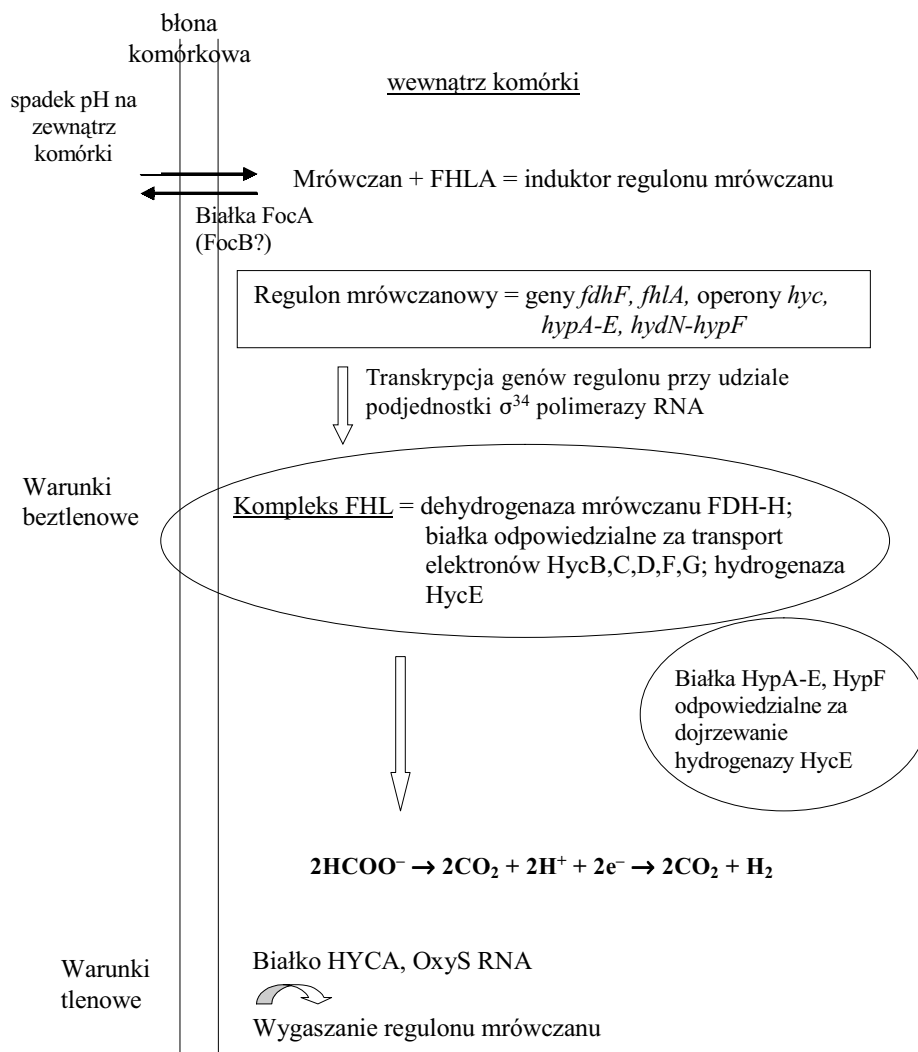
Regulacja wytworzenia wodoru w czasie fermentacji kwasów mieszanych zostanie omówiona na przykładzie modelowego przedstawiciela rodziny *Enterobacteriaceae*, bakterii *Escherichia coli*. Podobnie jak

Rys. 2. Schemat fermentacji kwasów mieszanych u *Escherichia coli*.

FrdBC – reduktaza fumaranowa, LdhA – dehydrogenaza mleczanowa, PoxB – oksydaza pirogronianu, FDH-O i FDH-N – dehydrogenazy mrówczanu, PTA – acetylotransferaza fosforanowa, ACK – kinaza octanowa, PFL – liaza pirogronian:mrówczan, FHL – liaza mrówczan:wodór. Zaznaczono szlak prowadzący do powstania wodoru

inne bakterie z tej rodziny jest ona fakultatywnym beztlenowcem. Globalnymi regulatorami kontrolującymi ekspresję genów kodujących enzymy oddychania tlenowego i beztlenowego są kompleks ArcAB i białko FNR wrażliwe na stężenie tlenu i potencjał oksydoredukcyjny w komórce [2, 40]. W warunkach tlenowych pirogronian ulega oksydatywnej dekarboksylacji przez dehydrogenazę pirogronianu (PDHc, *pyruvate dehydrogenase complex*) do acetylo-CoA i włączany jest w cykl Krebsa. W warunkach anaerobowych lub mikroanaerobowych następuje aktywacja liazy pirogronian:mrówczan (PFL), która przekształca część pirogronianu w mrówczan. Z pirogronianu może powstać też mleczan i octan a z fosfoenolopirogronianu bursztynian. Stwierdzono, że ok. 33% glukozy ulega przekształceniu w kwas mrówkowy, który gromadzi się w cytoplazmie i powoduje zakwaszenie środowiska komórki. Mrówczan może być metabolizowany w komórce na 3 różne sposoby. Metabolizm mrówczanu jest więc istotnym elementem fermentacji kwasów mieszanych i produkcji wodoru. W komórce *E. coli* wykryto 3 dehydrogenazy mrówczanowe. Pierwsza to białko FDH-N, produkt operonu *fdnGHI*, syntetyzowane, gdy komórki rosną w warunkach beztlenowych w obecności azotanów. Enzym ten przeprowadza utlenianie mrówczanu przy jednoczesnej redukcji azotanów z udziałem reduktazy azotanowej. Drugą dehydrogenazę mrówczanową, białko FDH-O, koduje operon *fdoGHI*, gdy pojawiają się warunki tlenowe oraz gdy

w podłożu znajdują się akceptory elektronów w postaci azotanów. Obie dehydrogenazy są białkami błonowymi a ich centra aktywne znajdują się od strony perioplazmy. Trzecia dehydrogenaza mrówczanowa to produkt genu *fdhF*, białko FDH-H, którego ekspresja zachodzi w warunkach fermentacyjnych, gdy brak zewnętrznych akceptorów elektronów. Centrum aktywne FDH-H zawiera selen oraz molibden i skierowane jest do wnętrza cytoplazmy. Enzym ten jest kluczowym elementem kompleksu liazy mrówczan:wodór (FHL) odpowiedzialnej za rozkład kwasu mrówkowego do dwutlenku węgla i wodoru. FHL jest kompleksem białkowym zakotwiczonym w błonie komórkowej składającym się z siedmiu białek: FDH-H oraz 6 białek Hyc, produktów operonu *hyc*. Są to białka HycB, HycC, HycD, HycF i HycG odpowiedzialne za transport elektronów oraz białko HycE (Hyd-3), dehydrogenaza, jedna z czterech dehydrogenaz NiFe *E. coli*. Dehydrogenazy NiFe są omówione w rozdziale 2.7. Induktorem genu *fdhF* i genów operonu *hyc*, których produkty tworzą liazę mrówczan:wodór, jest sam kwas mrówkowy. W komórce istnieje regulon mrówczanowy w skład którego wchodzi ponadto operony *hypA-E*, *fhlA* oraz *hydN-hypF* (rys. 3). Geny te ulegają transkrypcji w warunkach obniżonego pH, przy akumulacji mrówczanu. Do ich transkrypcji wymagana jest podjednostka σ^{54} w polimerazie RNA. Białka HypA-E i HypF są odpowiedzialne za dojrzewanie dehydrogenazy Hyd-3 i formowanie kofaktora NiFe. Gen *fhlA*

Rys. 3. Schemat działania regulonu mrówczanu u *Escherichia coli*.

Objaśnienia w tekście

koduje białko FHLA, oddziaływujące z mrówczanem, które pełni funkcję induktora regulonu mrówczanu. FHLA łączy się z DNA w postaci tetrameru aktywując w ten sposób transkrypcję genów regulonu. Gen *fhla* ulega autoregulacji na zasadzie sprzężenia zwrotnego dodatniego. Wygaszanie regulonu następuje przez białko represorowe HYCA, produkt genu *hycA* oraz antysensowne RNA OxyS. Represor HYCA oddziałuje z białkiem induktorowym FHLA oraz z kompleksem FHLA z mrówczanem. OxyS jest 109 nukleotydowym fragmentem RNA, który nie ulega translacji i jest indukowany w warunkach stresu oksydacyjnego. Uważa się, że jest to globalny regulator ekspresji ok. 40 genów. Pokazano, że OxyS RNA wiąże się z sekwencją Shine-Dalgarno mRNA dla białka FHLA blokując miejsce wiązania rybosomy. W regulacji regulonu mrówczanowego ważną rolę odgrywa również transmembranowe białko FocA odpowiedzialne za transport mrówczanu do i na zewnątrz komórki. Należy ono do klasy białek transportujących kwasy organiczne. Mutanty

focA gromadzą mrówczan wewnątrz komórki w porównaniu ze szczepem dzikim. Wykazano, że kwas mrówkowy zostaje początkowo usunięty z komórki, a gdy pH podłoża ulega zakwaszeniu (spadek pH poniżej 6,8), jest pobierany z powrotem i ulega rozkładowi przez liazę FHL. Dokładny mechanizm transportu mrówczanu nie jest poznany. Prawdopodobnie bierze w nim udział również inne białko FocB (produkt genu *focB*). Powrót mrówczanu do komórki ma miejsce, gdy brak jest zewnętrznego akceptora elektronów jak azotany czy tlen. Ciekawe jest, że gen *focA* i *pfl* kodujący liazę pirogronian:mrówczan PFL tworzą wspólny operon *focApfl* [3, 21, 71].

2.3.5. Substraty fermentacji

Substratami fermentacji są przede wszystkim węglowodany. Powstawanie pirogronianu z glukozy jest podstawowym schematem rozważanym przy omawianiu procesów fermentacji. Jednak pirogronian może

powstawać z różnorodnych związków. Są to inne niż glukoza cukry proste, jak fruktoza, galaktoza, ksyluloza, arabinoza, ryboza. Cukry te mogą być włączane w cykl glikolityczny lub inne cykle (szlak 2-keto-3-deoksy-6-fosfoglukaniowy czy szlak pentozofosforanowy). Na przykład galaktoza może być przekształcona w glukozo-6-fosforan, a fruktoza w aldehyd glicerynowy i fosfodihydroksyaceton po uprzedniej fosforylacji do fruktozo-1-fosforanu. Substratami fermentacji są polisacharydy, jak np. celuloza, hemiceluloza, skrobia; dwucukry, jak np. sacharoza, maltoza po uprzedniej hydrolizie na cukry proste [34, 45].

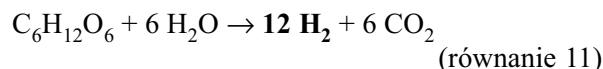
Kolejnymi związkami, z których w wyniku procesu fermentacji powstaje wodór są aminokwasy. Wiadomo, że w wyniku fermentacji glutaminy prowadzonej przez *Clostridium tetanomorphum*, *C. pascui*, *C. tetani*, *C. cochlearium*, *C. malenominatum*, *C. limosum* powstają amoniak, wodór, dwutlenek węgla, octan, maślan oraz etanol. Glutamina przekształcana jest do octanu i pirogronianu w wieloetapowym procesie. Produktami pośrednimi są 2-metylo-asparaginian, 2-metylo-fumarany, 2-metylo-jabłczan [11, 72, 80]. Stwierdzono, że wodór jest także produkowany przez bakterie fermentujące glicynę, np. *Peptococcus anaerobius* oraz treoninę, np. *Clostridium propionicum* [11].

Znaczącą produkcję wodoru obserwowano dla hodowli *Enterobacter aerogenes* [32] oraz *Klebsiella pneumoniae* [46] rosnących na podłożach bogatych w glicerol. Głównymi produktami fermentacji były etanol i wodór. Inna bakteria *Clostridium kluyveri* prowadzi fermentację etanolu i octanu lub bursztynianu w wyniku której powstaje maślan, kaprońian oraz wodór [36]. Wyizolowano bakterię *Clostridium dolis*, która prowadzi fermentację mieszaniny kwasów mlekowego i octowego, której produktem są wodór i kwas masłowy [53].

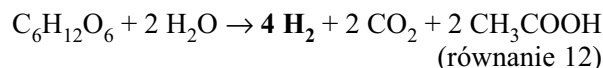
W związku z dużymi nadziejami jakie wiąże się z wodorem jako paliwem w przyszłości uzyskiwanym z biomasy, znaczna część badań naukowych i publikowanych prac dotyczy produkcji wodoru z różnorodnych odpadów organicznych, takich jak odpady przemysłu rolno-spożywczego, zwłaszcza bogate w skrobię i celulozę [4, 34, 53, 63], melasa [69], odpady przemysłu tłuszczowego [23], odpady bogate w keratynę [7], obornik i odchody innych zwierząt [15, 84, 90], odpady z produkcji biopaliw [32, 46], odpady przemysłu papierniczego [78].

2.3.6. Wydajność produkcji wodoru w procesie fermentacji

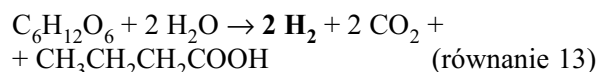
Gdyby biomasę potraktować jako cukry proste typu glukoza to w wyniku całkowitego rozkładu 1 mola glukozy powstałoby 12 moli wodoru zgodnie z równaniem 11:



Rozważając równania 6–8 z rozdziału 2.3.2., w optymalnych warunkach w czasie fermentacji z jednego mola glukozy można otrzymać 4 mole wodoru (2 mole w wyniku działania białka PFOR i 2 mole w wyniku działania białka NFOR), 4 mole dwutlenku węgla i 2 mole octanu zgodnie z reakcją opisaną przez równanie 12. Jest to maksymalna ilość wodoru jaką można uzyskać w procesie fermentacji z 1 mola glukozy.



Jest to więc 33% wartości przedstawionej przez równania 6 i 11. W rzeczywistości jest to mniej, bo 8–20%, czyli 1–2,5 mola wodoru z 1 mola glukozy. Tworzenie kwasu masłowego obniża ilość powstałego wodoru do 2 moli (równanie 13):



Powstawanie kolejnych produktów fermentacji (inne kwasy organiczne, alkohole) powodują dalsze obniżenie ilości wyprodukowanego wodoru [4, 40, 48]. Natomiast maksymalna teoretyczna wydajność fermentacji mieszanej wynosi 2 mole wodoru na 1 mol glukozy [87].

Szacuje się, że wydajność produkcji wodoru powinna wynosić 60–80%, aby produkcja wodoru z biomasy była opłacalna z ekonomicznego punktu widzenia [8, 48]. Stąd duże zainteresowanie sposobami zwiększania wydajności produkcji wodoru. W pracach spotkać można różny sposób przedstawienia wydajności produkowanego wodoru w procesach fermentacji. Jedni autorzy pokazują to jako liczbę moli wodoru na 1 mol substratu rozłożonego, inni na 1 mol substratu dodanego do pożywki. Jeszcze inni pokazują produktywność wodoru w %, gdzie za 100% przyjmuje się ilość moli wodoru powstałego z całkowitego rozkładu 1 mola substratu (12 moli wodoru w przypadku rozkładu cząsteczki glukozy) [41]. Często podaje się tempo produkcji wodoru w jednostkach objętości produkowanego gazu w jednostce czasu (np. ml/h) zaznaczając objętość hodowli, jej gęstość lub liczebność bakterii czy też suchą masę. Można też wyliczyć ilość mmoli wodoru na gram suchej masy [57], ilość mmoli wodoru na godzinę na litr hodowli ([86], ilość μmoli wodoru na mg białka [49] itp.

2.3.7. Sposoby zwiększania wydajności produkcji wodoru w procesach fermentacji

W bioreaktorach, gdzie zachodzi fermentacja i produkowany jest wodór, rozwijają się zazwyczaj trzy grupy mikroorganizmów. Oprócz producentów wodoru

pojawiają się tam bakterie, które wykorzystują wodór w swoich procesach życiowych. Są to metanogeny i acetogeny, a produktami ich metabolizmu są odpowiednio metan i kwas octowy. Zatem istotnym czynnikiem w optymalizacji produkcji wodoru jest ograniczenie procesów metanogenezy i acetogenezy. Archeony metanogenne są bezwzględnie beztlenowcami, wytwarzają metan w przemianie octanu i redukcji wodoru CO₂ w warunkach beztlenowych. Bakterie acetogenne produkują kwas octowy z wodoru i dwutlenku węgla wg reakcji opisanej przez równanie 14:



Jednym ze sposobów hamowania procesów metanogenezy i acetogenezy jest traktowanie hodowli wysoką temperaturą 80–104°C przez 15–120 min. Selekcjonowane są wtedy bakterie fermentujące o dużej produkcji wodoru, zdolne do wytwarzania zarodników z rodzaju *Clostridium*, *Bacillus* czy *Thermoanaerobacterium*. W takich warunkach giną jednak bakterie produkujące jak np. z rodzaju *Enterobacter* czy *Citrobacter* wodór a nie zarodnikujące. W *inoculum* mogą pozostać też tworzące spory bakterie octowe (z rodzaju *Acetobacterium*, *Sporomusa* czy *Clostridium*), bakterie propionowe, bakterie kwasu mlekowego czy bakterie wykorzystujące wodór do redukcji siarczanów [41]. Pokazano, że efektywną metodą poprawiającą produkcję wodoru jest traktowanie hodowli związkami chemicznymi, które specyficznym hamują rozwój metanogenów i procesy metanogenezy jak kwas 2-bromoetanosulfonowy (BESA) czy jodopropan. Podobne efekty przynosi prowadzenie hodowli bakterii w warunkach obniżonego pH do ok. 5,5 czy traktowanie *inoculum* kwasem. Należy tu zaznaczyć, że gdy fermentacja przebiega w optymalnych warunkach, następuje spadek pH hodowli do wartości ok. 5,0 na skutek produkcji kwasów organicznych, co w naturalny sposób hamuje rozwój metanogenów. Kolejną metodą ograniczającą tworzenie metanu i zwiększającą produkcję wodoru jest pulsowe napowietrzenie hodowli bakteryjnej [89].

Innym podejściem do zwiększenia wydajności produkcji wodoru jest dążenie do osiągnięcia warunków fermentacji, w których następuje ograniczenie powstawania różnorodnych produktów końcowych. W przypadku fermentacji masłowo-butanolowej celem jest osiągnięcie warunków opisanych przez równanie 12. Przypomnijmy, że ciśnienie cząsteczkowe wodoru wyższe niż 60 Pa hamuje aktywność białka NFOR. W przypadku fermentacji kwasów mieszanych celem jest uzyskanie jak największej produkcji kwasu mrówkowego. Wiąże się to z utrzymywaniem niskiego ciśnienia cząsteczkowego wodoru w hodowli, co sprzyja jego produkcji. Stosuje się różne techniki usuwania gazów fermentacyjnych (wodór i dwutlenek węgla) rozpusz-

czonych w hodowli bakterii. Jednoczesne usuwanie wodoru i dwutlenku węgla zapobiega procesowi powstawania kwasu octowego. Najczęstszą techniką obniżania stężenia rozpuszczonych gazów fermentacyjnych w bioreaktorach, gdzie produkowany jest wodór, stanowi ich wypieranie przez przedmuchiwanie innym gazem obojętnym (ang. *gas sparging*). Stosuje się tu zwykle argon i azot, a także metan czy dwutlenek węgla. Wzrost produkcji wodoru w takich warunkach obserwuje się zarówno w hodowlach czystych kultur np. *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, *Rhodospseudomonas palustris*, jak i mieszanych [41, 59].

Innymi metodami są wytrząsanie czy mieszanie hodowli fermentacyjnych, co sprzyja przechodzeniu gazów metabolicznych z fazy ciekłej do przestrzeni nad hodowlą w reaktorze. Pokazano też, że sposobem na zwiększenie produkcji wodoru może być obniżenie ciśnienia cząsteczkowego wodoru w atmosferze nad hodowlą bakteryjną. Obniżenie ogólnego ciśnienia gazów w kolbie z hodowlą *Enterobacter cloacae* z 760 mmHg do 380 mmHg przez zastosowanie pompy perystaltycznej zwiększyło wydajność produkcji wodoru z 1,9 mola H₂ na 1 mol glukozy do 3,9 mola H₂ na 1 mol glukozy. Użyty szczep był mutantem charakteryzującym się podwyższoną produkcją wodoru w stosunku do szczepu dzikiego w wyniku zaburzeń w funkcjonowaniu szlaków syntezy alkoholi i kwasów organicznych. W eksperymencie tym ponadto pochłaniany był dwutlenek węgla przez roztwór KOH [50]. Zastosowanie roztworu KOH jest znaną metodą usuwającą dwutlenek węgla, co również zwiększa ilość produkowanego wodoru w procesie fermentacji. Zbyt wysokie ciśnienie cząsteczkowe dwutlenku węgla, powyżej 0,5 atm działa hamująco na wzrost bakterii oraz zmniejsza różnorodność gatunkową w kulturach mieszanych [41, 44].

Stwierdzono, że dodanie kwasu mrówkowego w warunkach beztlenowych do hodowli bakterii prowadzących fermentację kwasów mieszanych, np. *Enterobacter aerogenes* zwiększa produkcję wodoru. Jest to wynik podwyższenia indukcji białka FHL przez zwiększone stężenie mrówczanu w komórce. Egzogennie podany kwas mrówkowy jest transportowany do wnętrza komórki. Uważa się, że w tych warunkach następuje również podwyższenie poziomu NADH w komórce, który wykorzystywany jest do produkcji wodoru [43].

Innym podejściem do problemu zwiększania wydajności produkcji wodoru w procesie fermentacji są próby modyfikacji genetycznych bakterii. Obecne metody genetyczne umożliwiają stworzenie mutantów, które mają zablokowane pewne szlaki metaboliczne lub nadprodukują wybrane białka. Skonstruowano pochodne *E. coli* z delecją genu *hycA* oraz z nadekspresją genu *fhIA* z plazmidowego DNA. Mutanty te nie posiadały białka represorowego HycA dla regulonu mrówczanu lub nadprodukowały białko induktorowe

tego regulonu, lub niosły obie te cechy. W mutancie *hycA* nadprodukującym białko FHLA obserwowano 2,8-krotny wzrost tempa produkcji wodoru w porównaniu do dzikiego szczepu. Podwyższenie produkcji wodoru stwierdzono też w pojedynczym mutancie $\Delta hycA$ oraz w szczepie bez mutacji a nadprodukującym białko FHLA [86]. Ci sami autorzy skonstruowali kolejne mutanty *E. coli* z zablokowanymi szlakami produkcji kwasu mlekowego i kwasu bursztynowego w czasie fermentacji. Były to mutanty delecyjne *ldhA* i *frdBC*. Gen *ldhA* koduje dehydrogenazę mleczanową przekształcającą pirogronian w mleczan a gen *frdBC* reduktazę fumaranową, enzym szlaku syntezy bursztynianu z fosfoenolpirogronianu. Wydajność produkcji wodoru w podwójnym mutancie $\Delta ldhA \Delta frdBC$ wynosiła 1,87 mola H_2 na 1 mol glukozy w porównaniu ze szczepem dzikim (1,08 mola H_2 na 1 mol glukozy) i osiągnęła 90% maksymalnej teoretycznej wydajności dla fermentacji kwasów mieszanych (2 mole H_2 na 1 mol glukozy) [87]. Prowadzone w tej dziedzinie badania polegają na wprowadzaniu kolejnych mutacji w genomowym DNA i sprawdzaniu ich fenotypowych efektów. Skonstruowano szereg mutantów *E. coli* niosących mutacje w genach *hycA*, *hyaB* (kodującym hydrogenazę 1, patrz rozdz. 2.7), *hybC* (kodującym hydrogenazę 2, patrz rozdz. 2.7) oraz posiadających uszkodzenia w czterech innych genach spośród następujących: *fdnG* (kodującym podjednostkę α dehydrogenazy FDH-N), *fdoG* (kodującym podjednostkę α dehydrogenazy FDH-O), *focA*, *focB*, *frdC*, *ldhA*, *narG* (kodującym podjednostkę α reduktazy azotanów A), *poxB* (kodującym oksydazę pirogronianu) i *aceE* (kodującym dehydrogenazę pirogronianu). Mutanty te nadprodukowały też białko FHLA. Największą produkcję wodoru, 4,6 razy większą w porównaniu do szczepu dzikiego, uzyskano dla szczepu niosącego siedem mutacji: *hyaB*, *hybC*, *hycA*, *fdoG*, *frdC*, *ldhA* i *aceE* [49]. W innych badaniach na drodze mutagenetyzacji chemicznej stosując metanosulfoniam etylu otrzymano mutanta *Enterobacter cloacae* z zablokowanymi szlakami syntezy etanolu, butanodiolu i kwasów organicznych. Mutant ten wykazywał 1,5-krotny wzrost produkcji wodoru w porównaniu ze szczepem dzikim [42]. Warto tu zaznaczyć, że z jednej strony zmodyfikowane szczepy bakteryjne często wykazują spowolniony wzrost i wymagają warunków laboratoryjnych do hodowli, z drugiej zaś strony istnieją obawy przed przedostaniem się genetycznie modyfikowanych organizmów do środowiska naturalnego.

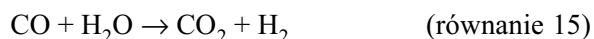
Znacznie bardziej obiecującym kierunkiem badań jest zastosowanie nowoczesnych metod biologii molekularnej do poszukiwania, selekcji, izolacji i identyfikacji nowych gatunków bakterii produkujących wodór z dużą wydajnością z naturalnych środowisk. Do metod tych należą głównie analiza genów kodują-

cych 16S rRNA oraz fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). Szacuje się, że do tej pory zostało wyhodowane i zbadane niewielki procent wszystkich mikroorganizmów występujących w przyrodzie [74]. Analiza sekwencji genu 16S rRNA oraz metoda FISH są w ostatnich latach stosowane do analizy molekularnej składu mikrobiologicznego hodowli w bioreaktorach, gdzie produkowany jest wodór w procesach fermentacji. Badane są również różne naturalne środowiska [1, 31, 33, 38, 53, 69, 73]. Oprócz genów kodujących 16S rRNA analizowane są również geny kodujące hydrogenazy [33]. W ten sposób wykrywa się nowe gatunki bakterii. Z gorących źródeł w chińskiej prowincji Fujian wyizolowano gatunek bakterii, który charakteryzuje się zdolnością do fermentacji różnych cukrów, wysoką wydajnością produkcji wodoru i tolerancją na tlen. Metodą analizy sekwencji 16S rRNA zidentyfikowano, że jest to *Klebsiella oxytoca* HP1. Bakteria ta rosnąc na pożywkę zawierającą sacharozę produkowała wodór z wydajnością 3,6 mola/mol sacharozy [57]. Nowe gatunki izoluje się z różnorodnych ścieków. Przykładami mogą być *Clostridium diolis* [53], *Bacillus coagulans* [39]. Wydajność produkcji wodoru dla *B. coagulans* była najwyższa w fazie stacjonarnego wzrostu i wynosiła 2,28 mola H_2 na 1 mol glukozy.

2.4. Fotofermentacja

Kolejnym procesem biologicznym, w którym produkowany jest wodór jest fotosynteza prowadzona przez bakterie beztlenowe. Do bakterii fotosyntetyzujących należą bakterie purpurowe i bakterie zielone. Wyróżnia się cztery grupy tych bakterii: zielone i purpurowe bakterie siarkowe, zielone i purpurowe bakterie bezsiarkowe. Fotosynteza bakteryjna w warunkach beztlenowych przebiega inaczej niż u roślin. Donorem wodoru i elektronów do wiązania dwutlenku węgla nie jest woda, ale związki siarki (siarkowodór, tiosiarczany, siarka) i wodór cząsteczkowy dla bakterii siarkowych oraz związki organiczne i wodór cząsteczkowy dla bakterii bezsiarkowych. W fotosyntezie bakteryjnej nie jest produkowany tlen, stąd jej nazwa – fotosynteza anoksygenowa. W błonach bakteryjnych znajdują się barwniki absorbujące energię świetlną oraz białka odpowiedzialne za transport elektronów. W wyniku transportu elektronów powstaje siła protomotoryczna i wytwarzana jest energia w postaci ATP. Elektrony przenoszone są na ferredoksynę i dalej na NAD^+ , w ten sposób produkowana jest siła redukująca w postaci NADH [72]. Do najlepiej poznanych bakterii fotosyntetyzujących, które produkują wodór należą bakterie purpurowe bezsiarkowe *Rhodospirillaceae* a wśród nich rodzaje *Rhodospseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodobacter*, *Rhodobium* wykorzystujące związki organiczne. Często badanym gatunkiem jest *Rhodospirillum*

rubrum. Do powstania wodoru u *Rhodospirillum rubrum* podobnie jak u innych bakterii bezsiarkowych dochodzi podczas redukcji azotu cząsteczkowego w wyniku aktywności nitrogenazy, która podobnie jak w przypadku sinic redukuje też protony do wodoru cząsteczkowego [17, 30]. Uważa się, że budowa i funkcjonowanie nitrogenazy bakterii purpurowych bezsiarkowych jest podobna do budowy nitrogenazy sinic i nie odbiega od ogólnego schematu dla nitrogenaz [13, 88]. Podobnie jak w przypadku sinic nitrogenazie towarzyszy hydrogenaza pobierająca Hup rozkładająca cząsteczkę wodoru do dwóch protonów i dwóch elektronów, która dostarcza protony do redukcji azotu. Mutanty wykazujące brak aktywności tej hydrogenazy wykazują podwyższoną produkcję wodoru zależną od nitrogenazy [37]. U *Rhodospirillum rubrum* wykryto jeszcze aktywności trzech innych hydrogenaz. Jedna pozwala też wykorzystywać wodór cząsteczkowy ze środowiska do redukcji dwutlenku węgla [37, 51]. Druga to hydrogenaza związana jest ze wzrostem w ciemności w warunkach fermentacji, rozkładająca mrówczan do dwutlenku węgla i wodoru, analogiczna do białka FHL *E. coli*. Oznacza to, że bakterie te przy braku światła prowadzą fermentację kwasów mieszanych [27, 51]. Trzecia hydrogenaza indukowana jest przez tlenek węgla i stanowi składnik kompleksu związanego z błoną komórkową utleniającego tlenek węgla według reakcji opisanej przez równanie 15:



Dehydrogenaza tlenu węgla, białko CODH, produkt genu *cooS* utlenia tlenek węgla do dwutlenku węgla przekazując elektrony i protony na podjednostkę przypominającą ferredoksynę, produkt genu *cooF*, skąd transportowane są do hydrogenazy, produkt genu *cooH*, w wyniku redukcji protonów powstaje wodór [22, 51]. Pokazano, że podając do hodowli *Rhodospirillum rubrum* gaz bogaty w tlenek węgla (ang. *syngas*), bakterie wytwarzają wodór [85]. Gaz (*syngas*) jest mieszaniną głównie tlenu węgla, dwutlenku węgla oraz wodoru i może być produktem gazyfikacji biomasy [19]. Niektóre purpurowe bakterie bezsiarkowe, np. *Rubrivivax gelatinosus*, są zdolne do wzrostu w warunkach gdzie jedynym źródłem węgla jest tlenek węgla a źródłem energii jest światło [52]. Zjawisko powstania wodoru reakcji z tlenkiem węgla i wody zostało też opisane dla przedstawiciela *Enterobacteriaceae*, rodzaju *Citrobacter* [62].

Jak wiadomo produktami ubocznymi fermentacji są kwasy organiczne (niskocząsteczkowe kwasy tłuszczowe) oraz alkohole. Kwasy organiczne nie są w żaden sposób wykorzystane przez bakterie fermentujące. Ponadto zbyt silne zakwaszenie podłoża (pH poniżej 5) powoduje zahamowanie produkcji wodoru. Kwasy organiczne i alkohole mogą natomiast stanowić źródło

elektronów i wodoru do redukcji dwutlenku węgla a także źródło węgla dla bakterii fotosyntetyzujących bezsiarkowych. Zjawisko to nazywamy fotofermentacją. Połączenie procesów fermentacji i fotofermentacji zwiększa wydajność produkcji wodoru [14, 17, 30]. Tworzy się układy dwuetapowe, w których najpierw ma miejsce fermentacja a potem produkty odpadowe z tego procesu stanowią substrat dla bakterii fotosyntetyzujących. Prowadzono hodowlę *Enterobacter cloacae* na podłożu zawierającym glukozę w warunkach beztlenowych, wydajność produkcji wodoru wynosiła 1,86 mola H₂ na 1 mol glukozy. Następnie podłoże z tej hodowli stanowiło pożywkę dla hodowli *Rhodobacter sphaeroides* w wyniku czego otrzymano 1,5–1,72 mola H₂ na 1 mol octanu [60]. W innym układzie badawczym zastosowano mieszaną hodowlę *Lactobacillus amylovorus* i *Rhodobium marinum* a substrat stanowiła bogata w skrobię biomasa zielenic. W pierwszym etapie skrobia z glonów była przekształcana w kwas mlekowy, który stanowił substrat dla bakterii fotosyntetyzujących [35]. Uważa się, że w optymalnych warunkach w wyniku połączenia procesów fermentacji i fotofermentacji możliwe jest nawet osiągnięcie 12 moli wodoru z jednego mola glukozy, czyli najwyższej możliwej teoretycznej wydajności produkcji wodoru z całkowitego rozkładu cząsteczki glukozy jak to opisuje równanie 11 [44].

2.5. Procesy fermentacyjne zachodzące w żwaczu

Żołądek przeżuwaczy jest rozbudowaną strukturą, przystosowaną do odżywiania się zwierząt pokarmem, którego podstawowym składnikiem jest biomasa roślinna. W pokarmie tym przeważają węglowodany: celuloza, hemiceluloza, pektyny, skrobia, fruktany, oligosacharydy i cukry proste. Żołądek przeżuwaczy składa się z czterech komór. Są to żwacz, czepiec, księgi i trawieniec. Żwacz przeżuwaczy stanowi swoisty beztlenowy ekosystem, jest komorą fermentacyjną, gdzie żyją liczne mikroorganizmy, bakterie, pierwotniaki (głównie orzęski) i grzyby. Część drobnoustrojów zasiedlających żwacz produkuje enzymy celulolityczne, hemicelulolityczne i pektynolityczne umożliwiające trawienie roślinnych węglowodanów strukturalnych. Produkty tego trawienia, cukry proste stanowią źródło energii dla żyjących tam mikroorganizmów. W wyniku procesów fermentacji w żwaczu produkowane są gazy, wodór i dwutlenek węgla, które stanowią substraty dla innych mikroorganizmów, głównie do produkcji metanu przez metanogeny. Istnieje ścisły związek typu syntrofia między producentami wodoru a metanogenami [81].

Producentami wodoru w żwaczu są bakterie, pierwotniaki i grzyby [70]. Znanymi gatunkami bakterii produkującymi wodór w żwaczu są celulolityczne

Ruminococcus albus, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrovibrio fibrisolvens*, *Clostridium cellobioparum* jak również pektynolityczne *Lachnospira multiparus*, *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium* [5, 16, 55, 56, 70]. *Ruminococcus albus* prowadzi fermentację, w której produktami końcowymi są octan, etanol, dwutlenek węgla i wodór. W warunkach niskiego stężenia wodoru bakteria ta może osiągnąć wydajność produkcji wodoru bliską maksymalnej, czyli 4 mole na 1 mol glukozy i produkować tylko octan, dwutlenek węgla i wodór. Ma to miejsce w warunkach, gdy wodór wykorzystywany jest przez inne drobnoustroje [55].

Pierwotnikami produkującymi wodór w żwaczu są celulolityczne orzęski z rodzaju *Entodiniomorphida* oraz pektynolityczne z rodzaju *Holotricha*. Badania nad *Holotricha* ograniczają się do trzech gatunków, *Dasytricha ruminantium*, *Isotricha prostoma* i *Isotricha intestinalis*. Wykorzystują one głównie rozpuszczalne cukry proste jak D-glukoza, D-fruktoza, D-galaktoza a także rozpuszczalne oligo- i polisacharydy. Znaczenie pierwotników rodzaju *Holotricha* w fermentacji w żwaczu zależy od rodzaju pokarmu, którym karmi się zwierzęta. Jest ono małe, gdy paszę stanowi siano, a znacznie większe, gdy jest to pokarm bogaty w cukry, np. melasowane wysłodki buraczane. Produktami fermentacji orzęsków *Holotricha* są kwas mlekowy, kwas octowy, kwas masłowy, dwutlenek węgla i wodór. Wykrywa się również niewielkie ilości kwasu mrówkowego oraz propionowego. U pierwotników tych nie stwierdzono obecności dehydrogenazy mrówczanu. Uważa się, że przekształcenie pirogronianu do acetylo-CoA jak również szlaki prowadzące do powstania końcowych produktów fermentacji (mleczan, octan, maślan) przebiegają w analogiczny sposób jak te w fermentacji masłowej prowadzonej przez bakterie. Przekształcenie pirogronianu do acetylo-CoA, i dalsze reakcje prowadzące do powstania octanu oraz produkcja wodoru zlokalizowane są w wewnątrzkomórkowych organellach jakimi są hydrogenosomy [81], które będą omówione w następnym rozdziale.

Obecnie nie ma opracowanych warunków, aby hodować pierwotniki z rodzaju *Holotricha* poza żwaczem dłużej niż do 48 godzin. Z badań własnych autorki artykułu wiadomo, że hodowla *in vitro* *Dasytricha ruminantium* i *Isotricha prostoma* z glukożą jako źródłem węgla i przy ograniczeniu procesów metanogenezy produkuje gaz, który zawiera do 50% wodoru. Gaz ten jest w stanie zasilić chemiczne ogniwo paliwowe (niskotemperaturowe, polimerowe ogniwo paliwowe) pracujące w temperaturze pokojowej tak jak czysty wodór [65, dane przygotowywane do publikacji]. Drugą grupą pierwotników produkujących wodór w żwaczu są amyloolityczne i celulolityczne orzęski z rodziny *Entodiniomorphida*. Przykładowe gatunki to *Entodinium caudatum*, *Epidinium caudatum*, *Ophryosco-*

lex caudatus. Produktami ich metabolizmu są kwas octowy, masłowy, dwutlenek węgla, wodór, a także niewielkie ilości kwasu mlekowego, mrówkowego i propionowego [82].

Żwaczowymi grzybami produkującym wodór są np. *Neocallimastix frontalis*, rodzaje *Piromyces*, *Orpinomyces* czy *Anaeromyces* [61, 66]. Najlepiej poznany jest gatunek *Neocallimastix frontalis*. W procesie fermentacji prowadzonej przez *Neocallimastix frontalis* pirogronian powstały w czasie glikolizy przekształcany jest w octan, etanol, mleczan i bursztynian. U *Neocallimastix frontalis* oraz u grzybów z rodzaju *Piromyces* wykryto liazę pirogronian:mrówczan (PFL) w cytoplazmie i w hydrogenosomach. Stwierdzono też brak obecności enzymu PFO [28, 61]. Procesy prowadzące do powstania wodoru opisano w rozdziale dotyczącym hydrogenosomów.

2.6. Hydrogenosomy

Hydrogenosomy są to organella komórkowe otoczone podwójną błoną lipidowo-białkową, które pełnią funkcje energetyczne u beztlenowych organizmów eukariotycznych. Są przystosowaniem do życia w środowisku anaerobowym. Struktury te wykryto u beztlenowych pierwotników: pasożytniczych wiciowców, np. *Trichomonas vaginalis* (rzęśstek pochwoy), beztlenowych orzęsków, i beztlenowych grzybów. Organella te uważa się za odpowiedniki mitochondriów. Dane biochemiczne i molekularne wskazują na wspólne pochodzenie mitochondriów i hydrogenosomów. Stosunkowo dobrze poznane są hydrogenosomy *Trichomonas vaginalis*. W hydrogenosomach pierwotników znajdują się enzymy: oksydoreduktaza pirogronian:ferrodoksyna (PFO) oraz hydrogenazy. Pirogronian powstały w procesie glikolizy transportowany jest do hydrogenosomu. Tam ulega dekarboksylacji przez oksydoreduktazę pirogronian:ferrodoksyna do acetylo-CoA i dwutlenku węgla przy udziale ferredoksyny, która jest redukowana. Następnie w wyniku przekształcania acetylo-CoA w octan na drodze fosforylacji substratowej przez transferazę octanowo-bursztynylo-CoA i syntetazę bursztynylo-CoA produkowane jest ATP. W ekstraktach komórkowych z pierwotników z rodzaju *Holotricha* nie wykryto tych dwóch enzymów. U tych pierwotników octan powstaje w wyniku reakcji prowadzonych przez fosfoacetyltransferazę i kinazę octanową [10, 28, 81]. Elektrony przekazywane są na ferrodoksynę a następnie przy udziale hydrogenaz następuje redukcja protonów do wodoru cząsteczkowego. Stąd nazwa organellum. W ten sposób następuje oddzielenie ostatnich etapów beztlenowych procesów metabolicznych prowadzących do produkcji energii w komórce eukariotycznej. Oddzielenie to służy zwiększeniu syntezy ATP przez generowanie

siły protomotorycznej analogicznie jak odbywa się to w mitochondriach. Usuwanie protonów z matrix hydrogenosomów przez tworzenie się cząsteczek wodoru i ich dyfuzję powoduje powstanie gradientu pH, co sprzyja syntezie ATP [10, 28]. U pierwotniaków z rodzaju *Holotricha* stwierdzono, że aktywność enzymów syntezy maślanu, fosfobutyrylotransferazy i kinazy maślanu oraz dehydrogenazy mleczanu jest również częściowo związana z hydrogenosomami [81].

W hydrogenosomach grzybów *Neocallimastix frontalis* podobnie jak z rodzaju *Piromyces* pirogronian przekształcany jest do acetylo-CoA i mrówczanu przez liazę pirogronian:mrówczan. U organizmów tych nie wykryto oksydoreduktazy PFO. Acetylo-CoA ulega fosforylacji substratowej przy udziale transferazy octanowo-bursztynilo-CoA i syntetazy bursztynilo-CoA w wyniku czego produkowane jest ATP i wodór jak opisano u pierwotniaków [24, 28]. Charakterystyczną cechą fermentacji *Neocallimastix* i *Piromyces* jest powstawanie znaczącej ilości pirogronianu z malonianu w hydrogenosomach. Według jednych autorów pirogronian powstały w procesie glikolizy przekształcany jest w cytoplazmie przez karboksylazę pirogronianu do szczawiooctanu [61]. Według innych szczawiooctan powstaje z fosfoenolpirogronianu w wyniku reakcji katalizowanej przez karboksykinazę fosfoenolpirogronianu. Następnie szczawiooctan ulega redukcji do malonianu przez dehydrogenazę malonianu. Malonian jest transportowany do hydrogenosomu, gdzie następuje jego utlenianie przez tzw. enzym malonianowy, w wyniku czego powstaje pirogronian (substrat dla liazy pirogronian:mrówczan), dwutlenek węgla i NAD(P)H. Elektrony przenoszone są przez oksydoreduktazę NADH:ferrodoxyna na ferrodoxynę. Dalej w wyniku aktywności hydrogenazy następuje redukcja protonów i produkowany jest wodór. W wyniku przekształceń malonianu w cytoplazmie powstaje bursztynian [28, 61]. U *Trichomonas vaginalis* również istnieje podobny szlak i część pirogronianu tworzy się z malonianu w hydrogenosomach w wyniku działania enzymu malonianowego [20]. U orzęsków rodzaju *Holotricha* pirogronian również może powstać z malonianu w podobny sposób, ale ma to miejsce w cytoplazmie [83]. Istnieją też mikroorganizmy, które nie posiadają hydrogenosomów, a wykryto u nich hydrogenazy i wiadomo, że są zdolne do produkcji wodoru. Należą do nich pasożytnicze pierwotniaki, np. *Giardia intestinalis*, wiciowiec powodujący infekcje przewodu pokarmowego człowieka, czy *Entamoeba histolytica* oraz *Spiroplasma barkhanus* [47].

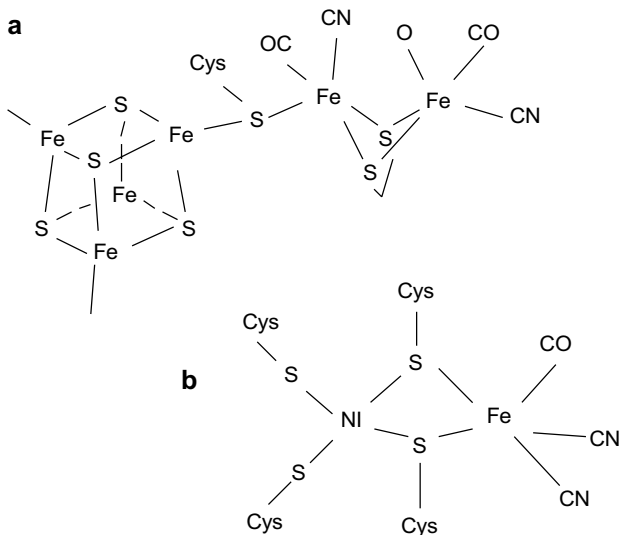
2.7. Hydrogenazy

Mianem hydrogenaz określa się rodzinę metaloenzymów, które katalizują odwracalną reakcję utleniania wodoru opisaną przez równanie 16:



Substrat hydrogenaz jest najmniejszym znanym w biologii. Ze względu na metal grupy prostetycznej znajdującej się w centrum aktywnym enzymu, hydrogenazy można podzielić na dwie główne klasy: hydrogenazy [FeFe], posiadające dwa atomy żelaza oraz hydrogenazy [FeNi], posiadające jeden atom żelaza i jeden atom niklu. Uważa się, że u organizmów prokariotycznych bardziej rozpowszechnione są hydrogenazy [NiFe] niż hydrogenazy [FeFe]. Obecność hydrogenaz [NiFe] stwierdzono tylko u organizmów prokariotycznych, u bakterii najczęściej w klasie *Clostridia*, *γ -Proteobacteria* i u archeonów. Hydrogenazy [FeFe] występują u bakterii i organizmów eukariotycznych, nie wykryto ich natomiast u archeonów. Funkcją hydrogenaz [FeFe] jest produkcja wodoru cząsteczkowego. Większość poznanych hydrogenaz [NiFe] przeprowadza reakcję utleniania wodoru do protonów i elektronów. Należą tu hydrogenazy pobierające (ang. *uptake hydrogenases*). Hydrogenazami [NiFe], które katalizują reakcje wytwarzania wodoru są hydrogenazy bakterii fermentacji mieszanej, np. *Escherichia coli*. U *E. coli* znane są cztery hydrogenazy [NiFe]. Dwie z nich, białka Hyd-1 i Hyd-2 utleniają wodór. Hydrogenaza Hyd-3 wchodzi w skład omawianego w rozdz. 2.3.3 i 2.3.4 kompleksu FHL odpowiedzialnego za produkcję wodoru w warunkach fermentacyjnych. Wykryto też hydrogenazę Hyd-4, produkt jednego z genów operonu *hyf*. Uważa się, że kompleks Hyf pełni analogiczną funkcję do kompleksu FHL, chociaż ekspresja genów operonu *hyf* jest słaba.

W budowie obu klas hydrogenaz [NiFe] i [FeFe] wyróżnia się silnie konserwowany rdzeń oraz różnorodne pomocnicze domeny i podjednostki. W przypadku hydrogenaz [FeFe] rdzeń ten składa się z domeny H o masie cząst. 40 kDa zbudowanej z 350 aminokwasów, która jest połączona z grupą prostetyczną [FeFe] oraz centrum żelazowo-siarkowym [4Fe-4S] poprzez atom siarki jednej reszty cysteiny (rys. 4a). Rdzeń hydrogenaz [NiFe] zbudowany jest z dużej i małej podjednostki. Duża podjednostka o masie cząst. 60 kDa związana jest z grupą prostetyczną [NiFe] przez atomy siarki czterech reszt cystein lub rzadziej trzech reszt cystein i jednej reszty selenocysteiny (rys. 4b). Mała podjednostka o masie cząst. 30 kDa wiąże od jednego do trzech centrów żelazowo-siarkowych [4Fe-4S] lub [3Fe-4S]. Budowa rdzenia obu typów hydrogenaz i ich dojrzewanie są zupełnie odmienne, co wskazuje na odrębne pochodzenie ewolucyjne mimo pełnienia podobnych funkcji. Natomiast cechą wspólną obu hydrogenaz są dwuatomowe ligandy CO i CN⁻ połączone z atomami żelaza grup prostetycznych hydrogenaz. Hydrogenazy [NiFe] posiadają jedną cząsteczkę CO i dwie cząsteczki CN⁻. Hydrogenazy [FeFe] mają pięć ligandów, każdy atom Fe związany jest z jedną cząs-



Rys. 4. Centra aktywne hydrogenaz [FeFe] (a) i [FeNi] (b).
Objaśnienia w tekście.

teczką CO i jedną CN^- , jest jeszcze dodatkowa część CO łącząca ze sobą dwa atomy żelaza.

Funkcją domen i podjednostek pomocniczych hydrogenaz jest transport elektronów do i z centrum aktywnego hydrogenazy. W przypadku obu hydrogenaz są one podobne i zawierają centra żelazowo-siarkowe [Fe-S]. Hydrogenazy [NiFe] są dimerami, a hydrogenazy [FeFe] głównie monomerami, spotyka się również dimery, trimery i tetramery. Hydrogenazy [FeFe] w przeciwieństwie do większości hydrogenaz [NiFe] są białkami cytoplazmatycznymi, formy peryplazmatyczne czy też związane z błonami komórkowymi należą do rzadkości.

Dojrzewanie hydrogenaz [NiFe] jest dobrze poznane dla hydrogenaz *E. coli*. Cechą charakterystyczną dla tych hydrogenaz jest to, że geny je kodujące oraz białka pomocnicze tworzą operony (patrz też rozdz. 2.3.4). Poszczególnymi etapami są synteza ligandów CN^- i CO, wiązanie z atomami żelaza i niklu, połączenie z dużą podjednostką hydrogenazy za co odpowiedzialne są białka pomocnicze Hyp; dojrzewanie centrum aktywnego hydrogenaz przez endoproteolityczne odcięcie C-terminalnego peptydu dużej podjednostki katalizowane przez specyficzne proteazy, inne dla każdej hydrogenazy; transport hydrogenaz do miejsc działania. Dojrzewanie hydrogenaz [FeFe] jest znacznie słabiej poznane niż hydrogenaz [NiFe]. Do tej pory nie stwierdzono istnienia operonów genów odpowiedzialnych za dojrzewanie hydrogenaz [FeFe]. Dużym postępem było wykrycie funkcji białek kodowanych przez geny *hydE*, *hydF* i *hydG* *Chlamydomonas reinhardtii*, które uczestniczą w dojrzewaniu hydrogenaz [FeFe]. Ich homologi stwierdzono u innych organizmów, u których występują hydrogenazy [FeFe].

Wyróżnia się też trzecią klasę hydrogenaz. Są to hydrogenazy Hmd występujące u metanogenów. W ich

centrum aktywnym występuje tylko jeden atom żelaza, nie posiadają też centrów żelazowo-siarkowych [Fe-S]. Katalizują one reakcję pośrednią w procesie metanogenezy, utleniania wodoru i redukcji N^5, N^{10} -metenyltetrahydrometanopteryny do N^5, N^{10} -metylenetetrahydrometanopteryny i protonu. Enzym ten też posiada ligandy w postaci CO i CN [18, 21, 54, 67].

2.8. Redukcja siarczanów

Wodór jest produkowany w czasie oddychania bez-tlenowego przez bakterie redukujące siarczany jako ostateczny receptor elektronów w procesie oddychania. Dobrze poznana bakterią jest *Desulfovibrio vulgaris*. Substratami dla bakterii redukujących siarczany są kwas mlekowy, także inne kwasy, alkohole oraz wodór. Gdy substratem jest np. kwas mlekowy to ulega on przekształceniu do pirogronianu, ten do acetylo-CoA, ostatecznym produktem procesu jest octan. U bakterii tych wykryto obecność zarówno oksydoreduktazy pirogronian:ferredoksyna jak i liazy pirogronian:mrówczan. Powstaje więc też mrówczan. Reakcjom tym towarzyszy uwalnianie wodoru w wyniku aktywności hydrogenaz cytoplazmatycznych. Peryplazmatyczne hydrogenazy utleniają wodór do protonów i elektronów. Protony przekazywane są do siarczanu redukując go do siarkowodoru. Jednocześnie transportowane są elektrony, w wyniku fosforylacji oksydatywnej powstaje ATP. Analizując produkty gazowe *Desulfovibrio vulgaris* stwierdzono, że zanim pojawi się siarkowodór, najpierw wykrywa się wodór a także tlenek węgla. Tlenek węgla przekształcany jest do dwutlenku węgla i wodoru w wyniku działania dehydrogenazy CO (CODH) podobnie jak ma to miejsce u *Rhodospirillum rubrum* [79].

Przy braku siarczanu w podłożu ma miejsce fermentacja, której ostatecznymi produktami są octan i wodór. Taki układ może istnieć np. przy syntroficznych związkach bakterii redukujących siarczany i metanogenów. Te ostatnie zapewniają korzystne warunki termodynamiczne do powstawania wodoru, utrzymują niskie jego stężenie przez wykorzystanie wodoru do produkcji metanu [75].

3. Podsumowanie

Wodór uważany jest za nośnik energii, który w przeszłości może, przynajmniej częściowo, zastąpić tradycyjne źródła energii. W związku z tym, że obecne metody produkcji wodoru są energochłonne, opierają się na tradycyjnych źródłach energii, powodują zatrucie środowiska i nie mogą być stosowane na większą skalę, nastąpiło duże zainteresowanie produkcją wodoru

z biomasy w procesach prowadzonych przez drobnoustroje w warunkach beztlenowych. Kierunek ten wydaje się bardzo atrakcyjny, ponieważ produkcja wodoru z biomasy może stanowić sposób usuwania różnorodnych odpadów organicznych. W artykule zostały szczegółowo omówione znane procesy biologiczne w wyniku których powstaje wodór: fermentacja, fotofermentacja, bezpośrednia i pośrednia biofotoliza, oddychanie beztlenowe bakterii redukujących siarczyn przy braku siarczynu w podłożu. Najbardziej obiecujące z punktu widzenia przyszłych zastosowań wydają się być procesy fermentacji. Wiele obecnych badań dotyczy sposobów zwiększenia wydajności produkcji wodoru w warunkach fermentacji. Obiecującym kierunkiem badań jest zastosowanie nowoczesnych metod biologii molekularnej do selekcji, izolacji i identyfikacji nowych gatunków bakterii produkujących wodór z dużą wydajnością z różnych środowisk. Enzymami odpowiedzialnymi za produkcję wodoru we wszystkich procesach biologicznych są hydrogenazy. Są to metaloenzymy katalizujące odwracalną reakcję utleniania wodoru zgodnie z równaniem: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$. U beztlenowych mikroorganizmów eukariotycznych hydrogenazy znajdują się zwykle w wyspecjalizowanych organellach komórkowych zwanych hydrogenosomami. Hydrogenosomy są przystosowaniem do życia w środowisku anaerobowym. Organella te uważa się za odpowiedniki mitochondriów u organizmów tlenowych. W artykule omówiono również drobnoustroje odpowiedzialne za produkcję wodoru w żwaczu przeżuwaczy, który jest specyficznym ekosystemem, swoją komorą fermentacyjną.

Piśmiennictwo

- Ahn Y., Park E.J., Oh Y.K., Park S., Webster G., Weightman A.J.: Biofilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production. *FEMS Microbiol. Lett.* **249**, 31–38 (2005)
- Alexeeva S., de Kort B., Sawers G., Hellingwerf K.J., de Mattos M.J.T.: Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 4934–4940 (2000)
- Altuvia S., Zhang A., Argaman L., Tiwari A., Storz G.: The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhfA* translation by blocking ribosome binding. *EMBO J.* **17**, 6069–6075 (1998)
- Angenent L.T., Karim K., Al-Dahhan M.H., Wrenn B.A., Domiguez-Espinoza R.: Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* **22**, 477–485 (2004)
- Atta M., Meyer J.: Characterization of the gene encoding the [Fe]-hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1476**, 368–371 (2000)
- Atteia A., van Lis R., Gelius-Dietrich G., Adrait A., Garin J., Joyard J., Rolland N., Martin W.: Pyruvate formate-lyase and a novel route of eukaryotic ATP synthesis in *Chlamydomonas* mitochondria. *J. Biol. Chem.* **281**, 9909–9918 (2006)
- Balint B., Bagi Z., Toth A., Rakhely G., Perei K., Kovacs K.L.: Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 404–410 (2005)
- Benemann J.: Hydrogen biotechnology: Progress and prospects. *Nature Biotechnol.* **14**, 1101–1103 (1996)
- Benemann J.: Feasibility analysis of photobiological hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*, **22**, 979–987 (1997)
- Biagini G.A., Finlay B.J., Lloyd D.: Evolution of the hydrogenosome. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**, 133–140 (1997)
- Bock A., Fermentation (w:) Encyclopedia of Microbiology, vol 2, Academic Press, 2000, s. 343.
- Brown K.: Producing renewable hydrogen from biomass. *BioCycle*, January 2004, 54–55 (2004)
- Burris R.H.: Nitrogenases. *J. Biol. Chem.* **266**, 9339–9342 (1991)
- Chen C.Y., Lu W.B., Liu C.H., Chang J.S.: Improved phototrophic H_2 production with *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5 using acetate and butyrate as dual carbon substrates. *Bioresour. Technol.* (2007) doi:10.1016/j.biortech.2007.07.037.
- Cheong D.Y., Hansen C.L.: Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 635–643 (2006)
- Chung K.T.: Inhibitory effects of H_2 on growth of *Clostridium cellobioparum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 342–348 (1976)
- Das D., Veziroglu T.N.: Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energy*, **26**, 13–28 (2001)
- Das D., Dutta T., Nath K., Kotay S.M., Das A.K., Veziroglu T.N.: Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production. *Current Science*, **90**, 1627–1637 (2006)
- Do Y.S., Smeenk J., Broer K.M., Kisting C.J., Brown R., Heindel T.J., Bobik T.A., DiSpirito A.A.: Growth of *Rhodospirillum rubrum* on synthesis gas: conversion of CO to H_2 and poly-beta-hydroxyalkanoate. *Biotechnol. Bioeng.* **97**, 279–286 (2007)
- Dolezal P., Vanacova S., Tachezy J., Hrdy I.: Malic enzyme of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins. *Gene*, **329**, 81–92 (2004)
- Forzi L., Sawers R.G.: Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biometals*, **20**, 565–578 (2007)
- Fox J.D., Kerby R.L., Roberts G.P., Ludden P.W.: Characterization of the CO-induced, CO-tolerant hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the gene encoding the large subunit of the enzyme. *J. Bacteriol.* **178**, 1515–1524 (1996)
- Gavala H.N., Skiadas I.V., Ahring B.K., Lyberatos G.: Thermophilic anaerobic fermentation of olive pulp for hydrogen and methane production: modelling of the anaerobic digestion process. *Water Sci. Technol.* **53**, 271–279 (2006)
- Gelius-Dietrich G., Henze K.: Pyruvate formate lyase (PFL) and PFL activating enzyme in the chytrid fungus *Neocallimastix frontalis*: a free radical enzyme system conserved across divergent eukaryotic lineages. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**, 456–463 (2004)
- Ghirardi M.L., Zhang L., Lee J.W., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E., Melis A.: Microalgae: a green source of renewable H_2 . *Trends Biotechnol.* **18**, 506–511 (2000)
- Girbal L., Croux C., Vasconcelos I., Soucaille P.: Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**, 287–297 (1995)
- Gorrell T.E., Uffen R.L.: Fermentative metabolism of pyruvate by *Rhodospirillum rubrum* after anaerobic growth in darkness. *J. Bacteriol.* **131**, 533–543 (1977)
- Hackstein J.H.P., Akhmanova A., Boxma B., Harhangi H.R., Voncken G.J.: Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends Microbiol.* **7**, 441–447 (1999)

29. Hallenbeck P.C.: Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci. Technol.* **52**, 21–29 (2005)
30. Hallenbeck P.C., Benemann J.R.: Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1185–1193 (2002)
31. Hung C.H., Lee K.S., Cheng L.H., Huang Y.H., Lin P.J., Chang J.S.: Quantitative analysis of a high-rate hydrogen-producing microbial community in anaerobic agitated granular sludge bed bioreactors using glucose as substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 693–701 (2007)
32. Ito T., Nakashimada Y., Senba K., Matusi T., Nishio N.: Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J. Biosci. Bioeng.* **100**, 260–265 (2005)
33. Jen C.J., Chou C.H., Hsu P.C., Yu S.J., Chen W.E., Lay J.J., Huang C.C., Wen F.S.: Flow-FISH analysis and isolation of clostridial strains in an anaerobic semi-solid bio-hydrogen producing system by hydrogenase gene target. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 1126–1134 (2007)
34. Kapdan I.K., Kargi F.: Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 569–582 (2006)
35. Kawaguchi H., Hashimoto K., Hirata K., Miyamoto K.: H₂ production from algal biomass by a mixed culture of *Rhodobium marinum* A-501 and *Lactobacillus amylovorus*. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 277–282 (2001)
36. Kenealy W.R., Cao Y., Weimer P.J.: Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and *Clostridium kluyveri* grown on cellulose and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 507–513 (1995)
37. Kern M., Klipp W., Klemme J.H.: Increased nitrogenase-dependent H₂ photoproduction by *hup* mutants of *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1768–1774 (1994)
38. Kim S.H., Han S.K., Shin H.S.: Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochem.* **41**, 199–207 (2006)
39. Kotay S.M., Das D.: Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. *Bioresour. Technol.* **98**, 1183–1190 (2007)
40. Kovacs A.T., Rakhley G., Balogh J., Maroti G., Fulop A., Kovacs K.L.: Anaerobic regulation of hydrogenase transcription in different bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 36–38 (2005)
41. Kraemer J.T., Bagley D.M.: Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnol. Lett.* **29**, 685–695 (2007)
42. Kumar N., Ghosh A., Das D.: Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H₂ production by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol. Lett.* **23**, 537–541 (2001)
43. Kurokawa T., Tanisho S.: Effects of formate on fermentative hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Marine Biotechnol.* **7**, 112–118 (2005)
44. Levin D.B., Pitt L., Love M.: Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 173–185 (2004)
45. Lin C.Y., Hung C.H., Chen C.H., Chung W.T., Cheng L.H.: Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Process Biochem.* **41**, 1383–1390 (2006)
46. Liu F., Fang B.: Optimization of bio-hydrogen production from biodiesel wastes by *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol. J.* **2**, 374–380 (2007)
47. Lloyd D., Ralphs J.R., Harris J.C.: *Giardia intestinalis*, a eukaryote without hydrogenosomes, produces hydrogen. *Microbiology*, **148**, 727–733 (2002)
48. Logan B.E.: Extracting hydrogen and electricity from renewable resources. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 160A–167A (2004)
49. Maeda T., Sanchez-Torres V., Wood T.K.: Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-007-1217-0 (2007)
50. Mandal B., Nath K., Das D.: Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol. Lett.* **28**, 831–835 (2006)
51. Maness P.C., Weaver P.F.: Evidence for three distinct hydrogenase activities in *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 751–756 (2001)
52. Maness P.C., Weaver P.F.: Hydrogen production from a carbon-monoxide oxidation pathway in *Rubrivivax gelatinosus*. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1407–1411 (2002)
53. Matsumoto M., Nishimura Y.: Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *J. Biosci. Bioeng.* **103**, 236–241 (2007)
54. Meyer J.: [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 1063–1084 (2007)
55. Miller T.J., Wolin M.J.: Bioconversion of cellulose to acetate with pure cultures of *Ruminococcus albus* and a hydrogen-using acetogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3832–3835 (1995)
56. Miller T.J., Wolin M.J.: Formation of hydrogen and formate by *Ruminococcus albus*. *J. Bacteriol.* **116**, 836–846 (1973)
57. Minnan L., Jinli H., Xiaobin W., Huijuan X., Jinzao C., Chuannan L., Fengzhang Z., Liangshu X.: Isolation and characterization of a high H₂-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring. *Res. Microbiol.* **156**, 76–81 (2005)
58. Nakashimada Y., TRachman M.A., Kakizono T., Nishio N.: Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox state. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1399–1405 (2002)
59. Nath K., Das D.: Hydrogen from biomass. *Current Science*, **85**, 265–271 (2003)
60. Nath K., Kumar A., Das D.: Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 533–541 (2005)
61. O’Fallon J.V., Wright R.W., Calza R.E.: Glucose metabolic pathways in the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Biochem. J.* **274**, 595–599 (1991)
62. Oh Y.K., Seol E.H., Kim J.R., Park S.: Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. *Int. J. Hydrogen Energy*, **28**, 1353–1359 (2003)
63. Oh S.E., Logan B.E.: Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Res.* **39**, 4673–4682 (2005)
64. Piela P., Zelenay P.: Researchers redefine the DMFC roadmap. *Fuel Cell Review*, **1**, 17–23 (2004)
65. Piela P., Michałowski T., Szewczyk K.W., Miltko R., Sikora R., Piela B., Grzesiuk E., Sikora A.: Construction of microbial fuel cell based on rumen microorganisms. Sesja sprawozdawcza w Instyt. Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. *Workshop on: Molecular Biology of the Cell. Implications for health and biotechnology.* Warsaw, 25–28 October, 2006, Abstrakt II.37.

66. Philips M.W., Gordon G.L.R.: Carbohydrate fermentation by three species of polycentric ruminal fungi from cattle and water buffalo in tropical Australia. *Anaerobe*, **1**, 41–47 (1995)
67. Pilak O., Mamat B., Vogt S., Hagemeyer C.H., Thauer R.K., Sima S., Vornrhein C., Warkentin E., Ermler U.: The crystal structure of the apoenzyme of the iron-sulphur cluster-free hydrogenase. *J. Mol. Biol.* **358**, 798–809 (2006)
68. Pinto F.A.L., Troshina O., Lindblad P.: A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1209–1215 (2002)
69. Ren N., Xing D., Rittmann B.E., Zhao L., Xie T., Zhao X.: Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environment. Microbiol.* **9**, 1112–1125 (2007)
70. Russell J.B.: Rumen fermentation (w:) Encyclopedia of microbiology. Academic Press, Nowy Jork, 2000, s. 185.
71. Sawers R.G.: Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 42–46 (2005)
72. Schlegel H.G.: Mikrobiologia ogólna, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2001.
73. Shin H.S., Youn J.H., Kim S.H.: Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 1355–1363 (2004)
74. Skowrońska A., Zmysłowska I.: Współczesne metody identyfikacji bakterii stosowane w ekologii mikroorganizmów wodnych – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). *Post. Mikrobiol.* **45**, 183–193 (2006)
75. Stolyar S., Dien S.V., Hillesland K.L., Pinel N., Lie T.J., Leigh J.A., Stahl D.A.: Metabolic modeling of a mutualistic microbial community. *Mol. Syst. Biol.* 3:92, doi: 10.1038/msb4100131 (2007)
76. Stryer L.: Biochemia, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 1999.
77. Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P., Oxelfelt F., Wunschiers R., Lindblad P.: Hydrogenases and hydrogen metabolism of Cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 1–20 (2002)
78. Valdez-Vazquez I., Sparling R., Risbey D., Rinderknecht-Seijas N., Poggi-Varaldo H.M.: Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. *Bioresour. Technol.* **96**, 1907–1913 (2005)
79. Voordouw G.: Carbon monoxide cycling by *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J. Bacteriol.* **184**, 5903–5911 (2002)
80. Wilde E., Collins M.D., Hippe H.: *Clostridium pascui* sp. nov., a new glutamate-fermenting sporeformer from a pasture in Pakistan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 164–170 (1997)
81. Williams A.G., Coleman G.S.: Metabolism of Holotrich Protozoa (w:) The Rumen Protozoa, red. A.G. Williams, G.S. Coleman, G.S. Springer-Verlag, New York, 1992, s. 256.
82. Williams A.G., Coleman G.S.: Metabolism of Entodiniomorphid Protozoa (w:) The Rumen Protozoa, red. A.G. Williams, G.S. Coleman, G.S. Springer-Verlag, New York, 1992, s. 173.
83. Yarlett N., Hann A.C., Lloyd D., Williams A.: Hydrogenosomes in the rumen protozoon *Dasytricha ruminantium* Schuberg. *Biochem. J.* **200**, 365–372.
84. Yokoyama H., Waki M., Ogino A., Ohmori H., Tanaka Y.: Hydrogen fermentation properties of undiluted cow dung. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 82–85 (2007)
85. Younesi H., Najafpour G., Ismail K.S.K., Mohamed A.R., Kamaruddin A.H.: Biohydrogen production in a continuous stirred tank bioreactor from synthesis gas by anaerobic photosynthetic bacterium: *Rhodospirillum rubrum*. *Bioresour. Technol.* doi: 10.1016/j.biortech.2007.04.059 (2007)
86. Yoshida A., Nishimura T, Kawaguchi H., Inui M., Yukawa H.: Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6762–6768 (2005)
87. Yoshida A., Nishimura T, Kawaguchi H., Inui M., Yukawa H.: Enhanced hydrogen production from glucose using *ldh*- and *frd*-inactivated *Escherichia coli* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 67–72 (2006)
88. Zhang Y., Pohlmann E.L., Ludden P.W., Roberts G.P.: Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA* and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **182**, 983–992 (2000)
89. Zhu H., Beland M.: Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *Int J Hydrogen Energy*, **31**, 1980–1988 (2006)
90. Zhu J., Wu X., Miller C., Yu F., Chen P., Ruan R.: Biohydrogen production through fermentation using liquid swine manure as substrate. *J. Environ. Sci. Health B.* **42**, 393–401 (2007)

Praca powstała w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 2P04B00429