



Bioethanol fermentation on steam pretreated substrates

Kádár, Zsófia; San Feng, Maltha; de Wim, Laet; Réczey, Istvánné

Published in:
Proceedings

Publication date:
2006

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Kádár, Z., San Feng, M., de Wim, L., & Réczey, I. (2006). Bioethanol fermentation on steam pretreated substrates. In *Proceedings*

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Bioalkohol fermentáció gőzrobbantással előkezelt szubsztrátokon

Bioethanol fermentation on steam pretreated lignocellulosic substrates

Kádár Zsófia¹, San Feng Maltha², Wim de Laat², Réczey Istvánné¹

¹*Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem*

Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék

1111-Budapest, Szent Gellért tér 4.

²*Royal Nedalco B.V.*

P.O. Box 6., 4600 AA Bergen op Zoom, Hollandia

Summary

At the present time transport sector is 98% oil dependent. Increasing the use of biofuels in road transportation is one of the key tools by which European Community (EC) can reduce dependency on imported energy. Reduction of fossil fuel utilization in transport sector will affect carbon dioxide emission to a great extent. Directive 2003/30/EC clearly sets the target shares of biofuels in transport sector for EC member states. Bioethanol (produced from biomass) has been long recognized as a possible alternative fuel. Lignocellulosics, the most abundant renewable resource on Earth, represent an enormous potential for large-scale bioethanol production. To be an attractive substrate for ethanol fermentation, pretreatment of lignocellulosic raw material is necessary. During this process a range of toxic compounds are formed which inhibit the ethanol fermentation. Quantitative and qualitative composition of the inhibitors arising during pretreatment depends on the type of applied pretreatment and also on the origin of lignocellulosic material. In this study the fermentability of hemicellulose hydrolysates obtained in the steam pretreatment of spruce, willow and corn stover were investigated in ethanol fermentation tests using a yeast strain, which has been previously reported to have a resistance to inhibitory compounds generated during steam pretreatment. A simplified procedure for a rapid and reliable adaptation assay was also performed to increase the inhibitor tolerance of the selected yeast strain.

Bevezetés

A XXI. század alapproblémája a növekvő energiaigények kielégítése, miközben a rendelkezésre álló hagyományos energiaforrások kimerülőben vannak, és alkalmazásukat egyébként sem minősíthetjük környezetbarátnak. A világ „kőolaj szomjúsága” folyamatosan nő, hiszen olajból nem csak üzemanyag, hanem a mindennapi életben használatos műszálas ruhák és műanyag tárgyak is készülnek. Mindenki tisztában van azzal, hogy az olajkitermelés valamikor eléri a csúcspontját, de bekövetkezésének idejéről megoszlanak a vélemények. Alternatív lehetőségek már léteznek (nap-, szélenergia, üzemanyagcellás járművek, bioüzemanyagok), azonban ezen alternatívák kidolgozása, megvalósítása sem pillanatszerű folyamat. Az idő tehát igenis szorít minket [1,2].

A légköri CO₂ koncentrációja száz év alatt 30 %-kal lett magasabb, amely globális felmelegedéshez és éghajlatváltozáshoz

vezethet/vezetett. A szén-dioxid kibocsátás csökkentése és a meglévő energiakészletekkel való takarékoskodás érdekében elengedhetetlen az energiatermelés megújuló energiaforrásokból származó hányadának növelése. Az Európai Unió ezért kötelezte magát, hogy tagállamaiban, a megújuló energia részesedését a teljes energiafelhasználásban, 2010-ig, a jelenlegi 6%-os szintről 12%-ra növeli.

A megújuló üzemanyagok közlekedésben történő felhasználását ösztönző 2003/30/EC direktíva előírja a tagállamok – így Magyarország számára is – a kötelezően megvalósítandó stratégiát és célkitűzést. Az irányelv kötelezettséget fogalmaz meg arra vonatkozóan, hogy 2005-től a bioüzemanyagok az eladott üzemanyag mennyiség legalább egy minimális részét (2005-re 2%, 2010-re pedig 5,75%) képezzék. A megvalósítás módját, és az ehhez kapcsolódó törvényi kidolgozást a tagállamokra bízta. Magyarország e téren a Kormány 2233/2004. (IX. 22.) számú, a bio-üzemanyagok és egyéb

megújuló üzemanyagok közlekedési célú felhasználására vonatkozó nemzeti célkitűzésekről szóló határozata alapján 2010-ig 2% elérését tűzte ki célul. A 63/2005 (VI. 28.) OGY határozat felkéri a Kormányt arra, hogy a bioüzemanyagok aránya 2010-re érje el a 4%-ot [3].

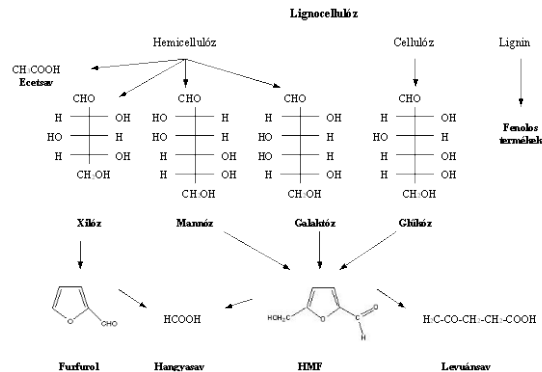
Bioüzemanyagok előállítására cukor és keményítő tartalmú terményekből (cukorrépa, kukorica, búza, burgonya) nagyüzemi technológiák állnak rendelkezésre, míg a cellulóz tartalmú melléktermékek (lignocellulózok), hulladékok hasznosítása területén még a kutatás fázisában vagyunk. Ezek olyan növényi eredetű anyagok, amelyek lignint és szénhidrátot (cellulózt, hemicellulózt) tartalmaznak, mint például: a mezőgazdasági melléktermékek és hulladékok (kukoricaszár, gabonafélék szalmája), a különböző erdei termékek (puha és kemény fák), vagy ezek feldolgozásának hulladékai (gallyak, fűrészpor), az ipari hulladékok (papíriszap), illetve a kommunális hulladékok (újságpapír) – összefoglaló néven biomassza.

A lignocellulózokból történő bioüzemanyag (többek között az általunk is vizsgált bioalkohol) előállításának főbb lépéseit az alábbi ábra (1. ábra) szemlélteti.



1. ábra Lignocellulózokból történő bioalkohol előállítás folyamatábrája.

A lignocellulózok komplex és kompakt szerkezetének köszönhetően minden esetben előkezelésre van szükség. Ezen folyamat alatt különböző toxikus vegyületek keletkeznek, amelyek gátolják a későbbi fermentációt. Az itt keletkező inhibitorokat eredetük alapján különböző csoportokba lehet sorolni [4]. Az előkezelés során keletkező inhibitorok mennyiségi és minőségi jellemzőit nagymértékben befolyásolja a lignocellulóz jellege és az előkezelés módja. A hemicellulóz frakció bomlása során ecetsav, a szénhidrátok (glükóz és xilóz) bomlásakor furfurool és 5-hidroximetil-furfurool (HMF), míg a lignin degradációjakor aromás vegyületek keletkeznek. A furfurool és a HMF további bomlása során hangyasav és levuánsav is keletkezik (2. ábra).



2. ábra A lignocellulózok előkezelése során keletkező inhibitorok összefoglaló ábrája.

Kísérleteink célja volt gőzrobbantással előkezelt lignocellulóz szubsztrátok fermentálhatóságának vizsgálata inhibitorok jelenlétében. Ehhez az előkezelt minták folyadék (hemicellulóz hidrolizátum) és szilárd (cellulóz) frakcióját szeparáltuk, majd kísérleteinket a hemicellulóz hidrolizátumon végeztük, ahogy azt az Anyagok és módszerek részben ismertetjük. A fermentációhoz egy korábban szelektált, inhibitor rezisztens, *Saccharomyces cerevisiae* törzset használtunk.

Anyagok és módszerek

Mikroorganizmus

A kísérletsorozatban használt élesztő törzs, a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, amerikai törzsgyűjteményből (American Type Culture Collection) származott. A törzs fenntartása -85°C-on 50 vol%os glicerinnel és YPD oldattal történt. A YPD oldat egy literre a következő összetevőket tartalmazta: 20 g bacto pepton, 10 g élesztő extrakt és 10 g glükóz. A pH-t 0,1M-os KOH oldattal 6,5-re állítottuk, majd 125°C-on 15 percig sterilizáltuk.

Inokulum

A *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 törzs inokulum 1000 ml-es csavaros tetejű edényben készült, amely 500 ml táptalajt tartalmazott. Ennek összetétele a következő volt: 228 g/l melasz (Nedalco standard melasz, 45-50% cukor tartalommal) és 2,4 g (NH₄)₂PO₄. A táptalaj pH-ját 25 % H₂SO₄ 4,8-ra állítottuk, majd 110°C-on, 0,5 baron 30 percig sterilizáltuk. Egy napos 32°C-on történő inkubálás után az inokulumot 1750 g-n 10 percig (Rotanta 46, Hettich

Zentrifugen, Németország), centrifugáltuk, desztillált vízzel mostuk, majd tároltuk.

Szubsztrátok

A kísérletek során használt fenyőfa, fűzfa és kukoricaszár Svédországból származott, amelyeknek gőzrobbantásos előkezelése a Lundi Egyetemen (Svédország) történt. Az előkezelés körülményei a következők voltak: fenyőfa: 215°C 5 perc, fűzfa: 205°C 4 perc, kukoricaszár: 190°C 5 perc, minden esetben SO₂ impregnálás mellett. A fűzfa előkezelését impregnálás nélkül is elvégezték 210°C 14 perces időtartammal. Az így előkezelt nyersanyagok komplett analízise a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetemen történt. Az előkezelt nyersanyagok folyadék frakcióját (hemicellulóz hidrolizátum), amelyet az alkohol fermentációs kísérletekhez használtuk, centrifugálással választottuk el (2625g, 10 perc) a szilárd (cellulóz) frakciótól.

Alkohol fermentáció

A batch fermentációk nyomon követésére online szén-dioxid mérést használtunk. A kísérleteket 0,25 literes csavaros tetejű edényekben végeztük, 100 vagy 50 ml táptalajban, amelyet mágneses keverő segítségével 300 rpm fordulatszámon kevertettünk 32°C-on. A táptalaj egy litere a következő összetevőket tartalmazta: hemicellulóz hidrolizátum (különböző tf%-ban), 16 ml só törzsoldat, 1 ml nyomelem törzsoldat és 1 ml vitamin törzsoldat és 1 ml 30 (m/m%) FeSO₄·7H₂O [5]. A só törzsoldat összetétele (per l): 250 g (NH₄)₂SO₄, 125 g KH₂PO₄, 31.25 g MgSO₄; a nyomelem törzsoldat összetétele (per l): 4.5 g ZnSO₄·7H₂O, 1 g MnCl₂·4H₂O, 0.3 g CuSO₄·5H₂O, 0.3 g CoCl₂·6H₂O, 4.5 g CaCl₂·2H₂O, 0.4 g Na₂MoO₄·2H₂O, 1 g H₃BO₃, 0.1 g KI; a nyomelem törzsoldat összetétele (per l): 0.05 g Biotin, 1 g Ca-Pantothenate, 1 g Nicotinic, 25 g Inositol, 1 g Thiamin-HCl, 1 g Pyridoxin-HCl, 0.2 g Para-aminobenzoic acid. A fermentációs táptalajhoz glükózt adagoltunk az előkezelt szubsztrát cellulóz tartalmának megfelelően.

Az inokulumból 1,5g szárazanyag / l koncentrációnak megfelelően oltottunk. Az inkulum szárazanyag tartalmát a következőkben leírt (Analitikai módszerek) összefüggés alapján számoltuk. A kezdeti pH-t 10%-os NaOH-dal 4,0-ra állítottuk. Mintavétel minden esetben csak a fermentáció végén történt, amelyből biomassza mennyiségét és a fermentáció során elfogyasztott glükózt, illetve keletkező alkoholt és metabolitokat határoztunk meg HPLC segítségével.

Analitikai módszerek

Az élesztő sejttömegét optikai denzitás méréssel határoztuk meg 700 nm-en (Perkin-Elmer Spectrophotometer) a következő összefüggés alapján:

$$DW(g/l)=281[OD_{700}]^2+187.29[OD_{700}]+9.822$$

Szénhidrát, etanol, tejsav és glicerin mennyiségi meghatározása HPLC-vel történt Bio Rad oszlopon, RI detektor segítségével. Az elválasztási hőmérséklet 65°C volt, eluensként 0,25M-os kénsavat használtunk 0,55 ml/min áramlással. A mintaelőkészítéshez 0.2 µm porúsátmérőjű szűrőket használtunk.

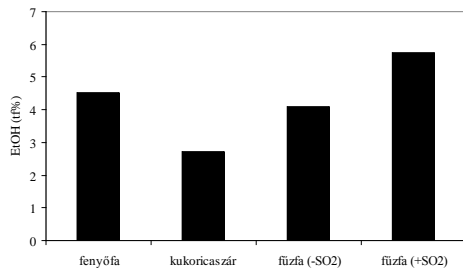
A fermentáció során keletkező szén-dioxidot online követtük nyomon az úgynevezett BAM-6 modul segítségével (HaloteC, Hollandia)

Eredmények

Az ecetsav okozta inhibíciós hatást nagy mértékben befolyásolja a pH, amely jelentősen csökken magasabb (pH>5) értékeken. Éppen ezért az alkohol fermentációs kísérleteket általában 5-5,5pH-n végzik, míg az optimum pH 4-5 között lenne. Ráadásul pH 5 felett a bakteriális befertőződés esélye jelentősen megnő, különösen ipari méretű alkohol fermentáció esetén, ahol gazdaságossági okokból sterilizést általában nem használnak. A befertőződés elsődleges okozója a *Lactobacillus sp.*, melynek eredményeként tejsav keletkezik. Ez különösebb problémát nem jelent sem az élelmiszeralapú, sem az üzemanyagként gyártott alkohol minőségére, de az alkohol kitermelését jelentősen csökkenti. Éppen ezért nagyon fontos ennek elkerülése. Egyik megoldási lehetőség, hogy a kezdeti pH-t jóval pH5 alatt választjuk meg. Korábbi kísérleteink alapján, ahol a kezdeti pH fermentációra gyakorolt hatását vizsgáltuk, úgy döntöttünk, hogy a fermentációs elegy pH-ját 4-es értékre állítjuk.

Ilyen körülmények között, mindhárom, általunk vizsgált szubsztrát alkohol fermentációs tesztjét elvégeztük. Különböző hemicellulóz koncentrációk mellett (ahogy az az Anyagok és módszerekben is szerepel) vizsgáltuk az inhibitorok hatását. Az így elért eredmények igen jól tükrözik az előkezelt nyersanyagok inhibitor koncentrációjának különbségét. Nyersanyag analízis során egyértelműen kiderült, hogy a legmagasabb inhibitor koncentrációt az előkezelt fenyőfa hemicellulóz hidrolizátum frakciója tartalmazza, míg a kukoricaszár esetében ez szignifikánsan alacsonyabb volt. Ezt bizonyítja, hogy a kukoricaszár esetében az inhibitorok nem befolyásolták a fermentációt, míg a fenyőfa

esetében a hemicellulóz frakció koncentrációját 50tf% fölé nem tudtuk emelni, mivel ekkor már az inhibitorok koncentrációja elérte azt a kritikus értéket, ahol az általunk használt törzs fermentációra képtelen volt. Az elért legmagasabb végső alkohol koncentrációkat az alábbi ábra (3. ábra) szemlélteti.



3. ábra Fermentáció során elért végső alkohol koncentrációk.

Kísérleteink során arra is választ kerestünk, hogy az alkalmazott törzs inhibitor toleranciája javítható-e egy igen egyszerű és régóta ismert módszer segítségével, az ún. adaptációval. Ehhez a kísérletsorozathoz az inkulomot az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint melaszon növesztettük. A kísérletsorozatban egyedül a fenyőfa hemicellulóz hidrolizátumot teszteltük a következőkben leírtak szerint. Kiindulásként a legmagasabb hemicellulóz frakció koncentrációt vettük alapul, ahol a korábbiakban sem zavarta az inhibitorok jelenléte a fermentációt. Mivel a folyamatot online kísértük nyomon, ezért lehetőségünk volt még a növekedési fázisban leállítani a folyamatot, a sejteket szeparálni, majd egy következő, megemelt hemicellulóz koncentrációjú, táptalajon végezni az újabb fermentációt. Ezzel a módszerrel három lépésben emeltük a hemicellulóz frakció koncentrációját a kezdeti 60%-ról 65%-ra. A sejteket ezután szeparáltuk, majd a végső, 65%-os koncentráción, összehasonlítottuk a korábban is használt törzset, az általunk adaptált törzssel szemben. Az adaptált élesztővel elért végső alkohol koncentráció meghaladta a kívánt 5tf%-os koncentrációt, míg ugyanazon körülmények, ugyanazon inhibitor koncentráció mellett a *S. cerevisiae* ATCC 26602 törzs, adaptáció nélkül, etanol fermentációra képtelen volt.

Összefoglalás

A kísérleti munka eredményeként a következő megállapítások vonhatók le:

- a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 törzs, üzemi termelés esetén, a bakteriális befertőződés megakadályozására alkalmazott alacsony pH-án (pH4) is képes alkohol fermentációra gőzrobbantással előkezelt lignocellulózokon.

- A gőzrobbantással előkezelt lignocellulózokból, megfelelő előkezelés esetén, inhibitor rezisztens mikroorganizmussal (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602) végzett fermentáció során elérhető a gazdaságos, ipari méretű alkohol desztillációhoz szükséges 5tf%-os végső etanol koncentráció. Az előkezelés során használt SO₂ nem befolyásolja negatívan a fermentációt, ugyanakkor az előkezelés hatékonyságát növeli.

- A kiválasztott élesztő törzs inhibitor tűrése folyamatos adaptációval javítható gőzrobbantással előkezelt fenyőfán.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak az EU TIME projektnek (projekt szám ENK6-CT-2002-00604), a Rubik Alapítványnak és a Leonardo Programnak az anyagi támogatásért, továbbá a Lundi Egyetem Chemical Engineering Tanszéknek a minták előkezeléséért.

Irodalomjegyzék

- [1] National Geographic Magyarország, 29-59 (2004)
- [2] Bárdossy György, Lelkesné Felvári Gyöngyi, *Magyar Tudomány*, 62, (2006)
- [3] <http://www.complex.hu/kzldat/o05h0063.htm/o05h0063.htm> (2006. 04. 03.)
- [4] Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B., *Enzyme Microb. Technol.* 18, 312-331
- [5] Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W., van Dijken, J. P. *Yeast*. 8, 501-517 (1992)