AgEcon SEARCH
RESEARCH IN AGRICULTURAL & APPLIED ECONOMICS

The World's Largest Open Access Agricultural & Applied Economics Digital Library

This document is discoverable and free to researchers across the globe due to the work of AgEcon Search.

Help ensure our sustainability.

Give to AgEcon Search

AgEcon Search
http://ageconsearch.umn.edu
aesearch@umn.edu

*Papers downloaded from **AgEcon Search** may be used for non-commercial purposes and personal study only. No other use, including posting to another Internet site, is permitted without permission from the copyright owner (not AgEcon Search), or as allowed under the provisions of Fair Use, U.S. Copyright Act, Title 17 U.S.C.*

JOURNAL OF CENTRAL EUROPEAN GREEN INNOVATION
HU ISSN 2064-3004
Available online at http://greeneconomy.karolyrobert.hu/

BIOETANOL ELŐÁLLÍTÁSA NYÁRFA FŰRÉSZPORBÓL ENZIMATIKUS CUKROSÍTÁSSAL

Bioethanol Production from Poplar Sawdust by Enzymatic Saccharification

TOMKU ERIKA – KERESZTESI GÁBOR – LEHOCZKY ÉVA – KARÁCSONY ZOLTÁN – NAGY PÉTER TAMÁS

Összefoglalás

Napjainkban környezetvédelmi és gazdasági megfontolások miatt egyre intenzívebben kutatják a fosszilis energiahordózókat helyettesítő bioüzemanyagokat. Ezek közül a legrégebb óta és legnagyobb mennyiségben előállított termék a bioetanol. Jelen tanulmányban célunk volt megvizsgálni a nyárfa biomasszára alapozható bioetanol előállítás lehetőségeit. Ennek során a szubsztrátot enzimes úton cukrosítottuk és a cukrokat Saccharomyces cervisiae élesztővel fermentáltuk etilalkohollá. A cukrosításhoz tisztított cellulózbontó enzimeket vagy celluláztermelő mikróbákat (Aspergillus niger, Pseudomonas fluorescens és P. putida) használtunk. Eredményeink szerint a tisztított enzimekkel folytatott nyárfa-cukrosítás optimális körülményei (50 °C, pH 5) az egyéb lignocellulóz szubsztrátok esetében leírt értékeknek megfelelnek, a reakciók kihozatala pedig 0,7 v/v % etilalkohol volt. A S. cerevisiae-vel lefolytatott kevertkultúrás fermentációs kísérletekben a P. fluorescens és P. putida fermentációs partnerek esetén, alacsony, 0,2 v/v% etanol termelést mértünk. A leghatékonyabb eljárásnak az A. niger és S. cerevisiae fajokkal kivitelezett, kevertkultúrás fermentáció bizonyult, mely esetében 1 v/v% etanol kihozatalt mértünk.

Kulcsszavak: *bioetanol, lignocellulóz, celluláz, nyárfa*

Jel Kód: *Q49*

Abstract

Nowdays because of economic and ecological reasons, the substitution of fossil fuels by biofuels is intensely studied. Bioethanol have been produced for the longest time and in the largest amounts in the group of biofuels. In the present study our goal was the investigation of the capability of poplar wood for biethanol production. For this purpose the poplar sawdust was saccharified by enzymatic digestion and the sugars were fermented to ethanol by Saccharomyces cerevisiae. For the saccharification, purified cellulose degrading enzymes or cellulase producing microorganisms (Aspergillus niger, Pseudomonas fluorescens and P. putida) were used. The optimal conditions for the saccharification by purified cellulolytic enzymes were the same which described in the case other lignocellulosic substrates (50 °C, pH 5). The productivity of this process was 0.7 v/v% ethanol. In the case of fermentation of sawdust by co-culured S. cerevisiae and P. fluorescens or P. putida strains, the productivity was very low (0.2 v/v% ethanol). The most efficient method was the fermentation of poplar sawdust by

co-cultured A. niger and S.cerevisiae strains, which produced 1 v/v% ethanol.

***Keywords**: bioethanol, lignocellulose, cellulase, poplar*

Bevezetés

A kőolaj alapú energiahordozók régóta fontos szerepet játszanak a mindennapjainkban, felhasználásuk mértéke az iparosodás terjedése miatt jelenleg is fokozódik (Agrawal, 2007). Felhasználjuk elektromosság előállítására, vegyipari alapanyagként, vagy üzemanyagként. Ez utóbbi célra a világ kőolajtermelésének 58%-át hasznosítják (Escobar et al., 2009). Napjainkban komoly erőfeszítéseket tesznek a kőolaj alapú üzemanyagok helyettesítésére. Erre a célra olyan alternatív energiahordozók szolgálhatnak, mint a bioüzemanyagok (bioetanol, biodízel, biogáz). A bioüzemanyagok használata az egyértelmű környezetvédelmi haszon mellett (nettó széndioxid kibocsátás lényegesen alacsonyabb, kevesebb szennyező anyag), technológiai (motor sűrítési arányának fokozása) és gazdasági (energiafüggetlenség kőolajkitermelő államoktól) szempontból is előnyökkel bír (Reinjders 2006).

A bioetanol a legnagyobb mennyiségben és legrégebb óta használt bioüzemanyag, mely biológiailag megújuló alapanyagokból, mikróbák (rendszerint élesztők) által fermentált, túlnyomórészt etilalkoholt tartalmazó desztillált folyadék. Üzemanyagként felhasználható önmagában, vagy fosszilis üzemanyagokhoz keverve is. Az első generációs bioetanol előállításához nagy cukor, vagy keményítőtartalmú anyagokat, mint kukorica (Nicolic et al., 2010), búza (Talebina et al., 2010), rizs (When – Hua et al., 2011) és cukornád (Furtado et al., 2011) használnak fel. Az első generációs bioetanolt napjainkban több ország igen nagy mennyiségben állítja elő, mint például az Egyesült Államok, Brazília és Kína (http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production). Ennek költségei azonban az alapanyagok előállításába bevont mezőgazdasági termőterületek növelésével folyamatosan fokozódnak (Ajanovic, 2010). A második generációs bioetanol esetében magas lignocellulóz tartalommal bíró anyagokat, mint mezőgazdasági hulladékot (Kádár et al., 2004), faanyagot (Bollók et al., 2000) és papírhulladékot (Lark et al., 1997) használnak alapanyagként. A második generációs bioetanol előnye, hogy élelmezésre nem használható növényi részeket és mezőgazdasági hulladékokat hasznosít. Azonban a cukorforrást képező lignocellulóz kristályos szerkezete miatt az alapanyag előkezelésének költségei nagymértékben megnőnek (Stevens et al., 2004) az első generációs bioetanolhoz képest. A lignocellulóz cukrosítása kémiai hidrolízissel (savas/lúgos), vagy enzimes hidrolízissel (cellulázok, cellobiohidrolázok, β-glükozidázok) valósítható meg. Ez utóbbi környezetvédelmi szempontból előnyösebb, mivel nem szükséges az előkezeléshez használt vegyszerek semlegesítése. A lignocellulóz-bioetanol konverzió kivitelezhető szakaszosan, időben és térben elválasztva a cukrosítás és glükóz-etanol konverzió folyamatát, vagy egy reakciótérben és egy időben kivitelezve a cellulóz-glükóz és glükóz-etanol átalakításokat (szimultán cukrosítás és fermentáció). Ez utóbbi kivitelezhető celluláz enzim+élesztő, vagy celluláztermelő mikróba+élesztő (kevertkultúrás fermentáció) rendszerekben is. Számos előnye ellenére a második generációs bioetanol előállítási stratégiák lényegesen drágábbak a fosszilis üzemanyagok, de még az első generációs bioetanol előállításához képest is.

Jelen tanulmányban célunk volt megvizsgálni a hazai nyárfa fajok (*Populus nigra* és *P. alba*) felhasználási lehetőségeit második generációs bioetanol előállítása céljából. A nyárfára, mint alapanyagra azért esett a választásunk, mivel hazánkban igen elterjedt fa, melynek a bútor- és építőipari felhasználása nem jelentős. Kísérleteket kiviteleztünk a nyárfa enzimatikus cukrosítása, illetve a cukrok etilalkohollá történő fermentálása céljából a 2014-es évben. A

kísérletek során a szakaszos és egyidejű cukrosítás és etilalkohol fermentáció lehetőségeit is megvizsgáltuk. Cellulázforrásként tisztított enzim és celluláztermelő mikróbák (*Aspergillus niger, Pseudomonas sp.)* is felhasználásra kerültek. A cukrok etilalkohollá történő fermentációját *Saccharomyces cerevisiae* élesztővel végeztük.

Anyag és módszer

Felhasznált törzsek és tenyésztési körülmények

A gombatörzsek fenntartása YPD táptalajon (2 w/v% glükóz, 1 w/v% pepton, 0,5 w/v% élesztőkivonat, 2 w/v% agar) történő folyamatos tenyésztéssel történt 30 °C hőmérsékleten. Fermentációs kísérletekhez a *S. cerevisiae* törzset YPD tápoldatba oltva neveltük elő, 30 °C hőmérsékleten, kevertetés (180 rpm) mellett, 2 napig. A baktériumtörzsek fenntartása Luria-Bertani (LB) táptalajon (1 w/v% tripton, 1 w/v% NaCl, 0,5 w/v% élesztőkivonat, 2 w/v% agar) történő tenyésztéssel történt. Fermentációs kísérletekhez a baktériumtörzseket LB tápoldatba oltva neveltük elő, 30 °C hőmérsékleten, kevertetés (180 rpm) mellett, 2 napig.

1. táblázat: Felhasznált mikróbatörzsek listája

Gombák	**Forrás**
Saccharomyces cerevisiae (Uvaferm 228)	Uvaferm
Aspergillus niger (SZMC 0145)	Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék törzsgyűjteménye
Baktériumok	
Pseudomonas putida	Szuro-Trade Kft.
Pseudomonas fluorescens	Szuro-Trade Kft.

Felhasznált nyárfa minták

A fermentálható cukrok előállításához nyárfa fűrészport használtunk, melyet előzetesen 0-200 µm és 200-400 µm szemcseméretű frakciókra szeparáltunk rostálással. A nyárfa fűrészpor frakciókat vagy közvetlenül használtuk fel enzimatikus cukrosításhoz, vagy előzőleg lúgos hidrolízisnek (1 vagy 3 w/v% NaOH, 5 órás forralás kuktában) vetettük alá.

Nyárfa minták enzimatikus hidrolízise fermentálható cukrokká

Az nyárfa fűrészporok enzimes hidrolíziséhez az alábbi reakcióelegyet mértük össze: 2,5 g nyárfa fűrészporhoz citrát-foszfát puffert (51,4 mM Na_2HPO_4; 23,4 mM citromsav; pH 5) adtunk, úgy hogy az elegy végtérfogata 50 ml legyen. Az elegyet autoklávban sterileztük (120 °C, 30 perc), majd vízfürdőben 50 °C hőmérsékletre hűtöttük. A lehűtött elegyhez 0,5 unit/ml koncentrációban celluláz enzimet (Cellulase from *Aspergillus niger*, Fluka) adtunk, majd mágneses keverőn (750 rpm), 50 °C hőmérsékleten inkubáltuk. 4 óra inkubálást követően a reakcióelegyhez 1 unit/ml koncentrációban cellobiáz enzimet (Cellobiase from *Aspergillus niger*, Sigma) adtunk és a fenti hőmérsékleten és kevertetési sebességgel tovább inkubáltuk. A reakciót bizonyos esetekben 0,25 w/v% PEG 8000-el (polietilén-glikol 8000, Sigma) kiegészítettük. A hidrolízis nyomonkövetése érdekében a reakcióelegyekből 0, 4, 8, 24 és 48 óra inkubálást követően mintát vettünk, szűrőpapírral leszűrtük és a szűrletből meghatároztuk a redukáló cukrok mennyiségét.

Nyárfa hidrolizátumok fermentációja etilakohollá

A korábbiakban leírtak szerint, 24 óra inkubálást követően előállított nyárfa hidrolizátumokat nitrogénforrásként 1 mg/ml ammónium-szulfáttal egészítettük ki, majd *S. cerevisiae* sejtekkel oltottuk be, úgy hogy 10^6 élesztősejt legyen 1 ml térfogatban. A fermentációkat 30 °C hőmérsékleten végeztük, statikus körülmények közt. A glükóz-etanol konverzió nyomonkövetése érdekében 3 és 7 nap inkubációt követően mintát vettünk, szűrőpapírral átszűrtük és meghatároztuk a szűrlet etanoltartalmát.

Nyárfa fűrészpor konverziója etilakohollá kevertkultúrás fermentációval

A kevertkultúrás kísérletekhez nyárfa fűrészporhoz citrát-foszfát puffert (51,4 mM Na_2HPO_4; 23,4 mM citromsav; pH 5) és ammónium-szulfátot mértünk, úgy hogy az elegy fűrészpor tartalma 50 g/l és ammónium-szulfát tartalma 1 mg/ml legyen. Az elegyet autoklávval sterileztük (120 °C, 30 perc), majd 30 °C-ra hűtöttük. Az elegyeket *S. cerevisiae* sejtekkel (10^5 db/ml) oltottuk be, mely mellett *A. niger* spórákat (10^4 db/ml), vagy *Pseudomonas sp.* (*P. putida*, vagy *P. fluorescens*) sejteket (10^4 db/ml) is inokuláltunk. A fermentációkat 30 °C hőmérsékleten végeztük, a *Pseudomonas* fajok esetében statikus körülmények közt, *A. niger* esetén statikusan és kevertetés mellett (180 rpm) is. A cellulóz-etanol konverzió nyomonkövetése érdekében a kevertkultúrás fermentációkból 3, 7, 10, 12 és 15 nap inkubációt követően mintát vettünk, szűrőpapírral átszűrtük és meghatároztuk a szűrlet etilalkohol tartalmát.

Redukáló cukrok mennyiségi meghatározása fotometriás módszerrel (Miller 1959)

3 ml, desztillált vízzel tízszeresen hígított mintához 3 ml dinitroszalicilsav reagenst (1 w/v% 3,5-dinitro-szalicilsav, 0,2 w/v% fenol, 0,05 w/v% Na_2SO_3, 1 w/v% NaOH) mérünk, majd keverést követően vízfürdőben 5 percig forraljuk. A forralás után a mintát szobahőmérsékletre hűtjük, és 1 ml, 40 w/v%-os nátrium-kálium-tartarát oldatot adunk az elegyhez és újra megkeverjük. Ezt követően megmérjük a reakcióelegy fényelnyelését 575 nm hullámhosszon (kvarc küvetta, 1 cm fényút). Kalibrációként glükóz standardet használtunk 5; 2,5; 1,25; 0,625 és 0 w/v% koncentrációkban. Minden mérést három alkalommal végeztünk.

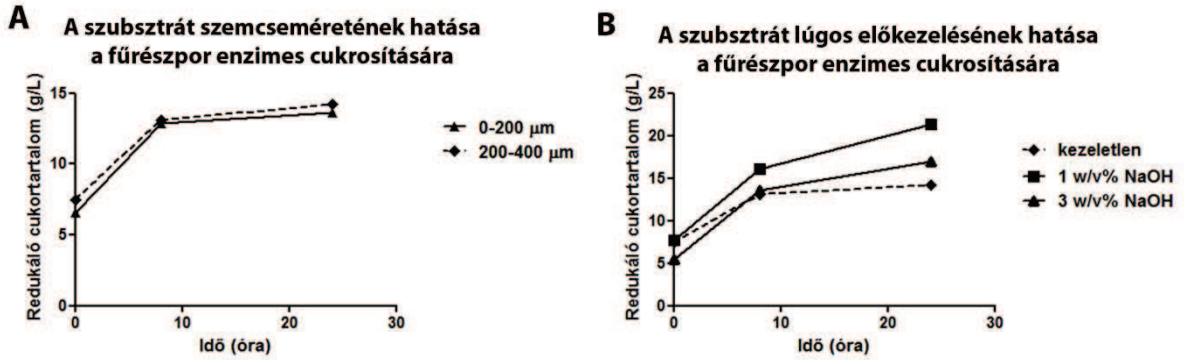
Etilalkohol mennyiségi meghatározása titrimetriás módszerrel

A mintaelőkészítés során 2 ml mintát 100 ml térfogatra egészítettünk ki desztillált vízzel, majd átdesztilláltuk (Gibertini desztilláló). Az így kapott folyadékot ismételten 100 ml térfogatra egészítettük ki desztillált vízzel, majd 50-50 ml térfogatokra osztottuk. 50 ml mintához 10 ml kálium-dikromát reagenst (43,5 mM $K_2Cr_2O_7$, 33 w/v% H_2SO_4) mértünk, majd 15 percig 70 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a reakcióelegyhez 10 ml kálium-jodid oldatot (30 w/v% KI, 0,4 w/v% NaOH), 10 ml 16 w/v% kénsavat és 10 ml keményítő oldatot (1 w/v% keményítő, 2 w/v% KI, 0,04 w/v% NaOH) mértünk, majd megkevertük. A reakcióelegyet nátrium tioszulfát mérőoldattal (1,38 w/v% $Na_2S_2O_7$, 0,2 w/v% NaOH) titráltuk, míg a kék színű keményítő-jód komplex el nem színtelenedett. Az etilalkohol koncentrációkat a mérőoldat fogyásokból számítottuk etilalkohol standard (0; 2,5 és 5 v/v% etanol) felhasználásával. Minden mérést három ismétlésben végeztünk.

Eredmények

A nyárfa fűrészpor paramétereinek hatása az enzimes hidrolízis sebességére

Megvizsgáltuk a nyárfa fűrészpor két különböző szemcseméretű frakciója esetén (0-200 µm és 200-400 µm) az enzimes hidrolízisének a sebességét (1/A ábra), nyomonkövetve a reakcióelegyek redukáló cukortartalmát (lásd „Anyagok és módszerek"). Eredményeink szerint, bár a kisebb szemcseméretű fűrészpor esetén nagyobb a folyadék-szubsztrát határfelület, a szemcseméret mégsem befolyásolta a reakció sebességét egyik vizsgált szakaszban (0-8 és 8-24 óra) sem. A két szemcseméret esetén mért redukáló cukormennyiségek szignifikánsan nem tértek el egymástól. Mindkét szemcseméret esetén a reakció telítési kinetikát követett és a kihozatal mindkét esetben kb. 14 g/l redukáló cukor volt.



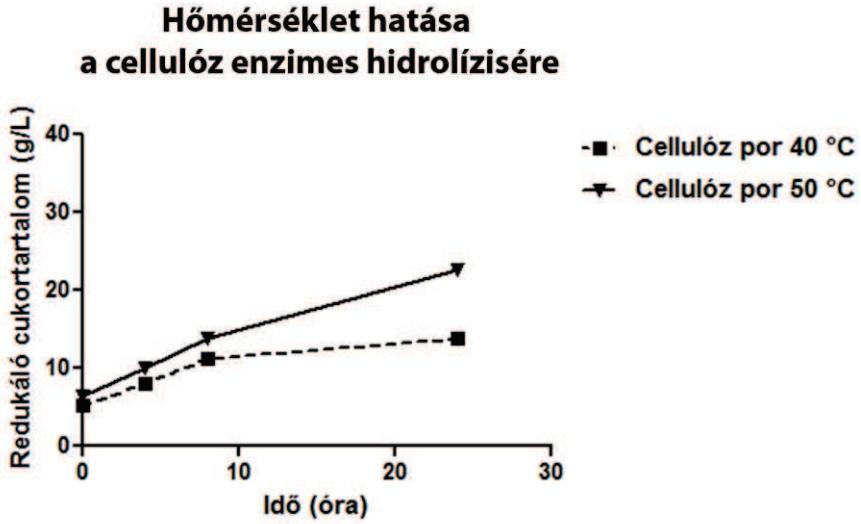
1. ábra: A: Nyárfa fűrészpor enzimatikus hidrolízisének dinamikája 0-200 és 200-400 µm szemcseméretű szubsztrátok esetén. B: Lúgos hidrolízissel előkezelt (1 w/v% NaOH és 3 w/v% NaOH) és nem kezelt (kezeletlen) 200-400 µm szemcseméretű nyárfa fűrészporok enzimatikus hidrolízisének dinamikája.

Összehasonlítottuk a kezeletlen, illetve lúgos előkezelésen (1 és 3 w/v% NaOH) átesett 200-400 µm szemcseméretű minták enzimes hidrolízisének sebességét (1/B ábra). Azt találtuk, hogy a lúgos előkezelésen átesett minták esetén a reakció mindkét vizsgált szakaszában (0-8 óra, illetve 8-24 óra) nagyobb sebességgel szabadult fel redukáló cukor. A reakció kihozatala is magasabbnak bizonyult a lúggal előkezelt minták esetén (1 w/v% NaOH: 21,3 g/l; 3 w/v% NaOH: 17,2 g/l; kezeletlen: 14 g/l redukáló cukor). Az eredmény nem meglepő, hiszen a lúgos kezelés hatására a cellulóz kristályossága csökken és a celluláz reakciót gátló lignin is részben degradálódik.

A reakciók első szakaszában (0-8 óra) minden minta esetén sokkal nagyobb mennyiségű redukáló cukor szabadult fel mint a második szakaszban (8-24 óra), úgy hogy a reakció végére a szubsztrát nagyobbik hányada nem használódott fel. A reakció nagymértékű lelassulása felveti valamely a reakciót gátló faktor (pl. enzim inaktiváció, termék gátlás) limitáló tényezőként történő megjelenését a reakcióban.

A nyárfa fűrészpor enzimes cukrosítását gátló tényezők vizsgálat

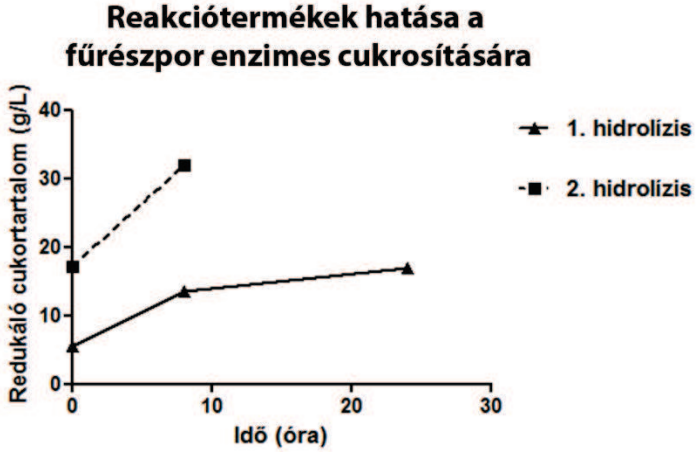
Több kísérletet végeztünk el annak felderítésére, hogy mely faktorok okozhatják a cukrosítási reakció lelassulását. Összehasonlítottuk a reakciósebesség és kihozatal alakulását az alkalmazott celluláz enzim optimális reakcióhőmérsékletén (50 °C) és alacsonyabb hőmérsékleten (40 °C), annak érdekében, hogy az enzim hőinaktivációjának lehetőségét megvizsgáljuk (2. ábra). Ebben a kísérletben szubsztrátként nyárfa fűrészpor helyett cellulózport alkalmaztunk, hogy a nyárfában található esetleges gátló anyagok ne befolyásolják az enzimaktivitást.



2. ábra: Porított cellulóz 40 °C (Cellulóz por 40 °C) és 50 °C (Cellulóz por 50 °C) hőmérsékleteken kivitelezett enzimatikus hidrolízisének dinamikája.

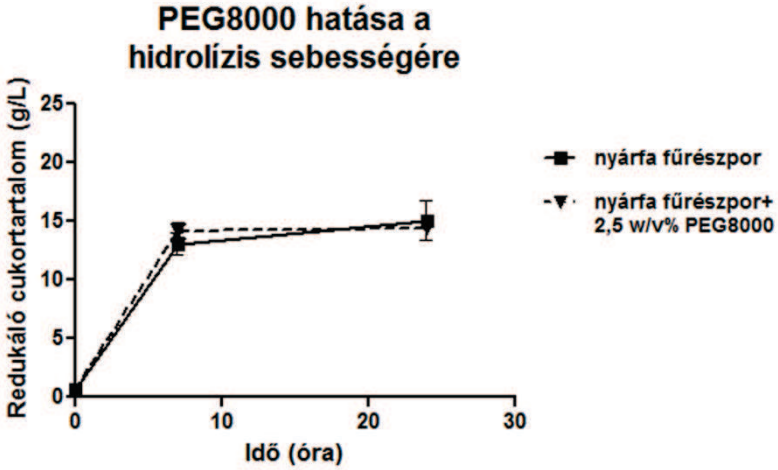
Az idő elteltével a reakciósebesség lényegesen kisebb mértékben csökkent, mint a szubsztrátként nyárfa fűrészport tartalmazó reakciók esetén (1. ábra), tehát a celluláz reakció nyárfa fűrészpor hidrolízise során bekövetkező gátlása főként a szubsztrát tulajdonságainak tudható be. Az alacsonyabb hőmérséklet nem fokozta a reakció kihozatalát, így az enzimek jelentős hőinaktivációjának lehetőségét kizárhatjuk.

A lignocellulóz enzimes cukrosítását nagymértékben gátolhatják a szubsztrátból a reakció során felszabaduló vízoldható anyagok (pl. pentózok, hexózok, fenolok). Annak érdekében, hogy ennek lehetőségét megvizsgáljuk 200-400 μm szemcseméretű, 3 w/v% NaOH-al előkezelt nyárfa fűrészport hidrolizáltunk 24 órán keresztül (3. ábra, 1. hidrolízis). A hidrolizátumot átszűrtük, autoklávoztuk (120 °C, 30 perc) majd a szűrlethez friss fűrészport és enzimeket adva, a hidrolízist azonos körülmények közt megismételtük (3. ábra, 2. hidrolízis). A 3. ábrán bemutatott eredmények alapján látható, hogy a hidrolízis első (0-8 óra) szakaszában a 2. hidrolízis az 1. hidrolízis esetén mért értékhez hasonló reakciósebességet mutatott. Az eredményekből megállapítható, hogy az 1. hidrolízis során nem szabadult fel olyan vízoldékony gátlóanyag, mely a 2. hidrolízis során a reakció sebességét befolyásolta volna.



3. ábra: 200-400 μm szemcseméretű, 3 w/v% NaOH-al előkezelt nyárfa fűrészpor enzimes hidrolízisének (1. hidrolízis) és az 1. hidrolízisből származó szűrlettel újra összemért reakciónak (2. hidrolízis) dinamikája.

Miután a cellulózbontó enzimek instabilitását és a reakciótermékek gátló hatását, mint a nyárfa fűrészpor hidrolízisét potenciálisan limitáló tényezőket kizártuk, kísérletet végeztünk, hogy megvizsgáljuk a nyárfa fűrészpor lignintartalmának gátló hatását a cellulóz hidrolízisére. A cellulózt hidrolizáló enzimek képesek aspecifikusan kötődni a szubsztrát lignin molekuláihoz, azonban azok elbontására nem képesek, így az enzimek a ligninhez kötődve immobilizálódnak és nem képesek részt venni a cellulózmolekulák hasításában. Ez a hatás a felületaktív anyagok (pl. polietilén-glikol) alkalmazásával kiküszöbölhető, melyek a ligninhez kötődve megakadályozzák a celluláz enzimek immobilizálódását. Kísérletünkben 0-200 μm szemcseméretű, kezeletlen nyárfa fűrészport vetettünk alá enzimes hidrolízisnek. A reakcióelegyet az egyik esetben 2,5 w/v% PEG8000-el (polietilén-glikol) kiegészítettük (4. ábra).

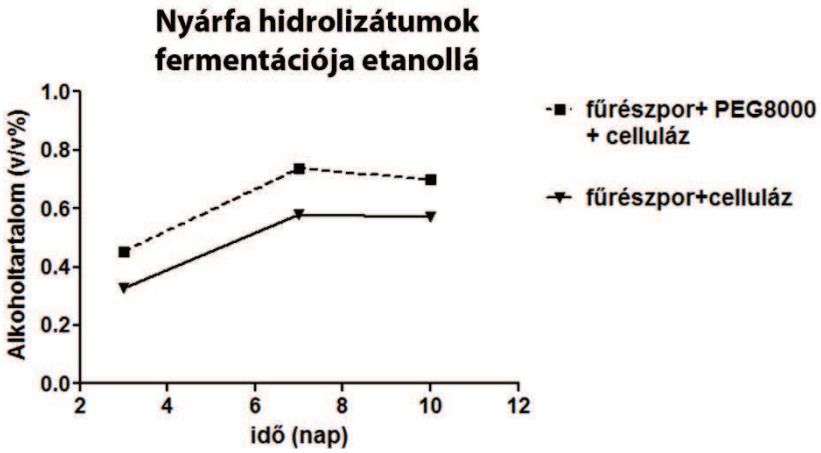


4. ábra: 0-200 μm szemcseméretű nyárfa fűrészpor hidrolízisének dinamikája 2,5 w/v% PEG8000 jelenlétében (nyárfa fűrészpor+2,5 w/v% PEG8000) és hiányában (nyárfa fűrészpor).

A polietilén-glikol a szubsztrát ligninmolekuláihoz kötődve megakadályozza a celluláz enzimek adszorpcióját (Sipos et al., 2011). Azonban kísérletünkben a PEG8000

reakcióelegyhez történő hozzáadása sem a hidrolízis sebességét, sem kihozatalát nem befolyásolta. Mindkét minta esetén 15 g/l maximális redukáló cukortartalmat mértünk. Ez alapján feltételezhető, hogy a nyírfa fűrészpor által a celluláz reakcióra kifejtett gátló hatást nem a lignin okozza.

Nyárfa fűrészpor enzimes hidrolizátumainak fermentálása etilakohollá



5. ábra: 200-400 µm szemcseméretű nyárfa fűrészpor PEG8000 jelenlétében (fűrészpor+PEG8000+celluláz), vagy hiányában (fűrészpor+celluláz) készült enzimes hidrolizátumainak fermentációja etanollá *S. cerevisiae*-vel.

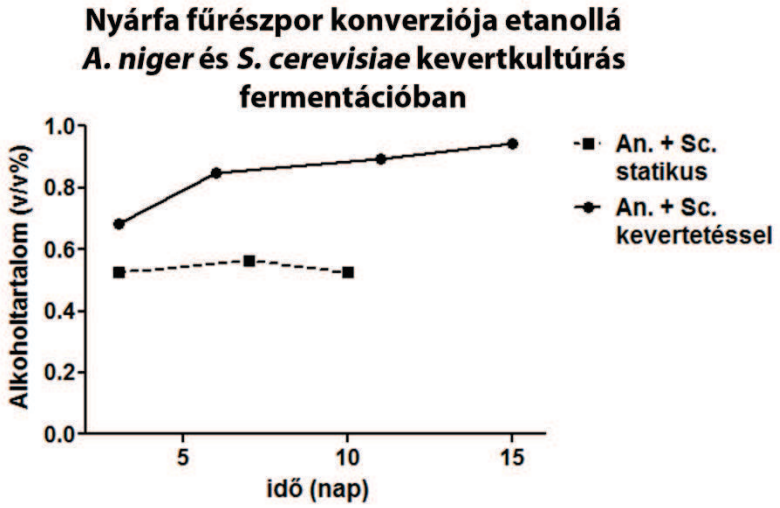
A nyárfa hidrolizátumok bioetanollá történő fermentációjához 200-400 µm szemcseméretű, lúgos előkezelést nem kapott fűrészporokat 2,5 w/v% PEG8000 jelenlétében (5. ábra, fűrészpor+PEG8000+celluláz) vagy hiányában (fűrészpor+celluláz) enzimekkel hidrolizáltunk 24 órán keresztül, majd nitrogénforrással kiegészítve és *S. cerevisiae* sejtekkel beoltva etilalkohollá fermentáltuk a hidrolizátumok cukortartalmát (lásd Anyagok és módszerek). A fementáció nyomonkövetésére 3, 7 és 10 nap inkubálást követően mintákat vettünk és meghatároztuk azok alkoholtartalmát. Az eredményeket az 5. ábrán mutatjuk be.

A diagramon jól látszik, hogy a fermentáció 7. napjáig mindkét minta esetén az alkoholtartalom növekszik, majd azt követően kismértékű csökkenésbe kezd. Ez utóbbi megmagyarázható azzal, hogy az élesztők a fermentálható cukrok elfogyásával az addig megtermelt etilalkoholt használták fel szén és energiaforrásként. A PEG8000-el kezelt minták esetén tapasztalt magasabb értékek feltehetőleg abból adódnak, hogy a polietilén-glikol valamilyen módon interferált a mérési eljárással, hiszen korábbi kísérleteink szerint a PEG8000 nem fokozza a redukáló cukrok kihozatalát a hidrolízis során (lásd fentebb). Összességében mindkét minta esetén alacsony, megközelítőleg 0,6 v/v% alkoholtartalom volt mérhető.

Nyárfa fűrészpor konverziója etilakohollá kevertkultúrás fermentációval

A nyárfa fűrészpor-etanol konverzió kevertkultúrás rendszerben történő kivitelezéséhez a cukrok erjesztését végző *S. cerevisiae* mellett magas celluláztermelésű fonalasgomba (*A. niger*) és baktériumfajokat (*P. putida és P. fluorescens*) használtunk fermentációs partnerként (lásd Anyagok és módszerek). Az *A. niger* és *S. cerevisiae* törzsekkel végzett kevertkutltúrás fermentációkat statikus és kevertetett körülmények közt is kiviteleztük. A fermentáció

nyomonkövetésére a fermentlevekből mintát vettünk és meghatároztuk azok etanoltartalmát (6. ábra).

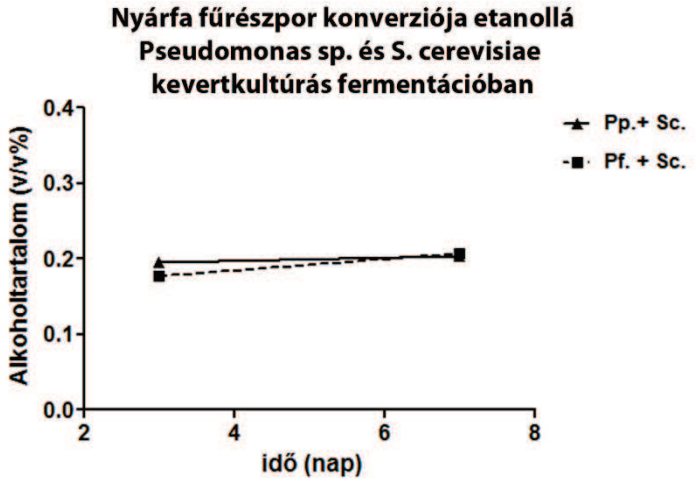


6. ábra: 200-400 μm szemcseméretű nyárfa fűrészpor konverziója etanollá *A. niger* és *S. cerevisiae* kevertkultúrás fermentációkban statikus (An. + Sc. statikus) és kevertetett (An.+ Sc. kevertetett) körülmények közt.

A statikus és kevertetett kísérleti elrendezés közti fő különbség, hogy statikus körülmények közt az obligát aerob *A. niger* csak a fermentlé felületén képes növekedni, míg a fakultatív anaerob *S. cerevisae* a folyadék teljes térfogatában. Így az *A. niger* biomassza mennyisége korlátozható és rövidebb idő alatt éri el maximumát. Ez előnyös egyrészt, mert az *A. niger* asszimilálja a fermentálható cukrokat, de etanolt nem állít elő, valamint azért mert az élesztő szaporodását gátló peptideket is termel (Gun Lee et al., 1999). A statikus körülmények közt végzett kevertkultúrás fermentáció esetén (6. ábra, An.+Sc. statikus) a vizsgálat teljes ideje alatt (15 nap) növekedett az alkohol mennyisége (1 v/v% maximális alkoholtartalom), míg a kevertetett tenyészetek (6. ábra, An.+Sc. kevertetéssel) esetén az összes mérési időpontban lényegesen alacsonyabb alkoholtartalmat mértünk, mely a mérési időpontok között lényeges mértékben nem változott.

A *Pseudomonas* fajokkal végzett kevertkultúrás vizsgálatok (lásd Anyagok és módszerek) esetén a fermentációkat statikus körülmények közt kiviteleztük. A folyamat nyomonkövetésére mintákat vettünk és meghatároztuk azok etanoltartalmát (7. ábra).

Az alkoholkihozatal *P. putida* (7. ábra, Pp.+Sc.) és *P. fluorescens* (7. ábra, Pf.+Sc.) baktériumfajok esetén is igen alacsony volt (kb. 0,2 v/v%) és nem változott a két mérési időpont (3 és 7 nap) között. Ennek valószínű oka a baktériumtörzsek *S. cerevisiae* sejtekre kifejtett gátló hatása.



7. ábra: 200-400 µm szemcseméretű nyárfa fűrészpor konverziója etanollá *S. cerevisiae* kevertkultúrás fermentációkban *Pseudomonas putida* (Pp.+Sc.) és *Pseudomonas fluorescens* (Pf.+Sc.) baktériumfajokkal.

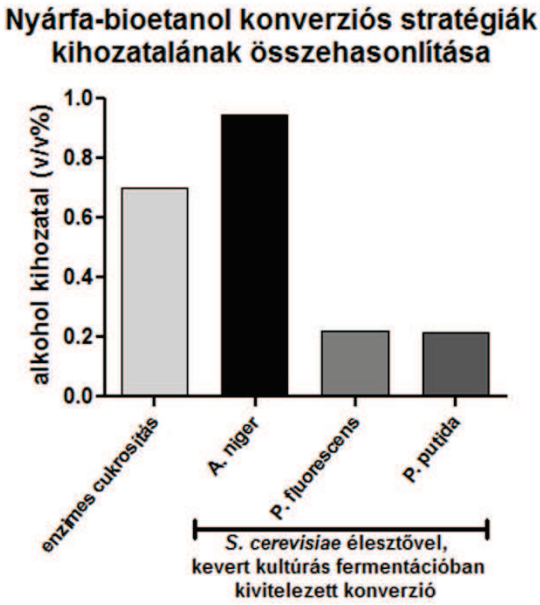
A vizsgált nyárfa-bioetanol konverziós stratégiák összehasonlítása

A nyárfa fűrészpor *A. niger* cellulózbontó enzimekkel történő cukrosításához az egyéb lignocellulóz szubsztrátok esetén a szakirodalomban megadott körülmények bizonyultak optimálisnak (50 °C hőmérséklet; pH 5; 1 w/v% NaOH előkezelés) (Sridevi et al., 2015). A maximális kihozatal a redukáló cukrokra nézve 21,3 g/l (42,6%-os cukrosítás) érték volt. A reakciók minden esetben az inkubáció első 24 órája alatt lelassultak. Ezért a cukrosítás mértékének fokozására megvizsgáltuk a reakciót gátló lehetséges faktorokat. Eredményeink szerint sem az enzimek instabilitása, sem a termékgátlás jelensége, sem az enzimek ligninhez történő adszorpciója nem okozhatja a reakciók tapasztalt lelassulását. A gátló hatás a szubsztrát valamely a kísérlet során nem hidrolizálódó komponenséhez, feltételezésünk szerint a xilánhoz köthető (Zhang et al., 2012). Az celluláz enzimekkel előállított hidrolizátumokból etanolt fermentáltunk *S. cerevisiae* élesztő segítségével 30 °C hőmérsékleten. A maximális alkoholmennyiséget (0,7 v/v%) 3 nap fermentációt követően mértük (8. ábra).

A kevertkultúrás kísérletekben a *Pseudomonas* baktériumfajok (*P. putida* és *P. fluorescens*) fermentációs partnerként történő felhasználása sikertelen volt, a megtermelt alkohol mennyisége csak 0,2 v/v% volt (8. ábra).

Az *A. niger* és *S. cerevisiae* gombafajok kevert kultúrás felhasználását lignocellulóz-bioetanol konverzió céljából több szubsztrát esetében sikerrel alkalmazták már (Ado et al., 2009; Agbodike et al., 2013), így kézenfekvő volt ezt az eljárást is megvizsgálnunk. Eredményeink szerint az *A. niger* és *S. cerevisiae* statikus kevertkultúrás fermentációja hatékonynak bizonyult, az alkoholtermelés 1 v/v% volt. Eredményeink arra is rámutattak, hogy a sikeres kevertkultúrás fermentáció gondos optimalizálást igényel, az *A. niger* élesztőre kifejtett gátló hatása miatt.

A nyárfa fűrészpor-bioetanol konverzió céljából megvizsgált különböző kísérleti elrendezések közül az *A. niger* és *S. cerevisiae* kevertkultúrás fermentáció esetén mértük a legmagasabb alkohol kihozatalt (8. ábra). Ez adódhat abból, hogy az *A. niger* gombasejtek folyamatosan pótolják a reakció során inaktiválódó cellulózbontó enzimeket, valamint az *A. niger* képes



8. ábra: A nyárfa-bioetanol konverzióra felhasznált különböző módszerek hatékonyságának összehasonlítása. enzimes cukrosítás: nyárfa fűrészpor hidrolízise tisztított enzimekkel, majd szeparált fermentációja etanollá *S. cerevisiae* élesztővel; A. niger: nyárfa fűrészpor *S. cerevisiae* és *A. niger* kevert kultúrás fermentációja etanollá; P. fluorescens: nyárfa fűrészpor *S. cerevisiae* és *P. fluorescens* kevert kultúrás fermentációja etanollá; P. putida: nyárfa fűrészpor *S. cerevisiae* és *P. putida* kevert kultúrás fermentációja etanollá

degradálni a szubsztrátban a celluláz reakció gátlásáért valószínűsíthetően felelős xilán molekulákat (Kavay – Tallapragada 2009). Ezek az előnyös hatások a tisztított enzimekkel végzett cukrosítás során nem léphetnek fel.

Következtetések

Jelen tanulmányban igazoltuk, hogy a nyárfa fűrészpor a szakirodalomban eddig megvizsgált lignocellulóz szubtrátokhoz hasonló mértékben hidrolizálható enzimek segítségével (Sridevi et al., 2015). Azonban, a hidrolizátum cukortartalma még mindig jelentős mértékben elmarad az első generációs bioetanol előállítása során alkalmazott fermentációs alapanyagtól és a szubsztrát előkezelésének járulékos költségei miatt is lényegesen olcsóbb az első generációs bioetanol (Naik ez al. 2010). Az első generációs bioetanolok és az élelmiszeripar termőföldekért történő versengése miatt, a technológia hiányosságai mellett is preferált a második generációs bioetanol előállításának fejlesztése. Az egyik legfontosabb megoldandó probléma a lignocellulóz szubsztrátok estében fellépő, az enzimes hidrolízist gátló hatások kiküszöbölése (Jönsson et al. 2013). Feltételezésünk szerint, nyárfa fűrészpor esetén, a hidrolízis gátlásában szerepet játszó fő tényező a szubsztrát xilán-tartalma lehet, melynek hatása kiküszöbölhető xilanáz enzimek (Shen et al. 2011), vagy xilanázokat termelő mikróbák (Svetlitchnyi et al. 2013) felhasználásával. Ez utóbbi lehetőség működőképességét *A. niger*

felhasználásával végzett kevertkultúrás kísérleteink is alátámasztják. A reakció során keletkező xilóz pedig megfelelő mikróbák alkalmazásával bioetanollá fermentálható (et al. 2011). Az ígéretes eredmények ellenére a nyárfa-bioetanol konverzió hatékonnyá és gazdaságossá tétele további számos kísérlet elvégzését igényli. Eredményeink szerint a leghatékonyabb és egyben legolcsóbb stratégia a fonalas gomba+élesztő kevertkultúrás fermentációk fejlesztése lehet.

Köszönetnyilvánítás

Jelen tanulmány a GOP—1.1-1-11-2012-0058 és TÁMOP 4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0010 pályázati források támogatásával készült. Köszönjük a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológia Tanszékének, hogy a kevertkultúrás fermentációkhoz az *A. niger* törzseket a rendelkezésünkre bocsátotta.

Készült a TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0010 projekt támogatásával.

Hivatkozott források

Ado S.A., Kachalla G.U., Tijjani M.B., Aliyu M.S. (2009) Ethanol production from corn cobs by co-culture of Saccharomyces cerevisiae and *Aspergillus niger*, Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 2:99-101

Agbodike T. C., Ado S. A., Abdullahi I. O. (2013) Bio-ethanol production from Elephant grass using co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and fermentation, South Asian Journal of Experimental Biology, 3:152-157

Agrawal A.K. (2007) Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuel for internal combustion engines. Progress in Energy and Combustion, 33:233-271

Ajanovic A. (2010) Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices? Energy, 3:2070–2076

Bollók M., Réczey K., Zacchi G. (2000) Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce to ethanol. Applied Biochemistry and Biotechnology. 86:69-80

Escobar J.C., Lora E.S., Venturini O.J., Yanez E.E., Castillo E.F., Almazan O. (2009) Biofuels: environment, technology and food security. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 13:1275-1278

Furtado A.T., Scandiffio M.I.G., Cortez L.A.B. (2011) The Brazilian sugarcane innovation system. Energy Policy, 39:156-166

Gun Lee D., Shin S.Y., Maeng C.Y., Jin Z.Z., Kim K.L., Hahm K.S. (1999) Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 263(3):646-51.

Jönsson L. J., Alriksson B., Nilvebrant N. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification, Biotechnology for Biofuels, 6:16-26

Kádár Zs., Szengyel Zs., Réczey K. (2004) Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. Industrial Crops Production, 20:103-110

Kavya V., Tallapragada P., (2009) Optimization of growth conditions for xylanase production by Aspergillus niger in solid state fermentation., Polish journal of microbiology, 58(2):125-30.

Lark M.M., Morissey P.J., (2012) Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast, Kluyveromyces marxianus. Biomass and Bioenergy, 12:135-143

Miller G.A. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analitycal Chemistry, 31(3): 426–428.

Naik S.N., Goud V. V., Rout P. K., Dalai A. K. (2010) Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14: 578–597

Nikolic S., Mijovic L., Pejin D., Rakin M., Vukasinovic M. (2010) Production of bioethanol from corn meal hydrolizates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. allipsoideus. Biomass and Bioenergy, 34:1449-1456

Talebina F., Karakashev D., Angelidaki I. (2010) Production of bioethanol from wheat straw: An overwiev on pretreatment, hydrolisis and fermentation. Bioresource Technology, 101:4744-4753

Reijnders L. (2006) Conditions for the sustainability of biomass based fuel use. Energy Policy, 34: 863-876.

Shen F., Kumar L., Hu J., Saddler J. N. (2011) Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and delignification on SHF and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates, Bioresource Technology, 102: 8945-8951

Silva J. P. A., Mussatto S. I., Roberto I. C., Teixeira J. A. (2011) ETHANOL PRODUCTION FROM XYLOSE BY *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 IN A STIRRED TANK BIOREACTOR, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28:151-156

Sipos B., Szilágyi M., Sebestyén Z., Perazzini R., Dienes D., Jakab E., Crestini C., Réczey K. (2011) Mechanism of the positive effect of polyethyleneglycol addition in enzymatic hydrolysis of steam pretreated lignocelluloses. Comptes Rendus Biologies, 334(11):812-23.

Sridevi A., Narasimha G., Ramanjaneyulu G., Dileepkumar K. (2015) Saccharification of pretreated sawdust by *Aspergillus niger* cellulase. *3 Biotech* (Nyomtatásba még nem került)

Stevens D.J., Worgetten M., Saddler J. (2004) Biofuels for transportation: an examination of policy and technical issues. IEA Bioenergy Task, Liquid Biofuels Final Report, Canada, 2001-2003

Svetlitchnyi V. A., Kensch O., Falkenhan D. A., Korseska S. G., Lippert N., Prinz M., Sassi J., Schickor A., Curvers S. (2013) Single-step ethanol production from lignocellulose using novel extremely thermophilic bacteria, Biotechnology for Biofuels, 6:31-46

Wen-Hua C., Ben-Li P., Ching-Tsun Y. Wen-Song H. (2011) Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw bya an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. Bioresource Technology, 102:2916-2924

Zhang J., Tang M., Viikari L. (2012) Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases, Bioresource Technology. 121:8-12

Szerzők

TOMKU Erika
kutatási segédmunkatárs
Károly Róbert Főiskola
Oktató-kutató Laboratórium
3213. Atkár, Tass-puszta
tomkuerika@gmail.com

KERESZTESI Gábor
technikus
Károly Róbert Főiskola
Oktató-kutató Laboratórium
3213. Atkár, Tass-puszta
keresztesig@karolyrobert.hu

Dr. LEHOCZKY Éva, DSc
egyetemi tanár
Károly Róbert Főiskola
Agrár és Környezettudományi Intézet
3200. Gyöngyös, Mátrai út 36.
lehoczky.eva@agrar.mta.hu

KARÁCSONY Zoltán
tudományos segédmunkatárs
Károly Róbert Főiskola
Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet
3301. Eger, Kőlyuktető, pf.:83
zkaracsony@szbki-eger.hu

Dr. habil NAGY Péter Tamás, PhD
egyetemi docens
Károly Róbert Főiskola
Oktató-kutató Laboratórium
3213. Atkár, Tass-puszta
nagypt@karolyrobert.hu