



MŰEGYETEM 1782

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék

BIOÜZEMANYAGOK ELŐÁLLÍTÁSA MELLÉKTERMÉKEKBŐL ÉS HULLADÉKOKBÓL

**HIDROGÉN ÉS ALKOHOL FERMENTÁCIÓ PAPÍRISZAPBÓL, KUKORICASZÁRBÓL ÉS
FÁBÓL**

PhD értekezés tézisei

Kádár Zsófia

*Témavezető
Dr Réczey Istvánné*

Budapest, 2005.

1 BEVEZETÉS, A KUTATÁS CÉLKITŰZÉSEI

A XXI. század alapproblémája a növekvő energiaigények kielégítése, miközben a rendelkezésre álló hagyományos energiaforrások kimerülőben vannak, és alkalmazásukat egyébként sem minősíthetjük környezetbarátnak. Mivel választott témámnak ez adja fontosságát, aktualitását, ezért a következőkben e két, igen lényeges problémát vázolom fel röviden.

A Föld felszínének átlaghőmérséklete az elmúlt században folyamatosan emelkedett. A tömegtermelés elterjedésével, a populáció növekedésével, a fosszilis energiahordozók használatával az atmoszférába egyre több gáz került. Ezeknek az ún. üvegházhatású gázoknak köszönhető, hogy Földünk nem hideg pusztaság, hiszen ez a rendszer tartja melegen. A probléma akkor kezdődött, amikor a modern kor embere nagy mennyiségben kezdett fosszilis eredetű (szén, kőolaj, földgáz) energiahordozókat - egyre növekvő igényei kielégítésére - elégetni. Ezzel drasztikusan növelte a levegő szén-dioxid, dinitrogén-oxid, metán, halogének és egyéb üvegházhatású gázok tartalmát, amely globális felmelegedéshez, éghajlatváltozáshoz vezethet/vezetett. A probléma megoldására nemzetközi egyezmények születtek (1992: Rio de Janeiro; 1997: Kyoto), amelyek a légkör szén-dioxid (CO₂) illetve más üvegházhatású gázok koncentrációjának szabályozását célozzák meg.

Az olaj – egyelőre - még nincs igazán fogytán. Azonban ha a kereslet tovább nő, (ez ma napi 80 millió hordó), akkor a hagyományos, könnyen hozzáférhető olaj kitermelése előbb tetőzni, majd csökkenni fog. A világ „kőolaj szomjúsága” alaposan nő, hiszen olajból nem csak üzemanyag, hanem a mindennapi életben használatos műszálas ruhák és műanyag tárgyak is készülnek. A globális olajkitermelés előbb – utóbb eléri a maximumát, s akkor jóval nehezebb lesz kielégíteni a keresletet. Azt a keresletet, amely csak Kínában egyes becslések szerint 2025-re akár napi 10 millió hordó is lehet. Természetesen az olajforrások nem hirtelen fognak eltűnni, hanem lassan apadnak majd el. Alternatív lehetőségek már léteznek (nap-, szélenergia, bioüzemanyagok stb.), azonban ezen alternatívák kidolgozása, megvalósítása sem pillanatszerű folyamat. Az idő tehát igenis szorít minket.....

Mindkét problémakörre megoldást jelenthet az alternatív üzemanyagok használata, hiszen alkalmazásukkal a légkörbe kerülő gázok koncentrációja jelentősen csökkenthető, akárcsak a kőolajtól való függőség is. A megújuló üzemanyagok közlekedésben történő felhasználását ösztönző 2003/30/EC direktíva előírja az EU tagállamok - így Magyarország számára is - a kötelezően megvalósítandó stratégiát és célkitűzést. A direktíva célja, hogy gondoskodjon egy közösségi keretfolyamatról, amely előmozdítaná a közösségen belül a közlekedésre szánt bioüzemanyagok használatát. 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. Ezen üzemanyagok előállítási költségei magasak, emiatt ma még nem versenyképesek.

Az energiaforrásokban szegény országoknak, így Magyarországnak is fontos, hogy figyeljen a kínálkozó új lehetőségekre, és hasznosítsa azokat az energiaellátásban. A megújuló források közül jelenleg a biomasszától várható a legjelentősebb hozzájárulás energiaigényünk fedezésére. Magyarországon a mező- és erdőgazdálkodásban, az első- és másodlagos ffeldolgozásban, változó formában és nagy tömegben keletkeznek biológiai eredetű melléktermékek és hulladékok. Ezek a maradványok szakszerűtlen kezelés esetén potenciális környezetszennyezők, ugyanakkor értékes másodnyersanyagok, energiahordozók

lehetnek. Hazánkban, éghajlati adottsága miatt, elsősorban gabonanövény- és kukoricatermelés folyik, melyből minden évben hatalmas mennyiségű hulladék keletkezik.

Cukor és keményítő tartalmú terményeinkből (cukorrépa, kukorica, búza, burgonya) nagyüzemi alkohol gyártási technológiák állnak rendelkezésre, míg a cellulóz tartalmú melléktermékek, hulladékok hasznosítása területén még a kutatás fázisában vagyunk. Ezzel a témával foglalkozik a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék „Nonfood” kutató csoportja, melynek munkájába kapcsolódtam be én is.

Kutatómunkám fő célja annak megállapítása, hogy Magyarországon a nagy mennyiségben keletkező ipari és mezőgazdasági hulladékok felhasználhatók-e bioüzemanyag gyártás nyersanyagául. Az ismert bioüzemanyagok közül a hidrogén és az alkohol előállításával foglalkoztam. A lehetséges előállítási technológiák közül mindkét esetben fermentációs eljárást használtam. Szubsztrátként vizsgáltam a papírgyáraknál nagy mennyiségben keletkező, ugyanakkor cellulózban igen gazdag papíriszap, illetve gőzrobbantással előkezelt kukoricaszár, fenyő-, és fűzfa alkalmazhatóságát. Mindezek alapján a kutatómunka három nagy témakörre osztható fel:

1. Hidrogén fermentáció ipari hulladékból (papíriszapból) anaerob, termofil és hipertermofil mikroorganizmusok segítségével.
2. Alkohol fermentáció ipari hulladékból termotoleráns élesztő törzs segítségével.
3. Alkohol fermentáció gőzrobbantással előkezelt lignocellulózokból (kukoricaszár, fenyő-, és fűzfa) inhibitor rezisztens élesztő törzs segítségével.

2 A KUTATÁS SORÁN ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

NYERSANYAGOK

A **hidrogén** és **alkohol** kísérletek során használt ipari hulladékok (papíriszap és OCC karton) a Dunapack Rt csepeli telephelyéről származtak.

A **hidrogén** fermentációs kísérletekhez használt papíriszap enzimes hidrolízise 4(w/w)% szárazanyag tartalom mellett 50°C-on, pH4.8-on zajlott egy 31 literes fermentorban, kereskedelemben kapható enzimmészítmények segítségével.

Az **alkohol** fermentációs kísérleteknél alkalmazott gőzrobbantott kukoricaszár, fenyő-, és fűzfa előkezelését a Lundi Egyetemen (Svédország) végezték.

ENZIMKÉSZÍTMÉNYEK

A papíriszap hidrolíziséhez, és az egyidejű cukrosítási és fermentációs (SSF) kísérletekhez kereskedelmi forgalomban lévő celluláz (Celluclast 1.5L) és β -glükozidáz (Novozyme 188) enzimmészítményeket használtam (Novo Industri A/S, ma: Novozymes, Bagsvaerd, Denmark).

MIKROORGANIZMUSOK

A **hidrogén** fermentációs kísérleteknél alkalmazott törzsek (*Thermotoga elfii* DSM 9442, *Thermotoga neapolitana* DSM 4359 és *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903) a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) törzsgyűjteményből származtak. Az inokulum készítését 100 ml-es zárt szérum edényben végeztem, 30 ml-nyi táptalajon, az egyes törzseknél: 72h-án át 65°C-on, 48h-án át 80°C és 24h-án át 70°C-on.

A papíriszapon és OCC kartonon végzett **alkohol** fermentációhoz bolti élesztőt (Budafoki Élesztő- és Szeszgyár KFT) és *Kluyveromyces marxianus* Y01070 (Nemzeti törzsgyűjtemény,

Szent István – ma Corvinus - Egyetem) élesztő törzset alkalmaztam. Az inokulumot 150ml táptalajon 30°C-on egy napig növesztettem 750ml-es Erlenmeyer lombikban.

A gőzrobbantással előkezelt lignocellulózok **alkohol** fermentációjához *Saccharomyces cerevisiae* ATTC 26602 jelű törzset alkalmaztam, amely az American Type Culture Collection törzsgyűjteményből származott. A sejtek elszaporítása (inokulumkészítés) 0,5l melasz táptalajon történt egy napig 32°C-on.

FERMENTÁCIÓS MÓDZSEREK

A **hidrogén** fermentációs kísérleteket először 100ml-es zárt rendszerben, ún. szérum edényben végeztem, 30ml hasznos térfogattal. Az edényeket különböző hőmérsékleten inkubáltam, attól függően, hogy melyik törzssel végeztem a munkát (65°C: *T. elfii*, 80°C: *T. neapolitana* és 70°C: *C. saccharolyticus*).

A szérum edényekben végzett előkísérlet sorozat után anaerob batch **hidrogén** fermentációkat végeztem papíriszap hidrolizátumon *C. saccharolyticus*-sal egy 2-L hőmérséklet (70°C) és pH (6.4) kontrolált bioreaktorban 10% (v/v) kezdeti inokulum mennyiséggel, 350rpm keverési fordulatszámon. A keletkezett hidrogén folyamatos eltávolítása a rendszerből nitrogén gázzal történt 7 L/h áramlási sebességgel.

Az SSF (Simultan Saccharification and Fermentation) és NSSF (Nonisothermal Simultan Saccharification and Fermentation) **alkohol** fermentációs kísérleteket 750ml-es Erlenmeyer lombikban végeztem, 500ml hasznos térfogatban. A szubsztrátok (Solka floc, OCC karton és a papíriszap) kezdeti koncentrációja 6%(m/m) volt. Minden esetben az elegyhez kereskedelmi enzimmészítményt (Celluclast 1.5 és Novozyme 188) használtam. A kezdeti élő sejt szám 2×10^9 sejt/ml koncentrációjú volt az oltás után. A tenyészetet 40°C-os rázógépen inkubáltam 96 órán keresztül, miközben a pH-t folyamatosan ellenőriztem, és szükség esetén a kívánt 4.4 és 5.3 tartomány közé állítottam. Az NSSF kísérletek során hasonlóan jártam el, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben egy egy napos előhidrolízist végeztem 50°C-on, majd a reakcióelegy hőmérsékletét 30°C-ra csökkentve oltottam be az inokulummal.

A gőzrobbantással előkezelt lignocellulózok **alkohol** fermentációjának vizsgálatához a hemicellulóz frakciókat centrifugálással elválasztottam, majd az előkezelt nyersanyag cellulóztartalmának megfelelő glükózt adagoltam, hogy az inhibitorok hatását ez úton tanulmányozzam. A kísérletek 0.5l-es zárható edényekben folytak 100ml térfogatban 32°C-on, folyamatos keverés (300rpm) mellett. A kezdeti pH-t minden esetben pH 4-re állítottam, az esetleges bakteriális befertőzés megakadályozására.

ANALITIKAI MÓDSZEREK

A **hidrogén** fermentáció során a biomassza változását optikai denzitás méréssel kísértem nyomon 580nm-en. A biomassza kvantitatív meghatározását mikrobiuret sejt fehérje méréssel, a glükóz, a xilóz és a szerves savak analízisét HPLC-vel, míg a hidrogén és a szén-dioxid meghatározását gáz kromatográfiával végeztem.

Az **alkohol** fermentáció során képződő fermentációs termékek analízisét HPLC-vel végeztem. A gőzrobbantással előkezelt lignocellulózokon végzett **alkohol** fermentációs kísérletek nyomon követésére az online mérhető szén-dioxid alakulását használtam (HaloteC BAM-6 modul), míg a biomassza változását optikai denzitás méréssel (700 nm) követtem.

3 AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

HIDROGÉN FERMENTÁCIÓVAL KAPCSOLATOS EREDMÉNYEK

1. Megállapítottam, hogy a Magyarországon nagy mennyiségben keletkező papíriszap, enzimes kezelést követően alkalmas szubsztrát lehet hidrogén előállítására mindhárom vizsgált termofil mikroorganizmus (*Thermotoga elfii*, *Thermotoga neapolitana*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*) felhasználásával.
2. Tanulmányoztam a mikroorganizmusok tápanyag igényét egy 2^3 típusú teljes faktoros kísérleti tervben, amelyben, a táptalajban jelenlévő sók, nyomelemek és élesztő extrakt hidrogéntermelésre kifejtett hatásait vizsgáltam és a következő következtetéseket vontam le: A halofil mikroorganizmusok (*Thermotoga elfii*, *Thermotoga neapolitana*) hidrogén termelő képességét jelentősen befolyásolja a sók, illetve az élesztő extrakt jelenléte a táptalajban, míg a *C. saccharolyticus* papíriszap hidrolizátumon történő hidrogén termelését mindezen komponensek szignifikánsan nem befolyásolják
3. A *C. saccharolyticus*-t 2 literes bioreaktorban, kontrolált körülmények között, papíriszapon szaporítva is sikerült hidrogént termelni. Az itt elért 51%-os hozam 84%-a a kontrol fermentációban (glükóz és xilóz elegye) mértnek.

ALKOHOL FERMENTÁCIÓVAL KAPCSOLATOS EREDMÉNYEK

1. Megállapítottam, hogy mind a pékésztő (*Saccharomyces cerevisiae*), mind a hőtűrő *Kluyveromyces marxianus* képes 40°C -on 0.31-0.34 g etanol/g cellulóz hozammal etanolt fermentálni papíriszapon. A hőtűrő *K. marxianus* a vizsgált hőfokon és körülmények között nem bizonyult jobbnak, mint a *S. cerevisiae*. A hozam emelésére tett kísérlet, úgynevezett hőmérséklet szabályozott SSF (NSSF) eljárás alkalmazásával, nem járt eredménnyel.
2. Megállapítottam, hogy 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.
3. Kimutattam, hogy 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 SO_2 nem befolyásolja negatívan a fermentációt, ugyanakkor az előkezelés hatékonyságát növeli.
4. Megállapítottam, hogy a kiválasztott élesztő törzs inhibitor tűrése folyamatos adaptációval javítható gőzrobbantással előkezelt fenyőfán. 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.

4 PUBLIKÁCIÓS LISTA

A dolgozathoz közvetlenül kapcsolódó cikkek:

- Kádár, Zs., de Vrije, T., Budde, M., Szengyel, Zs., Réczey, K. and Claassen, P. A. M. (2003) Hydrogen production from paper sludge hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotech.* **105**, 557-566.
- Kádár, Zs., de Vrije, T., van Noorden, G. E., Budde, M. A. W., Szengyel, Zs., Réczey, K. and Claassen, P. A. M. (2004) Yields from glucose, xylose and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Appl. Biochem. Biotech.* **113-116**, 497-508.
- Kádár, Zs., Szengyel, Zs. and Réczey, K. (2004) Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Ind. Crops Prod.* **20**, 103-110.
- Kádár, Zs., Maltha, S. F., Szengyel, Zs., Réczey, K. and de Laat, W. Ethanol fermentation on various pretreated and hydrolyzed substrates at low pH. Manuscript.

Egyéb kapcsolódó publikációk:

- Varga, E., Kádár, Zs., Schuster, K. C., Gapes, J. R., Szengyel, Zs. and Réczey, K. (2002) Possible substrates for acetone–butanol and ethanol fermentation based on organic by-products. *Hung. J. Ind. Chem.* **30**, 19-27.
- Kádár, Zs., Varga, E. and Réczey, K. (2001) New substrates of biofuel. *Magyar Mezőgazdaság*. V 56. N. 19, 32-33. (in Hungarian)
- Claassen, P. A. M., Budde, M. A., van der Wal, F. J., Kádár, Zs., van Noorden, G. E. and de Vrije, T. (2002) Biological hydrogen production from biomass by thermophilic bacteria. *Proceedings of the 12th European Conference on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection, June 17-21, Amsterdam, The Netherlands, Volume I*. 529-532.
- Kádár, Zs., de Vrije, T., Szengyel, Zs., Claassen, P. A. M. and Réczey, K. (2003) Hydrogen as alternative fuel. *Proceeding of the Technical Chemical Days'03, April 8-10, Veszprém, Hungary*, 372-377. (in Hungarian)
- Kádár, Zs., Kis, B. and Réczey, K. (2000) Biofuel production from paper sludge. *Proceeding of the Technical Chemical Days', April 25-27, Veszprém, Hungary*, 244-248. (in Hungarian)

Előadások és poszterek:

- Kádár, Zs., Balogh, Cs., Maltha, S. F., Szengyel, Zs., Réczey, K. and de Laat, W. (2005) Effect of inhibitors on pretreated lignocellulosic biomass on the ethanol yield. 14th European Biomass Conference and Exhibition: Biomass for Energy, Industry and Climate Protection. October 17-21, Paris, France.
- Kádár, Zs., Balogh, Cs., Maltha, S. F., Szengyel, Zs., Réczey, K. and de Laat, W. (2005) Yeast adaptation on pretreated lignocellulosic substrates. *Renewables Resources and Biorefineries*. September 19-21, Ghent, Belgium.
- Kádár, Zs., Maltha, S. F., Szengyel, Zs., Réczey, K., de Laat, W. (2004) Ethanol fermentation of various pretreated and hydrolyzed substrates. 26th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, May 9-12, Chattanooga, TN, USA.
- Kádár, Zs., de Vrije, T., van Noorden, G. E., Budde, M. A. W., Szengyel, Zs., Réczey, K., Claassen, P. A. M. (2003) Anaerobic fermentation of paper sludge hydrolysate to hydrogen by extreme thermophilic bacteria. 25th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, May 4-7, Colorado, USA.

- Kádár, Zs., de Vrije, T., Szengyel, Zs., Claassen, P. A. M., Réczey, K. (2003) Hydrogen as alternative fuel. Technical Chemical Days'03, April 8-10, Veszprém, Hungary.
- Kádár, Zs., de Vrije, T., Szengyel, Zs., Réczey, K., Claassen, P. A. M. (2002) Hydrogen production from paper sludge hydrolysate. 24th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, April 28-May 1, Gatlinburg, TN, USA.
- Claassen, P. A. M, de Vrije, T., de Haas, G., Budde, M. A., Kádár, Zs., van der Wal, F. J., van Noorden, G. E. (2002) Utilisation of biomass for dark hydrogen fermentation. Biohydrogen 2002, April 21-24, Ede, The Netherlands.
- Kádár, Zs., de Vrije, T., Szengyel, Zs., Réczey, K. and Claassen, P. A. M. (2002) Hydrogen production from paper sludge hydrolysate. Biohydrogen 2002, April 21-24, Ede, The Netherlands.
- Kádár, Zs., Szengyel, Zs., Réczey, K. (2002) Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. International Congress & Trade Show Green-Tech 2002 with the European Symposium Industrial Crops and Products, April 24-26, The World Horticultural Exhibition Floriade, The Netherlands.
- Kádár, Zs., Kis, B., Szengyel, Zs., Réczey, K. (2001) Simultaneous saccharification and fermentation experiments on various substrates. 23rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, May 4-9, Colorado, USA
- Kádár, Zs., Réczey, K. (2001) Bioethanol from wastes. Technical Chemical Days'01, April 24-26, Veszprém, Hungary.
- Kádár, Zs., Réczey, K. (2001) Wastes, as feedstocks for bioethanol production. "BUTE Industrial Open Day", Bioenergy, Biofuels Symposium, February 28, Budapest, Hungary.
- Kádár, Zs., Réczey, K. (2001) Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. 301. Scientific Conference, February 23, Budapest, Hungary.
- Kádár, Zs., Kis, B., Réczey, K. (2000) SSF on cellulose based substrates. "Lippay János – Vas Károly" Scientific Conference, November 6-7, Budapest, Hungary.
- Kádár, Zs., Kis, B., Réczey, K. (2000) Biofuel from paper sludge. "Chemist Days", April 25-27, Veszprém, Hungary.
- Kádár, Zs., Réczey, K. (2000) Bioethanol from industrial wastes. Chemist Conference, November 26-28, Kolozsvár, Romania
- Kádár, Zs., Varga, E., Réczey, K. (1999) Possible substrates for ethanol fermentation. 3rd European Motor Biofuels Forum, October 10-13, Brussels, Belgium.
- Varga, E., Kádár, Zs., Réczey, K. (1999) Possible substrates for ABE fermentation. Conference on the Applied Acetone Butanol Fermentation. September 16-18, Krems, Austria.