Kutatások a biodízel melléktermékének hasznosítására

NÉMETH Áron,[a] és SEVELLA Béla[a*]

[a]*BME-Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, Műegyetem rkp.3.,H-1111Budapest, Magyarország*

1. Bevezetés

A kőolaj árának az utóbbi évtizedekben bekövetkezett tartós és folyamatos emelkedése illetve a készletek végessége valamint ezekkel párhuzamosan a világ növekvő energiaigénye egyre sürgeti az alternatív energiahordozók kifejlesztését. Ezek közé tartozik a biodízel is, amelynek nagy léptékű gyártása napjainkra megvalósult. A nagyüzemi eloállítás során a növényi olajat metanollal átészterezik, majd a zsírsav-metil észtert biodízelként értékesítik. Ennek előnye, hogy mivel növényi eredetű, égetésekor csak annyi CO_2 keletkezik, amennyit növény az olaj eloállításához felhasznált, így zárt szénkörforgalom valósulhat meg. A gyártás során azonban 10% glicerin keletkezik a biodízel tömegéhez viszonyítva. Mivel a biodízel gyártás millió t/év nagyságrendu (USA: 700.000t (2006), EU: 6.100.000 (2006) Mo.: 150.000 (2007)), évi több száz-ezer tonna glicerin felhalmozódással kell számolni.

Mivel a biodízelgyártás melléktermékeként keletkező glicerin megújuló nyersanyag, és a glicerin „platform alkoltó" molekula, kitunő nyersanyaga lehet a „fehér biotechnológiának". A „glicerin platform" alkotói között olyan értékes anyagok szerepelnek (a teljesség igénye nélkül), mint a glicerin-karbonátok (felhasználás: oldószerek, kozmetikumok, polimerek), glicerin-sav (felhasználás: tejsav,- politejsav, hidroxi -propionsav előállítás), elágazó polimerek, propanol, glicidol és 1,3-propándiol.

A glicerin mikrobiológiai hasznosításának elso lépése során a glicerin molekula oxidálódik a glicerin-dehidrogenáz (GDH, EC 1.1.1.6) enzim segítségével, majd a képzodött 1,3-dihidroxiaceton (DHA) foszforilálódik, és bekapcsolódik a központi cukoranyagcsere útvonalba (glikolízis). A lebontás közben több helyen is redukált koenzim ($NADH_2$) keletkezik, amelynek re-oxidációja a terminális oxidációban történik, miközben a légzéssel felvett oxigén vízzé redukálódik. Az anaerob glicerin lebontás során erre nincs lehetőség, ezért ilyenkor a mikroorganizmusok (*Klebsiellák, Citrobacterek, Enterobacterek, Clostridiumok,* és *Lactobacillusok*) egy alternatív útvonalat használnak: elobb a glicerinrol egy vízet hasítanak le a glicerin-dehidratáz (GDHt, EC 4.2.1.30) enzimmel (általában B_{12} koenzim segítségével), majd a képzodött 3-hidroxi -propionaldehidet (3-HPA) 1,3-propándiol-oxidoreduktáz (PDOR, EC 1.1.1.202) enzimmel 1,3-propándiollá (PD) redukálják, miközben a koenzim reoxidálódik.

A fenti anaerob glicerin metabolizmus minden tagja nagy hozáadott értéku glicerinszármazék. A DHA -t 2000t/év kapacitással gyártják (szintetikusan és fermentációval is), mert a borbarnító szerekben forgalmazzák. A 3-HPA antimikrobiális szer, ezért kituno az élelmiszerek tartósítására. A 3-HPA-t nagy mennyiségben termelo *Lactobacillus reuteri* baktériumot pedig probiotikumként forgalmazzák.

*Főszerző. Tel.: 463-2595; fax: 463-2598 ; e-mail: bsevella@mail.bme.hu.

Az anaerob glicerinanyagcsere legperspektívikusabb származéka az 1,3-propándiol, melybol az évi világtermelés 200.000 t körülire tehető. A legnagyobb mennyiségben az igen kedvező tulajdonságú polimer Poli-Trimetilén-Tereftalát (PTT) eloállítására használják (Shell: Corterra®, DuPont: Sorona®).

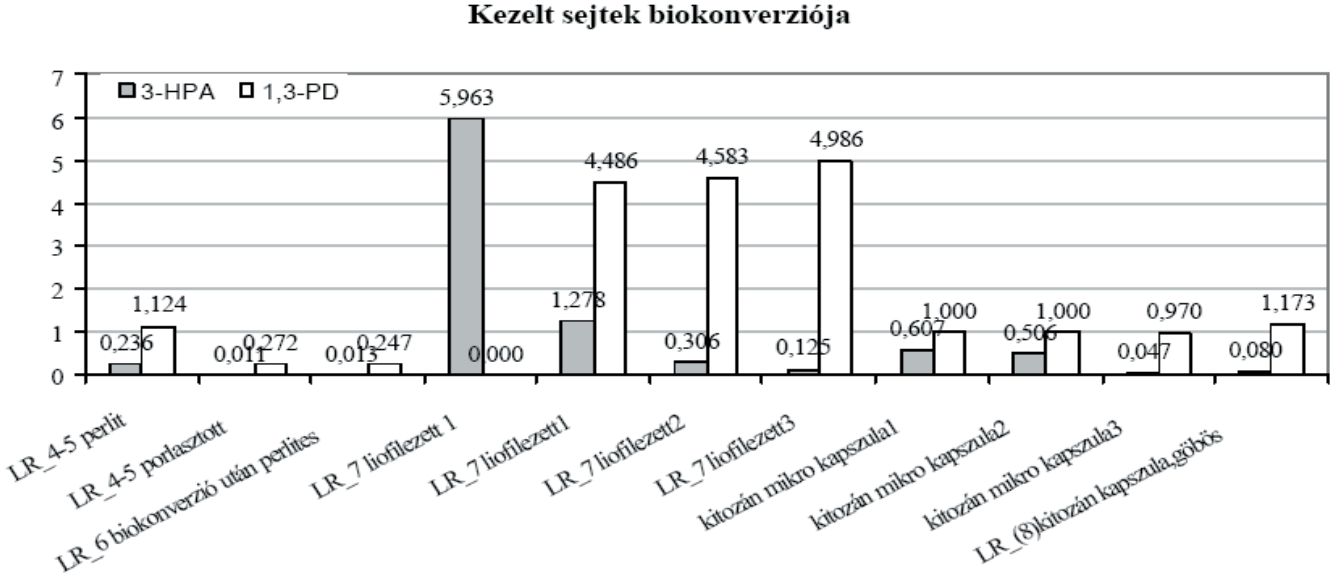
Az 1,3-PD eloállítását 2006-ig kizárólag szintetikus úton végezték (Shell etilén-oxid hidroformilezése, illetve Degussa (DuPont): akrolein hidrolízise+katalitikus hidrogénezés). A DuPont a Genecor-ral vállvetve mintegy évtizedes kutató munka nyomán 2006-ban felépített egy glükóz alapú, rekombináns *Esherichia coli*t használó PD üzemet (45.000t/év) a Tenesse állambeli Loudonban. A kutatásaik kezdetén még nem volt valószínusítheto ekkora glicerin felesleg, ezért kellett éleszto géneket is klónozni az *E.coli*-ba, amelyek segítségével a glükózból glicerin keletkezik, amely tovább alakul a *Citrobacter* géntermékek segítségével 1,3-propándiollá. Fontos azonban megjegyezni, hogy míg a fermentációs eljárások során a nyersanyag egy részébol szükségszeruen sejttömeg (biomassza) képzodik, a maximálisan kinyerhető termék mennyiség ezért limitálva van, addig az enzimes technológiáknál nem lép fel ilyen jellegu veszteség. A mikroorganizmu sok ráadásul gyakran további anyagcseretermékeket is kiválasztanak, amelyek a termék feldolgozást nehezítik.

Kutató csoportunk 2001-óta foglalkozik a glicerin hasznosítás lehetoségeivel. Részben vizsgáltuk a 3-hidroxipropionaldehid eloállítás lehetoségeit *Lactobacillus reuteri* sejtekkel, illetve kidolgoztunk egy új, enzimes eljárást az 1,3-PD és a DHA szimultán eloállítására glicerin alaponkoenzimregeneráló membránreaktorban.

2. Eredmények és értékelésük

2.1. 3-hidroxi-propionaldehid eloállítása

Az antibiotikus szer eloállításakor olyan két lépéses eljáráson dolgoztunk, amelyben elobb hatékonyan megtermeljük a leheto legtöbb *L.reuteri* sejtet, majd ezeket „biokatlizátorként" használva állítjuk elo a terméket. Az *1. táblázatban* látható, hogy milyen fermentációs technikákat vizsgáltunk. Az eredményekbol kitunik, hogy a legjobb produktivitást (g sejt/L fermentlé/óra) az egyszeri glükóz injektálásos módszerrel értük el. A fermentációval eloállított *Lactobacillus reuteri* sejteket különbözo módon dolgoztuk fel: porlasztva szárítással, porlasztva szárítás perlit vivoanyagra, mikrokapszulába zárás, centrifugálással (szabad sejtes), liofilezéssel. Az *1.ábrá*ról leolvasható, hogy a liofilezett sejtek fajlagos HPA termelo aktivitása kiemelkedo: közel 6 g HPA/g sejt (az irodalomban:[1] 1,3 g HPA/g sejt).



1. Ábra. Fajlagos HPA termelő képesség

1. Táblázat. *Lactobacillus reuteri* eloálítás fermentációval

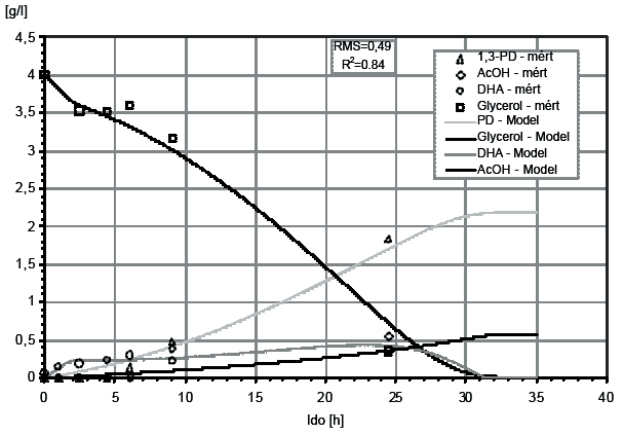
Fermentáció	Fermentációs technika	J_x (g/l*h)	J_{xmax} (g/l*h)	$Y_{x/s}$ (g/g)
LR2006_1	Fed-batch	0,087	0,202	4,2
LR2006_2	Batch(0,7L)	0,092	0,211	6,7
LR2006_3	Batch (1,5L)	0,087	0,087	7,0
LR2006_4	Batch(0,7L)	0,084	0,400	3,6
LR2006_5	Batch(0,7L)	0,093	0,325	4,6
LR2006_6	Batch+1xGlü rátáp.	0,110	0,321	5,3
LR2006_7	Batch+1xGlü rátáp	0,092	0,311	4,4
LR2006_8	Batch(aerob)	0,028	0,405	
LR2006_9	Batch(aerob)	0,023	0,177	3,8

2.2. Szimultán PD és DHA eloállítás

2.2.1. Kísérletek *Klebsiella pneumoniae*-vel

Egy korábbi publikációnkban beszámoltunk arról, hogy milyen hatékony fermentációs eljárást dolgoztunk ki a *Klebsiella pneumoniae* sejtekkel történő enzimfermentációra, ahol a maximális enzim (GDH, GDHt, PDOR) kihozatal érdekében nagy sejtkoncentráció elérése volt a célunk.[2,3] Az általunk kidolgozott rátáplálásos technikának köszönhetően az irodalomból ismert enzimkihozatalt és elért sejtkoncentrációt (37,5 U/ L PDOR, 5 g/L sejtkoncentráció) lényegesen felülmúltuk (90,6 U/L PDOR és 10(14,5) g/L sejtkoncentráció (attól függően, hogy hány rátáplálást alkalmaztunk)). Szintén korábban már bemutattuk, hogy az így kapott enzimekkel sikeres glicerin biokonverziót végeztünk, ahol azonban a DHA és PD mellett ecetsav (AcOH) is keletkezett melléktermékként.[4] Ennek oka, hogy a nyers sejtextraktumból nem vontuk ki és tisztítottuk a kulcsenzimeket, mivel azt feltételeztük, hogy ha csak a kulcsenzimek szubsztrátja és koenzime van jelen, akkor mellékreakció nem fog lezajlani. Mivel a tisztítatlan sejtextraktum azonban a sejt összes enzimét és koenzimét tartalmazza valamint az egyik reakció terméke a másiknak szubsztrátja, ezért néhány konszekutív mellékreakciónak köszönhetoen a DHA tovább alakult ecetsavvá (*2.ábra*).

Arról is beszámoltunk már, hogy az ilyen glicerin-PD biokonverzióra sikeres matematikai leírást sikerült fölállítanunk.[5] Ennek során a koenzim nélküli enzimes reakciókat a klasszikus Michaelis -Menten kinetika szerint modelleztük, míg a koenzimes (=kétszubsztrátos) enzimreakciókra random bi-bi mehanizmust feltételeztünk. A modell tartalmazza az ecetsav képzodés útvonalát is, amelynek során mindkét koenzim (ATP/ADP és NAD+/ $NADH_2$) regenerálódik. A matematikai leírás során figyelembe vettük, hogy a GDHt enzim minden molekula glicerin átalakításakor a B_{12} koenzimével irreverzibilis komplexbe kerül, ahonnan csak egy ATP függo fehérje segítségével szabadulhat fel.



2. Ábra. Glicerin biokonverzió Klebsiella eredetu enzimekkel: mért és illesztettkoncentrációk (Y1,3PD=46%, YDHA=10%, YAcOH=15%, Konverzió: 88%).

Ezt a modellt szimulációs kísérletekre használtuk fel ("*in silico*"), amelyek eredményeit már korábban bemutattuk.[6] A szimulációk arra a következtetésre vezettek, hogy a

GDHt ATP függő regenerálása miatt nem lehet szimultán DHA és PD eloállítást ezzel az eljárással megvalósítani, mert ha megakadályozzuk a DHA továbbalakulását (pl.: inhibíciókkal), akkor az ATP regeneráló AcOH képző reakció utat eliminálunk. Ha az ATP koenzim nem tud regenerálódni, akkor a GDHt ATP-függő regenerációja is leáll és vele együtt a termékek képződése is. Ezen a problémán csak úgy tudtunk felülkerekedni, hogy egy másik enzim-forrás mikroorganizmust választottunk: a *Clostridium butyricum* VPI1718 törzset, amely GDHt enzime nem igényel ATP függő regenerálást.

2.2.2. Kísérletek *Clostridium butyricum*-mal

Az új enzimforrás sejtekkel is enzimfermentációt hajtottunk végre.[7] Mivel ez a mikroorganizmus szigorúan anaerob, nem alkalmazhattuk a *Klebsiellá*nál bevált fermentációs eljárást. Különbözo fermentációs technikákat összehasonlítva arra jutottunk, hogy a glükózon történő elszaporítást követoen egy glicerines indukcióval jó enzimkihozatalt lehet elérni. A Clostridium eredetu enzimeket stabilabbnak találtuk a Klebsielláéval szemben, illetve több biokonverziós cikluson keresztül is felhasználhatónak bizonyultak. A *C. butyricum* tenyészet *K.pneumoniae*-vel analóg feldolgozása során kisebb aktivitású enzimoldatot kaptunk, ám a biokonverziós hatékonyság kissé még így is előnyösebben alakult (*2. táblázat*).

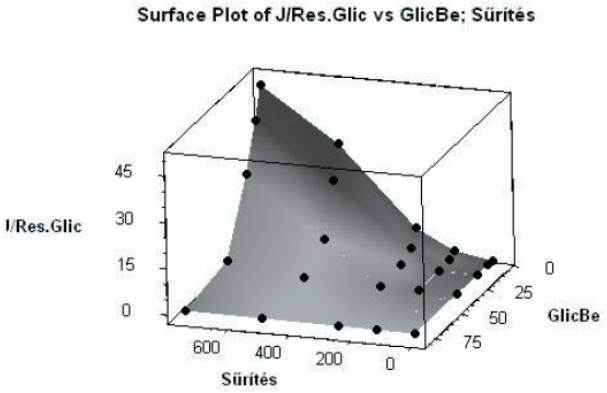
2. Táblázat. Enzimes glicerin biokonverziók összehasonlítása.

Törzs	Y_{PD} %	*Konverzió/idő*	*Melléktermék %*
K. pneumoniae	46	88%/24h	Ecetsav 15%
C. butyricum	48	100%/30h	Vajsav 11%

A korábbi matematikai leírást átültettük erre a Clostridium eredetu enzimkészítményre.[8] Ezzel a matematikai leírással is hajtottunk végre szimulációs kísérleteket, amelyek szerint a DHA foszforilezodésének gátlása esetén elérhető egy ~50% PD és 50% DHA tartalmú termék. A modelt arra is felhasználtuk, hogy a mai ipari technológiával versenyképes produktivitás eléréséhez szükséges enzim koncentrációt és betáplált glicerin koncentrációt meghatározzuk. Ehhez definiáltunk egy J/Res.Glic. mennyiséget, ami az adott beállításoknál elérheto PD produktivitás és a maradék glicerinkoncentráció hányadosa. Ennek maximumánál érheto el a legkisebb maradék glicerin mellett a legnagyobb produktivitás (*3.ábra*). Megállapítható, hogy az ultraszuréssel elérheto 250x enzimoldat surítéssel 5 g/L betáplált glicerinkoncentráció mellett (D=1 h^{-1} higitási sebességnél) 2,4 g/lh produktivitás érhető el (ami kb. megfelel a mai biológiai (fermentatív) eloállítás produktivitásának (100g/L PD /48h =2g/lh).

3. Kísérleti rész

Klebsiella pneumoniae DSM2026 tenyészetet saját módszerünk[3] szerint állítottuk elő. A sejteket 15 perc alatt Janetzki T24 centrifugán 13000 rpm kiülepítettük, majd HEPES pufferben (50mM HEPES, 5mM DiThioThreithol,



3. Ábra. Enzimreaktor optimálása.

és 0,1 mM $MnCl_2$, pH=7,4) kétszer mostuk, és ultrahanggal feltártuk (Labsonic P (Sartorius) 10 perc, 4°C, cycle=0,5 amplitudó=60%). A sejttörmeléket ismét centrifugálással távolítottuk el. Így nyertük a nyers enzimoldatot, melyet további tisztítás nélkül használtunk fel a biokonverzióra. A PDOR aktivitásmérésére Lin[9] módszerét használtuk kisebb módosítással. Mivel nem tiszta enzim oldatban kívántuk az aktivitást meghatározni, ezért számos mellékreakció zavarta a képzodött $NADH_2$ koenzim koncentráció-változásának fotometriás követését. Ezért a 15 perces mérés első 8 percében a háttér reakciókat hagytuk lezajlani, majd amikor az abszorbancia már nem változott, akkor adtuk a reakcióelegyhez a szubsztrátot (PD). A GDH aktivitás mérését a PDOR-éhoz hasonlóan végeztük, de szubsztrátként 1M glicerint adtunk az elegyhez PD helyett. A GDHt aktivitását MBTH módszerrel[10] mértük. A biokonverziót Millipore Solvent Resistent Stirred Cell keveros ultraszuro modulban végeztük. A minták szubsztrát, termék és melléktermék tartalmát Waters Breeze HPLC-n határoztuk meg RI detektorral BioRad Aminex HPX 87H kolonnán eluensként ultratiszta vízben 5mM H_2SO_4-at használtunk. Az oszlop 65°C-ra a detektor 40°C-ra volt termosztálva. Mivel a glicerin és a DHA a fenti HPLC-s módszer mellett nem válik szét egymástól, ezért a glicerint a Reanal Rt. enzimesTriglicerid (GPO) kit-jével, a DHA-t pedig o-toluidine reagens kittel (Sigma T-1199) határoztuk meg.

Az NCIMB8082 *Clostridium butyricum* törzset sikeresen fermentáltuk anaerob módon 2xYT tápoldaton Biostat M (1,5/2L) fermentorban. 660ml fermentlébol a sejteket 40 perc alatt Janetzki KD60-as centrifugán (3000 rpm) ülepítettük ki, és mosás nélkül HEPES pufferben reszuszpendáltuk, és lefagyasztottuk. Kiolvasztás után megmértük az enzimaktivitásokat (PDOR= 2,1U/l fermentlé, GDH= 13,5U/l fermentlé, GDHt= 3,3U/l fermentlé) és Stirred Cell-ben 20ml térfogatban 4 g/l induló glicerinen B_{12} koenzim nélkül sikerült 2,5 g/l PD-t eloállítani (Y=62,5%).

A matematikai szimulációkhoz *Berkeley Madonna 8.01* programot használtunk.

Köszönetnyilvánítás

Ezt a munkát az OTKA T032015 és T029882, valamint az OM NKFP-3/A/0035/2002 támogatása tette lehetővé.

Hivatkozások

1. Lüthi-Peng; Dileme; Puhan, Effect of glucose on glycerol bioconversion by Lactobacillus reuteri. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2002**, *59*, 289-296.
2. Németh, Á.; Kupcsulik, B.; Sevella, B. 1,3-propanediol dehydrogenase production with Klebsiella pneumoniae. *HAS Complex Committee on Food Science, Hungarian Scientific Society for Food Industry and Central Foodscience Research Institute 307. Scientific Kollokvium* **2002**,
3. Németh, Á.; Kupcsulik, B.; Sevella, B., 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2003**, *19*, 659-663.
4. Németh, Áron, and Sevella, Béla, Research of biotechnologycal/bioconversional methods for production of glycerol derivatives. *First Conference of Phd Students at Faculty of Chemical Engineering* **2003**, 78-79.
5. Németh, Á.; Kupcsulik, B; Sevella, B. Modelling of a multienzyme (membrane) reactor system. *32. Days of Chemical Engineering '04* **2004**, 123-127.
6. Németh, Á.; Sevella, B. New possibilties for the Production of Glycrol Derivatives with Enzymatic Bioconversion. *The annual meeting of the Hungarian Society for Microbiology 2005. and 1st Central European Forum for Microbiology* **2005**.
7. Németh, Á.; Sevella, B. New results in the field of 1,3-propanediol production with enzymatic bioconversion. *34. Days of Chemical Engineering '06* **2006**, 95-97.
8. Németh, Á.; Sevella, B. Technology developments for an enzymatic glycerol utilization. *35. Days of Chemical Engineering '07* **2007**, 164-167.
9. Lin, E. A. J. a. E. C. C., *Klebsiella pneumoniae* 1,3-Propanediol:NAD+ Oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* **1987**, *169*, 2050-2054.
10. Toraya T, U. K., Fuki S, and Hogenkamp H P C, Studies on the Mechanism of the Adenosylcobalamin-dependent Diol Dehydrase Reaction by the Use of Analogs of Coenzyme. *J. biol. chem.* **1977**, *252*, 963-970.

Research on the utilization of the biodiesel byproduct glycerol

Because the price of the crude oil has been countinuously rising during the last decade, and the resources are finite, furthermore the energy demand of the world is also rising, it is very important to develop alternative energy sources. One of them is biodiesel, of which large volume production is already started. During the production of biodiesel the vegetable oil will be transesterified with methanol, resulting methyl-fattyacid ester and 10% glycerol. Hence the biodiesel production in the USA is around 700.000 t (2006), and in the EU is c.a.6.100.000 t (2006), more then 500.000 t glycerol surplus will arise. Since this glycerol is renewable and has a good platform it could be a very good rawmaterial for the "white biotechnology". It's derivatives like glycerol-carbonates, gliceric acid, branched polymers, hydroxy-propionic acid, propanol, glycidol, 1,3-propanediol etc. have very broad application possibilities.

During the biological glycerol utilization glycerol is oxidized and 1,3-dihydroxyacetone (DHA), which then after phosphorylation enters the glycolysis. The $NADH_2$ formed on this route can be reoxidized by the respired molecular oxygen under aerobic conditions. In the absence of the terminal oxydation, the coenzyme can be regenerated due to reduction of 3-hydroxypropionaldehyde (HPA) to 1,3-propanediol (PD). HPA can be formed from glycerol via dehydratation.

As HPA, DHA and PD have high added value, it is worth to produce them. The largest potential is in the production of PD, of which Poly-Trimethylene-Terephtalate (PTT), a polymer with advantageous features can be produced (product of Shell called Corterra®, and of DuPont Sorona®). PD has been produced until last year only by synthetic methods: either with ethylene-oxide hydroformation (Shell process) or with acrolein hydrolysis followed by catalytic hydrogenation (Degussa)). In 2006 DuPont started with Tate & Lyle the first bio-PDO plant in Loudon, appling a recombinant *Escherichia coli*, which is able to convert glucose into glycerol with genproducts of *Saccharomyces* gens and then glycerol into PD with the genproducts of *Citrobacter* gens.

Our research group has been working on a new enzymatic process, in which the three keyenzymes are used for simultaneous DHA and PD production from glycerol in a membrane reactor with of coenzyme retention and regeneration.

We used in our earlier study *Klebsiella pneumoniae* as enzyme source, but the mathematical simulation of the glycerol-PD bioconversion led to the conclusion, that this enzyme-mixture is not suitable for simultaneous DHA and PD conversion. The reason was, that the first keyenzyme (glycerol-dehydratase EC 4.2.1.30) goes under suicide inactivation, which could be only reactivated with the energy of ATP produced during the acetic acid pathway. Since this route was essential for the reactivation of GDHt, the phosphorylation of DHA should be allowed.

Recently we changed the enzyme source bacteria to *Clostridium butyricum*. We carried out successful enzyme fermentations, and used the enzyme-mixtures in biconversion trials. We found, that these enzymes are more stable and reusable. We adapt our previous mathematical description, and used for "*in silico*" expriments. The results of these simulations can be seen on *Fig.3.* We found, that with 250fold concentration of the enzyme-mixture beside of $Glycerol_{in}$=8g/L and D=1 h^{-1} dilution rate J=2,5g/lh can be reached which is comparable to the fermentation production of PD (ca 100g/L 48h=2g/lh).