Využití cukrovky pro výrobu biobutanolu

EXPLOITATION OF SUGAR BEET FOR BIOBUTANOL PRODUCTION

Petra Patáková, Sidi Seibou Maroufu Toure, Pavel Šimáček*, Hana Čížková, Jakub Lipovský, Michaela Linhová, Petr Fribert, Mojmír Rychtera a Karel Melzoch

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

*Ústav technologie ropy a alternativních paliv, VŠCHT Praha

Pěstování cukrové řepy má v České republice dlouhou tradici; v roce 1918 byl v tehdejším Československu vyroben cukr v množství, které odpovídalo 15 % celosvětové spotřeby. V současnosti dosahuje výnos cukru z cukrové řepy více než desetinásobku ve srovnání s počátky pěstování v polovině 19. století. Při porovnání s obilovinami a bramborami má cukrovka vyšší výtěžnost fotosyntézy a z 1 ha plochy lze získat 2–3× více využitelných sacharidů. Vzhledem k dopadům tzv. cukerní reformy Evropské unie, která vedla v ČR ke poklesu pěstování cukrové řepy o cca 25 %, je vhodné uvažovat o cukrovce jako o možném zdroji sacharosy pro nepotravinářské využití, mezi jinými také jako o substrátu pro výrobu biobutanolu (1). Již nyní se nad rámec potravinářského využití pěstuje cukrová řepa pro výrobu etanolu – Agroetanol TTD (2); v roce 2010 končil ambiciózní projekt EU „Hyvolution“, jehož cílem bylo využití řepy a dalších plodin pro fermentační výrobu vodíku (3).

Na biobutanol, tj. 1-butanol, získávaný bakteriální fermentací sacharidických surovin, je v současnosti soustředěna pozornost menších (např. Gevo, Green Biologics, Cobalt Biofuels) i velkých společností jako jsou DuPont nebo British Petrol, kvůli jeho výhodným fyzikálním vlastnostem, umožňujícím přimíchávání do kapalných palivových směsí. Ve srovnání s již takto využívaným etanolem má 1-butanol vyšší energetický obsah, omezenou mísitelnost s vodou, nižší tlak par a nižší korozivitu, což ho jako potenciální palivovou biosložku zvýhodňuje. Proces výroby 1-butanolu, známý také jako aceton-butanol-etanolové (ABE) kvašení byl objeven téměř před 150 lety a po první světové válce se stal po výrobě etanolu druhou fermentační technologií, využívanou v průmyslovém měřítku. Menší průmyslová výroba byla realizována v druhé polovině 50. let v lihovaru Rájec nad Svitavou a byla v provozu 13 let. 1-butanol je tvořen anaerobními bakteriemi rodu *Clostridium* (nejznámějšími druhy jsou *C.acetobutylicum* a *C.beijerinckii*) jako hlavní produkt heterofermentativního kvašení. Nejprve se při růstu a množení bakterií tvoří kyseliny octová a máselná spolu s oxidem uhličitým a vodíkem. V navazující fázi, po nahromadění kyselin v kultivačním médiu, kdy bakterie začnou sporulovat, se pak tvoří rozpouštědla, zejména butanol a aceton, přičemž produkce fermentačních plynů klesne zhruba na polovinu. V malé míře je po celou dobu fermentace tvořen také etanol, případně další produkty jako kyselina mléčná nebo acetoin (4).

Melasa z cukrové třtiny byla poprvé použita při průmyslovém fermentačním procesu výroby butanolu v roce 1936. Do té doby byly pro ABE fermentaci využívány škrobnaté substráty a produkční bakteriální kmeny, zejména druhu *Clostridium acetobutylicum,* byly selektovány z přírodního materiálu s ohledem na tvorbu rozpouštědel ze škrobu. Při prvních pokusech se proto sacharosa v melase musela nejprve rozkládat (invertovat) na glukosu a fruktosu, jinak ji bakterie nedokázaly využít. Později však byly izolovány klostridiální kmeny schopné využívat sacharosu bez nutnosti předchozí inverze.

Melasa, třtinová i řepná, nabídla nové možnosti uspořádání a vedení kultivačního procesu ABE fermentace ve srovnání s původním procesem, vedeným na škrobnatých záparách – s melasovou záparou (fermentačním médiem) se dalo lépe pracovat díky nižší viskozitě, náklady na surovinu a čištění výrobního zařízení klesly, bylo možné využít vyšší koncentraci substrátu (5). Pravděpodobně nejdéle využíval třtinovou melasu jako substrát závod v Jihoafrické republice, který pracoval bez problémů až do roku 1981, kdy však postihlo jižní Afriku nezvyklé sucho a melasa zdražila natolik, že se výroba přestala vyplácet. V roce 1982 byl sice závod na krátkou dobu znovu otevřen, ale kombinace stále drahé melasy a problémů s fermentací způsobila jeho definitivní uzavření (4).

Výsledky předběžných pokusů s řepnou melasou (6) naznačily, že melasa je vedle škrobnatých surovin další vhodnou surovinou pro produkci biobutanolu. Cílem této práce bylo testovat vybrané rozpouštědlotvorné druhy bakterií rodu *Clostridium* na produkci rozpouštědel, zejména 1-butanolu, nejen v kultivačním médiu s melasou, ale i v médiu s řepnou šťávou (bílým sirobem). Pokud je autorům známo, výsledky ABE fermentace s využitím řepné šťávy jako substrátu dosud publikovány nebyly.

Materiál a metody

Mikroorganismy: *Clostridium acetobutylicum* LMG 5710, *C. beijerinckii* DSM 6422, *C. beijerinckii* CCM 6218, *C.beijerinckii* NRRL B-466, *C. beijerinckii* NCIMB 8052, *C. pasteurianum* NRRL B-598 byly uchovávány ve formě sporových suspenzí ve sterilní destilované vodě, v Eppendorfových mikrozkumavkách, při 4 °C. Modifikované kultivační médium (7), obsahovalo tyto složky (v $g.l^{-1}$): melasu 80 nebo bílý sirob (Cukrovary a lihovary TTD, a. s.) 61,7, kvasničný autolyzát 10, síran amonný 2, dihydrogenfosforečnan draselný 1; v případě použití bílého sirobu ještě síran železnatý 0,01. Kultivační médium bylo sterilováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 min. Před očkováním byly spory vystaveny teplotnímu šoku – Eppendorfovy mikrozkumavky se sporovou kulturou byly inkubovány po dobu 30 s při 80 °C a následně chlazeny 2 min v ledové tříšti. Očkování kultivačních médií bylo prováděno za aseptických podmínek, v očkovacím boxu (Trigon Jouan, Francie). Kultivace probíhala buď v Erlenmeyerových baňkách (objem kultivačního média 200 ml), uzavřených vatovými zátkami, při teplotě 37 °C, po dobu 72 h,

v anaerobní komoře (Concept 400, UK), nebo v bioreaktoru Biostat B (B. Braun Biotech International, Německo) – pracovní objem bioreaktoru 3 l, teplota 37 °C, míchání 200 ot.min^{-1}, bez pH regulace, doba kultivace 48 h. Bioreaktor byl zaočkován inokulem ve vegetativním stadiu růstu (pohyblivé, nesporulující buňky), jehož stav byl kontrolován pod mikroskopem.

Koncentrace substrátu (sacharosy) a produktů (butanolu, acetonu, ethanolu, kyseliny octové a máselné) byla stanovována pomocí HPLC. Podmínky stanovení HPLC: analyzátor (Agilent 1200 Series, USA), kolona Watrex Polymer IEX H^+ form (8 µm, 250 × 8 mm, Watrex ČR), mobilní fáze kyselina sírová (c = 5 mmol.l^{-1}) v demineralizované vodě, průtok 0,5 ml.min^{-1}, teplota kolony 60 °C, refraktometrická detekce. Plynné produkty (vodík a oxid uhličitý), byly při kultivaci v bioreaktoru jímány do Tedlarového vzorkovacího vaku (SKC). Po kultivaci byl zjištěn objem vytvořeného plynu a stanoveny koncentrace obou plynných složek pomocí GC. Podmínky stanovení GC: analyzátor Hewlett Packard 6890, kolona CHROMPACK CP-Carbonbond (50 m × 0,53 mm; tloušťka filmu 15 µm), mobilní fáze dusík, tlak 60 kPa, průtok 7,8 ml.min^{-1}, teplota kolony 30 °C, teplota nástřiku 150 °C, teplotně vodivostní detekce. Sušina biomasy byla stanovena vážkově.

Pro hodnocení kultivací byly použity následující parametry, vypočtené podle vztahů:

$c_{ABE} = c_A + c_B + c_E$ celková koncentrace rozpouštědel (g.l^{-1}),

$Y_{ABE} = \frac{ABE_{total}}{S} \times 100$ výtěžnost rozpouštědel (g.l^{-1}),

$Y_B = \frac{B_{total}}{S} \times 100$ výtěžnost butanolu (%),

$P_{ABE} = \frac{ABE_{total}}{V \times t}$ produktivita tvorby rozpouštědel (g.l^{-1}.h^{-1}),

$P_B = \frac{B_{total}}{V \times t}$ produktivita tvorby butanolu (g.l^{-1}.h^{-1}),

kde:

c_{ABE}, c_A, c_B, c_E, – celková koncentrace rozpouštědel, koncentrace acetonu, butanolu, ethanolu (g.l^{-1}),

ABE_{total}, B_{total} – celkové množství rozpouštědel, celkové množství butanolu (g),

S – celkové množství spotřebovaného substrátu (g),

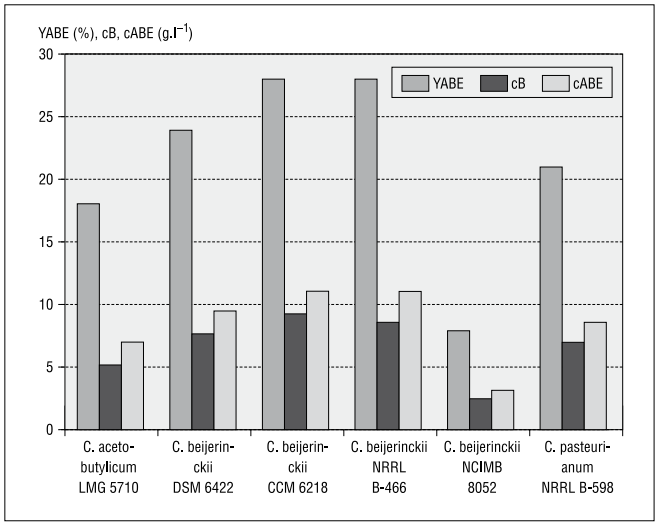
V – pracovní objem bioreaktoru (l),

t – doba produkce rozpouštědel (h).

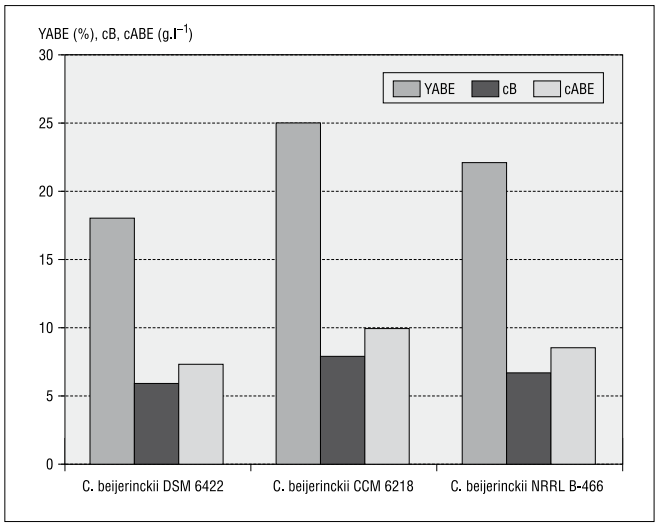
Výsledky a diskuse

Obr. 1. ukazuje srovnání dosažených koncentrací butanolu a celkových rozpouštědel spolu s výtěžnostmi v době maximální produkce rozpouštědel, tj. po 72 h kultivace, pro šest výše uvedených, rozpouštědlotvorných kmenů. Kultivace byla prováděna v baňkách, v melasovém kultivačním médiu, obsahujícím 40 g.l^{-1} sacharosy. Nejvyšší koncentrace butanolu (9,3 g.l^{-1}), celkové koncentrace rozpouštědel (11,0 g.l^{-1}) a výtěžnosti (28 %) bylo dosaženo s kmenem *C. beijerinckii* CCM 6218. Ve srovnání s maximální výtěžností rozpouštědel, zjištěnou

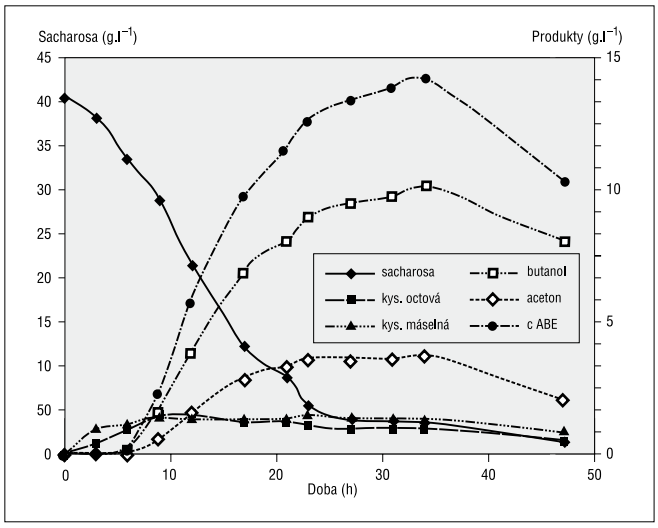
Obr. 1. Porovnání výtěžností a koncentrací rozpouštědel v melasovém kultivačním médiu po 72 h kultivace v baňkách



Obr. 2. Porovnání výtěžností a koncentrací rozpouštědel v kultivačním médiu z bílého sirobu po 72 h kultivace v baňkách



Obr. 3. Průběh kultivace kmene Clostridium beijerinckii CCM 6218 v bioreaktoru, v médiu z bílého sirobu



při testování 38 průmyslových rozpouštědlotvorných kmenů na melase z cukrové třtiny (7), která činila 32 %, to není špatný výsledek. Melasa ve vyšší koncentraci, obsahující 60 $g.l^{-1}$ sacharosy, bohužel nebyla pro dané kmeny dobře zkvasitelná, a proto celkové koncentrace rozpouštědel kolem 20 $g.l^{-1}$, což je udáváno jako obvyklá maximální koncentrace, nemohlo být v daném kultivačním uspořádání dosaženo. Špatné využívání melasy při vyšší koncentraci nemuselo být způsobeno jen inhibicí produktem (1-butanolem), ale i přítomností látek inhibujících kvašení, jako jsou zbytky herbicidů nebo pesticidů, které jsou obecně známou příčinou špatné zkvasitelnosti některých melas. Shodně se závěry Shaheen et al. (7) bylo zjištěno, že nejlepšími producenty rozpouštědel na melasovém substrátu jsou bakterie druhu *C. beijerinckii*.

Na základě pokusů v melasovém médiu byly vybrány tři kmeny *C. beijerinckii* CCM 6218, *C. beijerinckii* DSM 6422 a *C. beijerinckii* NRRL B-466 s nejvyšší produkcí rozpouštědel, které byly kultivovány za stejných podmínek jako v přechozím případě, v médiu s řepnou šťávou (obr. 2.). Dosažené koncentrace rozpouštědel a výtěžnosti byly srovnatelné jako v předchozím případě tj. při použití melasového média. Použití řepné šťávy pro výrobu butanolu je sice v odborných textech zmiňováno spolu se šťávou z cukrové třtiny (8), ale výsledky pokusů s touto surovinou publikovány nebyly.

Jak v melasovém médiu, tak v médiu s řepnou šťávou bylo nejlepších výsledků dosaženo s kmenem *C. beijerinckii* CCM 6218, a proto byl tento kmen vybrán pro fermentační testy v bioreaktoru (obr. 3.). Maximální koncentrace rozpouštědel 14,2 $g.l^{-1}$ (z toho 10,0 $g.l^{-1}$ butanolu) bylo dosaženo po 36 h kultivace, přičemž produktivita tvorby rozpouštědel byla 0,40 $g.l^{-1}h^{-1}$ (produktivita tvorby butanolu 0,28 $g.l^{-1}h^{-1}$) a výtěžnost na spotřebovanou sacharosu vztažená k celkové produkci rozpouštědel 37 % (výtěžnost produkce butanolu 26 %). Dosažené hodnoty výtěžnosti a produktivity jsou dobře porovnatelné s hodnotami uváděnými v odborné literatuře (9). Při kultivaci bylo ze 114 g sacharosy vytvořeno 17 l plynu o koncentraci 35 % obj. vodíku (zbytek CO_2) a bylo dosaženo maximální koncentrace sušiny biomasy 3,0 $g.l^{-1}$. Celý fermentační proces v bioreaktoru lze popsat sumární rovnicí (rov. 1), kde $C_{12}H_{22}O_{11}$ je sacharosa, $C_4H_{10}O$ butanol, C_3H_6O aceton, C_2H_6O etanol, $C_2H_4O_2$ kyselina octová a $C_4H_8O_2$ kyselina máselná. Koeficienty pro jednotlivé látky byly získány po přepočtu skutečně stanovených koncentrací na molární koncentrace a celá rovnice byla vztažena k 1 molu substrátu, sacharosy.

$$\mathbf{1{,}00}\ C_{12}H_{22}O_{11} \rightarrow \mathbf{1{,}22}\ C_4H_{10}O + \mathbf{0{,}60}\ C_3H_6O + \mathbf{0{,}04}\ C_2H_6O + \mathbf{0{,}25}\ C_2H_4O_2 + \mathbf{0{,}20}\ C_4H_8O_2 + \mathbf{1{,}60}\ CO_2 + \mathbf{0{,}80}\ H_2 \qquad \textit{(rov. 1)}.$$

Jones a Woods (4) sumarizují výsledky řady kultivací s různými kmeny *C. acetobutylicum* a *C. beijerinckii*, které lze přepsat do podoby obdobné sumární rovnice (rov. 2), kde je však vznik stejných produktů vztažen k 1 mol glukosy. Obě rovnice zanedbávají tvorbu biomasy a minoritních vedlejších produktů (např. acetoinu a kyseliny mléčné). Ze srovnání obou rovnic

(je třeba vzít v úvahu, že glukosa je monosacharid a sacharosa disacharid) vyplývá, že:

$$\mathbf{1{,}00}\ C_6H_{12}O_6 \rightarrow \mathbf{0{,}56}\ C_4H_{10}O + \mathbf{0{,}22}\ C_3H_6O + \mathbf{0{,}07}\ C_2H_6O + \mathbf{0{,}14}\ C_2H_4O_2 + \mathbf{0{,}04}\ C_4H_8O_2 + \mathbf{2{,}21}\ CO_2 + \mathbf{1{,}35}\ H_2 \quad \textit{(rov. 2)},$$

v našem případě bylo dosaženo srovnatelné produkce butanolu, o trochu vyšší produkce acetonu, nižší produkce ethanolu a vodíku a horšího zpětného využití kyseliny máselné a octové.

Závěrem lze konstatovat, že řepná šťáva se jeví jako velmi perspektivní substrát pro výrobu biobutanolu zejména s ohledem na dosažené hodnoty produktivity a výtěžnosti. Je však třeba zvýšit výslednou koncentraci žádaného produktu, 1-butanolu, což bude předmětem dalších experimentů, kdy bude kultivace spojena s průběžným odstraňováním vytvořeného 1-butanolu pomocí stripování plynem.

Tato práce vznikla s finanční podporou projektu TIP č. FR-TI1/218, NAZV č. QH81323/2008 a výzkumného záměru MŠM6046137305. Děkujeme také firmě Cukrovary a lihovary TTD, a. s., za poskytnutí vzorku řepné šťávy.

Souhrn

Ze šesti testovaných klostridiálních kmenů dosahoval v kultivačním médiu s řepnou melasou i řepnou šťávou nejlepších výsledků kmen *Clostridium beijerinckii* CCM 6218. Po kultivaci v bioreaktoru bylo s využitím tohoto kmene a média, obsahujícího řepnou šťávu, dosaženo výtěžnosti butanolu 26 % a produktivity tvorby butanolu 0,28 $g.l^{-1}.h^{-1}$, což jsou hodnoty plně srovnatelné s běžně publikovanými údaji při využití jiných sacharidických substrátů. Bylo tedy jednoznačně potvrzeno, že řepná šťáva je velmi vhodným substrátem pro produkci biobutanolu.

Klíčová slova: biobutanol, řepná šťáva, řepná melasa, *Clostridum beijerinckii*, ABE fermentace.

Literatura

1. Bubník, Z. et al.: Zaměření výzkumu pro využití sacharosy k nepotravinářským účelům. *Listy cukrov. řepař.*, 125, 2009 (1), s. 28–33.
2. Reinberger, O.: Podpora rozvoje a užití bioetanolu v České republice. *Listy cukrov. řepař.*, 125, 2009 (7/8), s. 234–235.
3. [on line] http://www.biohydrogen.nl/hyvolution
4. Jones, D. T.; Woods, D. R.: Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.*, 50, 1986 (4), s. 484–524.
5. Beesch, S. C.: Acetone-butanol fermentation of sugars. *Ind. Eng. Chem.*, 44, 1952 (7), s. 1677–1682.
6. Patáková, P. et al.: Exploitation of food feedstock and waste for production of biobutanol. *Cz. J. Food Sci.*, 27, (2009) (4), s. 276–283.
7. Shaheen, R., et al.: Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent-producing clostridia. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2, 2000 (1), s. 115–124.
8. Qureshi, N.: *Solvent production v Schaechter, M. (ed.): Encyclopedia of Microbiology.* Third Edition, Oxford: Elsevier Ltd., 2009, s. 512–528, ISBN 978-0-12-373944-5.
9. Ezeji, T. C., et al.: Industrially relevant fermentations. In Dürre, P. (ed.): *Handbook on Clostridia.* Boca Raton: CRC Press, 2005, s. 797–812, ISBN 0-8493-1618-9.

Patáková P., Toure S. S. M., Šimáček P., Čížková H., Lipovský J., Linhová M., Fribert P., Rychtera M., Melzoch K.: Exploitation of Sugar Beet for Biobutanol Production

The strain *Clostridium beijerinckii* CCM 6218 has been selected as the best solvent producer from a group of six tested clostridial strains with respect to the results achieved using sugar beet molasses and juice cultivation media. The bioreactor cultivation with this strain and cultivation medium containing sugar beet juice lead to butanol yield 26 % and productivity 0.28 $g.l^{-1}.h^{-1}$ what were values completely comparable with published data summarizing results obtained with use of different saccharidic substrates. Thus, sugar beet juice proved to be a superior substrate for biobutanol production.

Key words: biobutanol, sugar beet juice, sugar beet molasses, *Clostridum beijerinckii*, ABE fermentation

Kontaktní adresa – Contact address:

Dr. Ing. Petra Patáková, Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Technická 5, 166 28 Praha 6 Dejvice, Česká republika, e-mail: petra.patakova@vscht.cz