

Bioetanol z celulosy – vliv přítomnosti inhibičních látek na produkční mikroorganismy

CELLULOSE ETHANOL – INFLUENCE OF INHIBITORS ON PRODUCTION STRAINS

Leona Paulová, Petra Patáková, Kitipong Jaisamut, Mojmír Rychtera, Karel Melzoch
Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Množící se zprávy o snižování objemu dostupných ropných nalezišť – prokázané světové zásoby ropy se ke konci roku 2007 pohybovaly kolem 1 240 miliard barelů (1) – spolu se stále se zvyšující globální spotřebou energie vyvolávají nutnost širšího využití alternativních energetických zdrojů. Jednu z možností představuje částečná náhrada ropných produktů kapalnými biopalivy, mezi kterými zaujímá přední místo bioetanol (2). Ten lze vyrobit fermentací z různých surovin, které obsahují buď jednoduché cukry, jež mohou mikrobiální producenti ethanolu přímo využít jako zdroj uhlíku a energie (např. sacharosa obsažená v cukrové řepě nebo cukrové třtině, ovocný cukr) nebo polysacharidy, které lze na jednoduché cukry přeměnit (např. škrobnaté suroviny – kukuřice, obilí, brambory, cassava nebo suroviny obsahující celulosu a hemicelulosu – zemědělské odpady jako obilná sláma nebo kukuřičné oklasky, energetické plodiny, lesní, papírenský nebo komunální odpad). Právě využití lignocelulosové biomasy pro výrobu bioethanolu k sobě v poslední době poutá značnou pozornost, a to zejména díky její široké dostupnosti a rychlé obnovitelnosti (celosvětová produkce rostlinné biomasy je zhruba $1,5 \cdot 10^{11}$ t za rok) (3), nízké ceně a faktu, že ji nelze využít pro lidskou výživu, čímž odpadají etické problémy spojené se zemědělskými surovinami první generace.

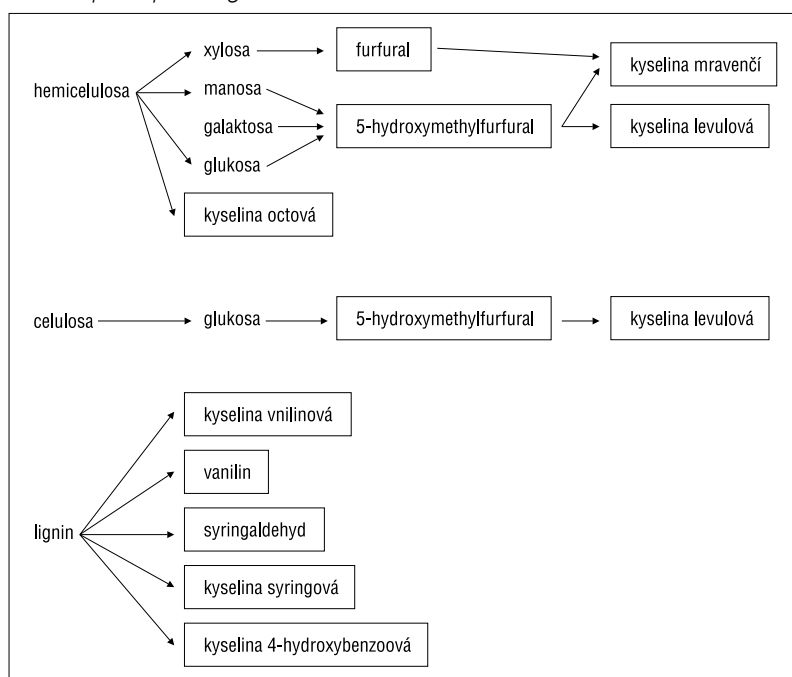
Na druhou stranu, lignocelulosové materiály patří mezi nejsložitější přírodní heteropolymery a jejich konverzi na etanol provází ve srovnání se surovinami první generace (jednoduché cukry, škrob) mnoho technických problémů. Aby mohla efektivně proběhnout enzymová hydrolyza celulosy na jednoduché sacharidy, je nejprve potřeba rozrušit komplexní matici tvořenou ligninem, celulosou a hemicelulosou (4). To se děje většinou za vysokých teplot, tlaků a v přítomnosti chemických činidel a v průběhu tohoto procesu může vznikat široká škála vedlejších produktů (obr. 1.), z nichž mnohé mohou mít silný inhibiční efekt a ovlivňovat jak aktivitu celulytických enzymů, tak i metabolismus produkčního mikroorganismu. Množství a zastoupení takto vzniklých inhibičních látek závisí především na typu materiálu a podmínkách jeho předúpravy (teplotě, tlaku, pH, době působení, redox potenciálu, přidávku chemikálií). Obecně však lze tyto látky rozdělit do tří hlavních skupin – deriváty furanu (furfural a 5-hydroxymethylfurfural), slabé organické kyseliny (octová, mravenčí a levulonová) a fenolové sloučeniny

pocházející hlavně z ligninu (5). Přítomnost furfuralu a hydroxymethylfurfuralu v největší míře ovlivňují aktivitu celulytických enzymů a růst produkčních mikroorganismů, a tím má vliv i na výtěžnost a rychlost produkce ethanolu a produktivitu celého procesu (6). V kyselých hydrolyzátech pšeničné slámy se tyto dvě látky vyskytují v koncentracích $0,1\text{--}1 \text{ g.l}^{-1}$ (7) v závislosti na podmínkách předúpravy.

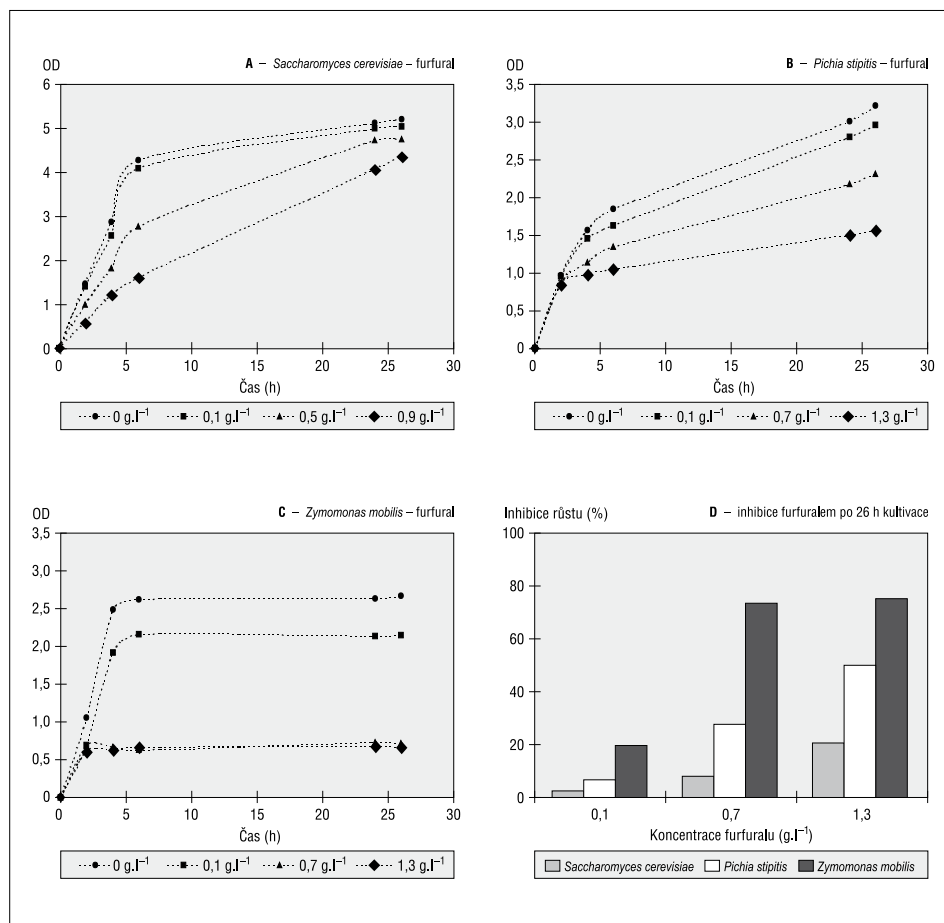
Tato práce se zabývá sledováním vlivu tří vybraných inhibičních látek (furfuralu, hydroxymethylfurfuralu a kyseliny 4-hydroxybenzoové) na růstové schopnosti tří potenciálních producentů ethanolu: kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia stipitis* a bakterie *Zymomonas mobilis*. Jelikož je ethanol primární metabolit, jehož tvorba je spojena s růstem biomasy, snížení růstové rychlosti ovlivní nejen celkovou koncentraci biomasy, ale i výslednou koncentraci ethanolu, a tím i produktivitu procesu.

Kvasinka *S. cerevisiae* je v dnešní době stále nejčastěji používaným mikroorganismem pro průmyslovou výrobu ethanolu. Zkvašuje všechny hexózy získané hydrolyzou lignocelulosového materiálu, výtěžnost při produkci ethanolu se blíží maximální teoretické hodnotě ($0,51 \text{ g.g}^{-1}$ ethanolu z glukosy), avšak značnou nevýhodou je,

Obr. 1. Přehled a původ hlavních inhibičních látek (v rámečku) vznikajících při předúpravě lignocelulózového materiálu



Obr. 2. Vliv furfuralu na růst vybraných mikroorganismů



že nedokáže přirozeně zkvašovat pentosové cukry, které se běžně v hydrolyzátech vyskytují (8). Naopak kvasinka *Pichia stipitis* je jedním z mála mikroorganismů přirozeně schopných využívat vedle hexos i xylosu a zkvašovat ji na ethanol. Výtěžnost etanolu z glukosy se pohybuje v rozmezí 0,31–0,48 g etanolu na 1 g sacharidu (9). *Zymomonas mobilis* je gramnegativní bakterie, která se vyznačuje vysokou výtěžností etanolu (až 97 % teoretického maxima) a vysokou objemovou produktivitou (až 3 g.(l.h)⁻¹), také však není schopna zkvašovat pentosové cukry (10).

Materiál a metody

Mikroorganismy *Saccharomyces cerevisiae* O3/26, *Pichia stipitis* DSM 3651 a *Zymomonas mobilis* CCM 2770 byly uchovávány ve formě kryokonzerv při teplotě –80 °C, jako kryoprotektant byl použit 30% roztok glycerolu. Kultivační médium obsahovalo v jednom litru 20 g glukosy, 10 g kvasničného extraktu, 20 g peptonu, 1 g NH₄Cl, 1 g KH₂PO₄ a 0,5 g MgSO₄ · 7H₂O. Erlenmeyerova baňka obsahující 150 ml média byla asepticky zaočkována vždy jednou kryokonzervou a poté kultivována aerobně při 30 °C po dobu 18 h na rotační třepačce s frekvencí otáček 150 min⁻¹. 10 ml takto připraveného inokula bylo poté asepticky převedeno do Erlenmeyerových baněk se 150 ml média, do kterého byly přidány inhibiční látky furfural, hydroxymethylfurfural (koncentrace 0,1; 0,7; 1,3 g.l⁻¹) nebo kyselina 4-hydroxybenzoová (koncentrace 0,1; 0,5; 0,9 g.l⁻¹) a kultivováno staticky po dobu 26 h při 30 °C. Koncentrace inhibitorů byla zvolena tak, aby odpovídala

jejich průměrnému obsahu v kyselém hydrolyzáte pšeničné slámy. Všechny experimenty byly prováděny třikrát, jako kontrola sloužilo médium bez přidání inhibitorů. Nárůst biomasy byl monitorován jako absorbance (optická densita) odebraného vzorku měřená při 600 nm proti destilované vodě. Stupeň inhibice byl vypočten podle rovnice:

$$I = \left(1 - \frac{OD}{OD_i}\right) \cdot 100 \quad (\%),$$

kde I představuje stupeň inhibice, OD představuje koncentraci biomasy bez přítomnosti inhibiční látky a OD_i reprezentuje koncentraci biomasy v přítomnosti inhibitoru.

Výsledky a diskuze

Na obr. 2. je porovnán vliv přítomnosti furfuralu na růstové schopnosti kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (2a), *Pichia stipitis* (2b) a bakterie *Zymomonas mobilis* (2c) v průběhu 26h kultivace. Lze konstatovat, že přítomnost furfuralu ve všech případech ovlivnila růstové schopnosti těchto

mikrobiálních producentů etanolu v porovnání s kontrolní kultivací (2d). Citlivost všech kmenů vůči tomuto inhibitoru se s rostoucí koncentrací furfuralu zvyšovala, přičemž jeho přítomnost neovlivňovala délku lag fáze, ale snižovala celkový nárůst buněčné biomasy, a to v případě bakterie *Zymomonas mobilis* až o 75 % v médiích obsahující furfural v koncentracích 0,7 g.l⁻¹ a vyšších. Z obr. 2a je patrné, že *Saccharomyces cerevisiae* je schopna se na přítomnost této inhibiční látky adaptovat; ačkoli po 6 hodinách kultivace v médiu s nejvyšší koncentrací tohoto inhibitoru bylo pozorováno 63% snížení nárůstu biomasy, po 26 hodinách kultivace byl tento pokles již jen 20% (obr. 2d). Stejný efekt byl pozorován pro dva různé kmeny *S. cerevisiae* (11), přičemž k odstranění inhibičního efektu docházelo zřejmě díky schopnosti této kvasinky přeměnit furfural na méně toxický furfurylalkohol. Díky postupnému snižování furfuralu v médiu došlo stejně jako v našem případě i ke zvýšení růstové rychlosti. Ačkoli u kvasinky *Pichia stipitis* došlo také ke snížení inhibičního efektu přítomného furfuralu, přesto vykazovala na konci kultivace 50% snížení nárůstu biomasy v přítomnosti 0,9 g.l⁻¹ furfuralu v porovnání s kultivací v médiu bez inhibitoru. *Zymomonas mobilis* nebyla schopna médium detoxifikovat a vykazovala i nejvyšší citlivost k přítomnosti furfuralu.

Přítomnost hydroxymethylfurfuralu měla na testované kmeny zásadně nižší inhibiční efekt než furfural (obr. 3a–c); nejcitlivější byla k tomuto inhibitoru *Pichia stipitis*, jejíž nárůst byl při koncentraci 0,9 g.l⁻¹ hydroxymethylfurfuralu snížen o 21 % (obr. 3d). Nižší inhibiční působení hydroxymethylfurfuralu může být vysvětleno tím, že díky hydroxylové skupině má tato látka

v porovnání s furfurelem vyšší polaritu, a tím nižší schopnost difuze do cytoplasmy (12). Také v případě hydroxymethylfurfuralu bylo publikováno (13), že kvasinky jsou schopny redukovat aldehydovou skupinu jeho furanového kruhu a tak snižovat jeho inhibiční efekt, což bylo pozorováno i v našich experimentech. *Zymomonas mobilis* vykazovala dobrou toleranci jak vůči přítomnosti hydroxymethylfurfuralu (obr. 3c,d), tak i kyseliny 4-hydroxybenzoové (obr. 4c,d). Dobrá odolnost této bakterie vůči hydroxymethylfurfuralu byla popsána i v odborné literatuře (14). Přítomnosti kyseliny 4-hydroxybenzoové prakticky neovlivnila růst kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (obr. 4a,d), nejcitlivěji na ni reagovala *Pichia stipitis*; koncentrace kyseliny 4-hydroxybenzoové 1,3 g.l⁻¹ způsobila 16% snížení růstu (obr. 4b,d).

Závěr

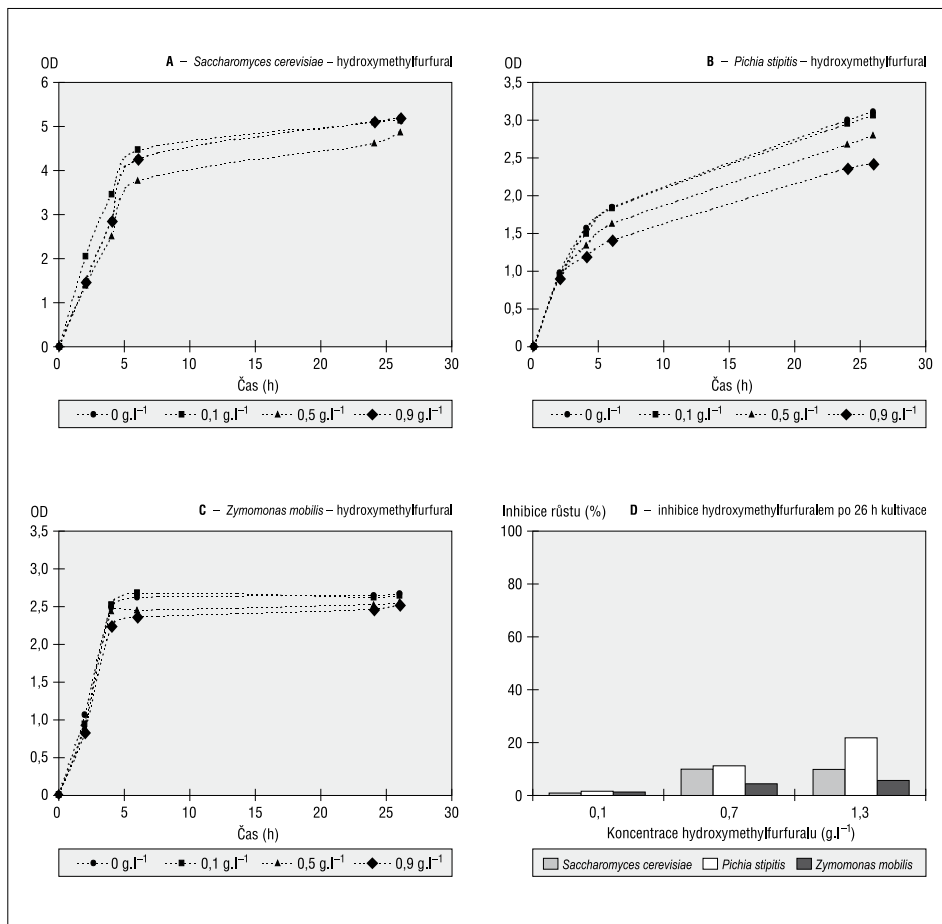
Inhibiční efekt degradačních produktů ligninu, hemicelulosy a celulosy, které vznikají při předúpravě pšeničné slámy, závisí nejen na jejich koncentraci, ale i na typu a na vlastnostech produkčního mikroorganismu. Toxický efekt jednotlivých inhibitorů na testované kmeny klesal v pořadí furfural → hydroxymethylfurfural → kyselina hydroxybenzoová, přičemž všechny testované inhibitory ovlivňovaly celkový nárůst biomasy, nikoli délku lag fáze. Bylo zjištěno, že kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia stipitis* jsou v průběhu kultivace schopny eliminovat přítomnost furfuralu a hydroxymethylfurfuralu a tím snižovat jejich inhibiční efekt. *Saccharomyces cerevisiae* vykazovala největší odolnost vůči působení testovaných inhibičních látek, bakterie *Zymomonas mobilis* byla silně citlivá k přítomnosti furfuralu. *Pichia stipitis* jako jediná z testovaných mikroorganismů reagovala na přítomnost hydroxybenzoové kyseliny. Protože testované inhibiční látky ve všech případech negativně ovlivnily kultivační proces (zpomalily nárůst biomasy), je potřeba buď lignocelulosové hydrolyzáty před fermentací detoxifikovat, což vyžaduje další investice a tak zvyšuje cenu finálního produktu (bioetanolu) nebo pečlivě vybrat mikroorganismus, který je k přítomnosti inhibitorů méně citlivý.

Poděkování: Tato studie vznikla s finanční podporou MŠMT ČR v rámci programového projektu výzkumu a vývoje Kontakt ME10146 a výzkumného záměru MŠM6046137305.

Souhrn

Výroba etanolu z lignocelulosové biomasy k sobě v posledních desetiletích poutá velkou pozornost. Přes její nesporné výhody (cena

Obr. 3. Vliv hydroxymethylfurfuralu na růst vybraných mikroorganismů



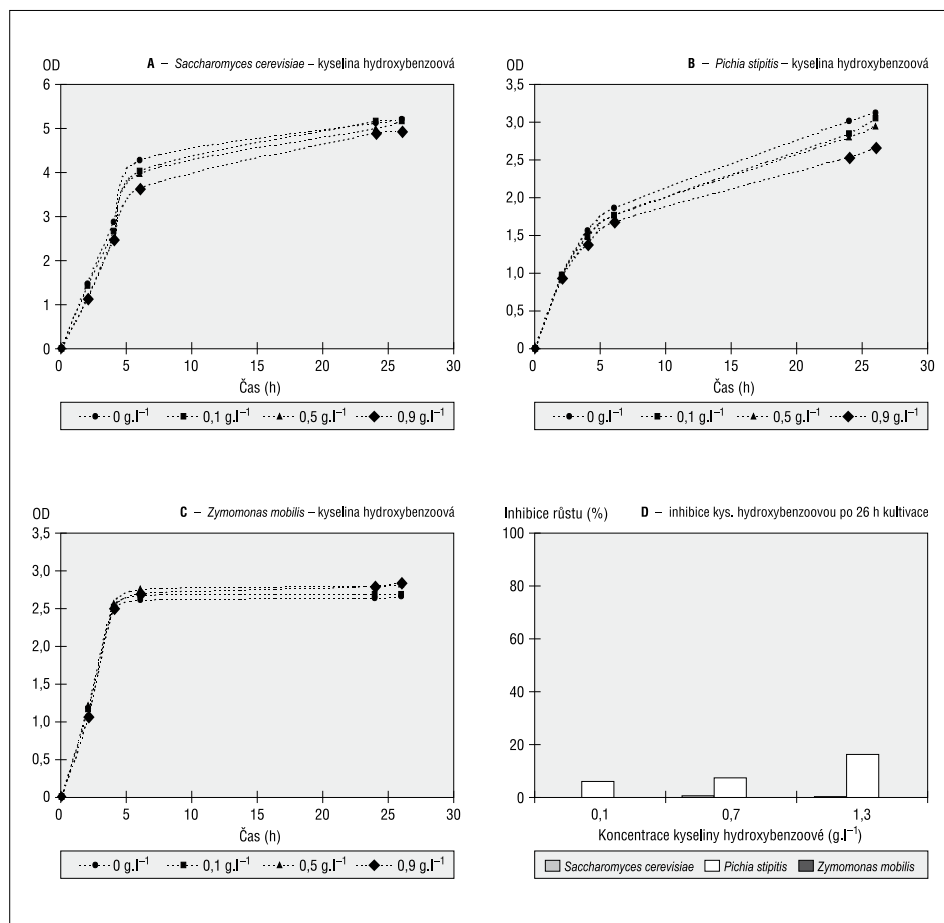
suroviny, obnovitelnost) ji stále provázejí i problémy, jedním z nich je i vznik inhibičních látek při nutné předúpravě biomasy. Tyto látky mohou ovlivňovat jak efektivitu enzymové hydrolyzy celulosy, tak i metabolismus mikrobiálních producentů ethanolu. Toxický efekt testovaných inhibičních látek na kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia stipitis* a bakterii *Zymomonas mobilis* klesal v pořadí furfural → hydroxymethylfurfural → kyselina 4-hydroxybenzoová. *S. cerevisiae* vykazovala největší odolnost vůči působení testovaných inhibičních látek, *Z. mobilis* byla silně citlivá k přítomnosti furfuralu. *P. stipitis* jako jediná z testovaných mikroorganismů reagovala na přítomnost 4-hydroxybenzoové kyseliny. Tyto výsledky ukazují, že při výrobě ethanolu z lignocelulosy je nutné pečlivě vybrat produkční mikroorganismus, který je k přítomnosti inhibitorů méně citlivý.

Klíčová slova: ethanol, lignocelulosa, inhibice růstu, furfural, hydroxymethylfurfural, kyselina 4-hydroxybenzoová.

Literatura

1. World Proved Reserves of Oil and Natural Gas, Most Recent Estimates. [online] <http://www.eia.gov/international/reserves.html>, staženo 8. 8. 2011.
2. Číž, K.: Bioetanol – světový rozvoj jeho využití jako motorového paliva. *Listy cukrov. řepař.*, 126, 2010 (1), s. 31–32.
3. BALAT, M. ET AL.: Biomass energy in the world, use of biomass and potential trends. *Energy Sources*, 27, 2005, s. 931–940.
4. HROMÁDKO, J. ET AL.: Výroba bioetanolu. *Listy cukrov. řepař.* 126, 2010 (7/8), s. 267–270.

Obr. 4. Vliv kyseliny hydroxybenzoové na růst vybraných mikroorganismů



5. ALMEIDA, J. R. M. ET AL.: Mini-review: Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 82, 2007, s. 340–349.
6. CANTARELLA, M. ET AL.: Effects of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF, *Biotechnol. Prog.*, 20, 2004, s. 200–206.
7. HEER, D. ET AL.: Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microbial. Biotech.*, 1, 2008, s. 497–506.
8. INGLEDEW, W. M.: Yeasts for production of fuel ethanol. In ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (ed.): *The Yeasts*, Volume 5, Second Edition: *Yeast Technology*. Academic Press, ISBN 0-12-596415-3.
9. AGBOGBO, F. K. ET AL.: Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.*, 30, 2008, s. 1515–1524.
10. WEBER, CH. ET AL.: Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 2010, s. 1303–1315.
11. LIU, Z. L. ET AL.: Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 2004, s. 345–352.

12. LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; GORSICH, S. W.: Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. *Appl. Biochemistry and Biotechnology*, 121–124, 2005, s. 451–460.
13. PALMQUIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.: Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.*, 74, 2000 (1), s. 17–24.
14. YANG, S. ET AL.: The *Zymomonas mobilis* regulator *hfq* contributes to tolerance against multiple lignocellulosic pretreatment inhibitors. *BCM Microbiology*, 10, 2010 (5/135), 11 s.

Paulová L., Patáková P., Jaisamut K., Rychtera M., Melzoch K.: Cellulose Ethanol – Influence of Inhibitors on Production Strains

Production of ethanol from lignocellulose biomass has attracted wide attention in recent decades. Despite its undeniable advantages (low price, renewable source) there are also some problems such as formation of inhibitors in lignocellulose pre-treatment process. The inhibitors can influence not only the efficiency of enzymatic hydrolysis of cellulose but also the metabolism

of microorganisms producing ethanol. Toxic effect of selected inhibitors on growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* decreased in the order of furfural → hydroxymethylfurfural → 4-hydroxybenzoic acid. While *S. cerevisiae* was quite resistant to all tested inhibitors, growth of *Z. mobilis* was highly influenced by furfural. Contrary to other strains, *P. pastoris* was sensitive to the presence of 4-hydroxybenzoic acid. These results indicate that a careful selection of microorganism less sensitive to inhibitors can improve the productivity of lignocellulose ethanol.

Key words: ethanol, lignocellulose, inhibition of growth, furfural, hydroxymethylfurfural, hydroxybenzoic acid.

Kontaktní adresa – Contact address:

Dr. Ing. Leona Paulová, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biotechnologie, Technická 5, 166 28 Praha 6 Dejvice, Česká republika, e-mail: leona.paulova@vscht.cz

Přijďte se podívat na

3. ročník Cukrových slavností v Dobrovici a na Loučeni — 6. 10. 2012

více informací na www.dobrovickamuzea.cz a na www.zamekloucen.cz/cukrove-slavnosti