



**Tudományos Diákköri
Konferencia
2022**



Bioetanol előállítása elektrofermentációs technológiával

Készítette: Kovács Szilveszter
Témavezető: Koók László
Pannon Egyetem, Mérnöki Kar
Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Csoport
A pályamunka lezárásának dátuma: 2022.04.18

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	1
1. Irodalmi áttekintés.....	2
1.1. A bioetanol.....	2
1.1.1. Az etanol szerepe a történelemben	2
1.1.2. Etilén hidrolízise	3
1.1.3. Etanol fermentáció	5
1.2. Bioelektrokémiai rendszerek	7
1.2.1. Elektrofermentáció.....	7
1.2.2. Elektrofermentációs cellák felépítése	8
1.3. Mikroorganizmusok.....	10
2. Célkitűzés	10
3. Anyagok és módszerek.....	10
3.1. Inokulum és tápközegek	10
3.2. A fermentorok összeállítása.....	11
3.3. Mérési módszerek	12
3.3.1. Töltésátvitel követése.....	12
3.3.2. Fermentációs termékek nyomonkövetése	12
3.4. Kiértékelés	13
3.5. A mérés menete.....	14
4. Eredmények.....	15
4.1. Etanol termelés különböző elektródpotenciálokon.....	15
4.1.1. Mérések -0,8 V elektródpotenciál értéken	15
4.1.2. Mérések -1,2 V elektródpotenciál értéken	17
4.2. Fermentációs kinetika vizsgálata a módosított Gompertz modellel	19
4.2.1. -0,8 V-os elektrofermentáció kinetikai viselkedése.....	19

4.2.2.	-1,2 V-os elektrofermentáció kinetikai viselkedése.....	20
4.3.	Töltéshasznosítás vizsgálata elektrofermentációnál	22
4.3.1.	-0,8 V-os elektrofermentáció	22
4.3.2.	-1,2 V-os elektrofermentáció	23
5.	Összefoglalás.....	25
6.	Köszönetnyilvánítás	25
7.	Irodalomjegyzék.....	27

Tartalmi összefoglaló

A mikrobiális fermentáció során különböző mikroorganizmusok metabolikus útjait felhasználva alakítunk át valamilyen szubsztrátot a kívánt terméké. Erre példa az etanol glükózból való előállítása *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgombával. Az elektrofermentáció egy olyan eljárás, mely során a fermentációt végző mikroorganizmusok metabolizmusát kontrolláljuk elektrokémiai úton. Ennek során a reaktorban elhelyezett elektródok közti potenciálkülönbség hatására többlet redukáló erő biztosítható a sejtek számára, mely hatással lehet annak anyagcserefolyamataira, illetve akár új metabolikus utakat is megnyithat.

Az elektrofermentáció során számos tényező befolyásolhatja a hozamot, szelektivitást és produktivitást, ilyenek az elektródok típusai, az elektródpotenciál értéke, a felhasznált mikroorganizmus, annak környezete, a kezdeti szubsztrátkoncentráció, valamint a pH is.

A jelen munkában azt vizsgáltam, hogy egy adott etanoltoleráns *Saccharomyces cerevisiae* törzset felhasználva a klasszikus fermentációhoz képest az elektrofermentáció alkalmazása milyen hatással van az etanol előállítására. Vizsgáltam továbbá az elektródpotenciál hatását is. Az eredmények alapján az elektrofermentáció ígéretes stratégiának bizonyulhat az etanol termelés intenzifikálására, hatása pedig a hozam növelése mellett a rövidebb lag-fázis, teljesebb konverzió és értékes melléktermék képződés formájában nyilvánult meg. A hozam méréseim során 11%-al növekedett az elektrofermentáció során, míg a konverzió egy ugyanannyi ideig futó kísérlet során 84%-ról 100%-ra ugrott.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A bioetanol

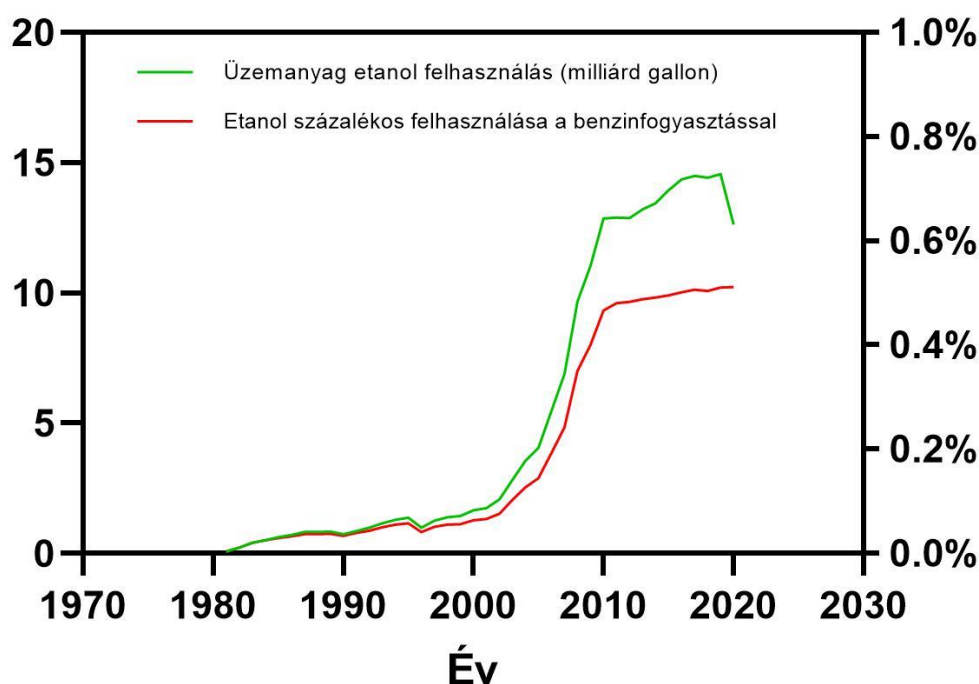
Az etanol egy alkohol típusú szerves vegyület, melynek számos felhasználási módja van, többek közt, mint fertőtlenítő, oldószer, valamint energiaforrás. A bioetanol előállítása valamely biomassa fermentációjával történik.

1.1.1. *Az etanol szerepe a történelemben*

Az alkohol használata már az ember korai történelmébe is visszanyúl. Az etanol fermentáció bármely megfelelő cukor tartalmú gyümölcsben megindul, így a korai emberek valószínűleg a földre hullott termésekben találtak először eme vegyülettel, melynek hatásait a szervezetre feltehetően kellemesnek érzékelték, ezzel megkezdve az emberi alkoholfogyasztás történetét.

Történelmünk során a fermentációt igen régen kezdtük el tudatosan alkalmazni, vélhetően az egyik legkorábbi biotechnológiai eljárás volt, melyet az emberiség saját hasznára fordított. Különböző archeológiai kutatások feltárták, hogy a sumér gyógyszerészek Kr. e. 2100-ban már sört írtak fel különböző betegségekre, a Kr. e. 1770 köré becsült Hammurapi törvényoszlopa szabályokat szabott ki közösségi terekre, melyeket alkohol fogyasztásra használtak, valamint a Kr. e. 1500-ban elő egyiptomi orvosok receptjein megtalálható volt a sör, illetve a bor [1]. Ezek a korai feljegyzések betekintést adnak nekünk nem csak arra, hogy milyen elterjedt volt ezekben az időkben az alkohol felhasználása, azonban arra is milyen fontos volt a korai civilizációkban.

Az etanol felhasználása eleinte a fogyasztásban merült ki, többek közt köszönhetően a különböző fermentált italok tápanyagtartalmának, a sterilitásuknak, hiszen ekkor még nem volt a tiszta ivóvíz széleskörűen elérhető, illetve magának a vegyületnek a fájdalomtompító hatásának. Nem meglepő tehát, hogy a mai napig is az ipar jelentős részét teszi ki a szeszes italok gyártása, azonban az etilalkohol azóta más technológiai célokra is széleskörűen használt, például a szerves kémiában oldószerként, így különböző gyógyszerek, műanyagok, lakkok, kozmetikumok gyártásában is kiemelkedő szerepe van, illetve energiahordozóként is széleskörűen alkalmazott (1.1-es ábra).



1.1 ábra: Az Egyesült Államok üzemanyag célú etanol felhasználása [2]

Látható, hogy pusztán, mint energiahordozó is hatalmas felhasználása van világszerte, így elengedhetetlen, hogy az etilalkohol gyártás lépést tudjon tartani a felhasználási igénnyel.

Az etanol két fő előállítási módja van, melyet nagyvolumenű gyártáshoz alkalmaznak, az etilén hidrolízise, illetve a szénhidrátok fermentációja [3].

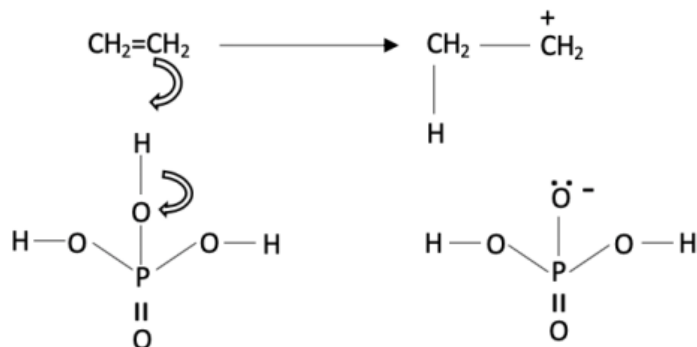
1.1.2. Etilén hidrolízise

Az etanol etilénből való szintézise főleg oldószerkészítésre alkalmas, hiszen ez a módszer mindössze az ipari előállítás 7%-át teszi ki. Ez főleg a módszer árának a következménye, ugyanis az etilén, mint szubsztrát egy költségesen beszerezhető anyag [4].

A fő reakció a következőképp írható le:

Mivel egyensúlyi reakcióról van szó, a reakciókörülmények optimalizálása elengedhetetlen, hiszen a maximális konverzió elérése a cél. A reakció lefutásához katalizátor használata szükséges. A használt katalizátor jelentősen képes befolyásolni a kapott etanol hozamát. Egy ilyen katalizátor például a foszforsav. Használata igen elterjedt, ugyanis 98,5%-os szelektivitást mutat a reakcióra. Maga a reakció mechanizmusa elektrofil addíció, ahol a π

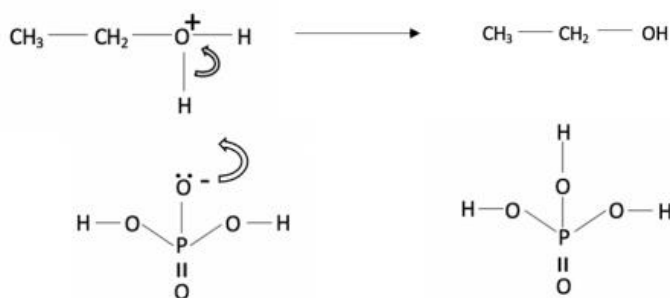
kötést felszakítjuk. Foszforsav használatakor az 1.2, 1.3 és 1.4-es ábrán feltüntetett reakciók játszódnak le:



1.2. ábra: Proton transzfer a foszforsavról az etilénre [4]



1.3. ábra: Protonált etilén reakciója vízzel [4]



1.4. ábra: Katalizátor regenerációja [4]

Ebben a reakcióban a foszforsavat szilícium-dioxidra viszik fel. Ideális körülményei 70-80 atm nyomás, 250-300 °C és 0,6-os gőz/etilén arány. Ilyen esetben 4-5%-os konverzió érhető el, a maradék etilén pedig recirkulálható a reakcióba [4].

Cirkónium-volfrám is alkalmazható katalizátorként, ekkor 68 atm nyomás, 280 °C és 2,1-es gőz/etilén arány használata szükséges. Ebben az esetben 9%-os konverzió érhető el [4].

Ezekből a módszerekből látható, hogy az etanol kémiai előállítása nem csupán a limitált konverzió miatt hátrányos, de a folyamatokhoz a reaktorokban magas nyomáson és hőmérsékleten kell dolgozni, melyek megnehezítik a reakciót, valamint költséges ezeknek az állapotoknak a fenntartása is, nem is beszélve a fellépő balesetveszélyről.

1.1.3. Etanol fermentáció

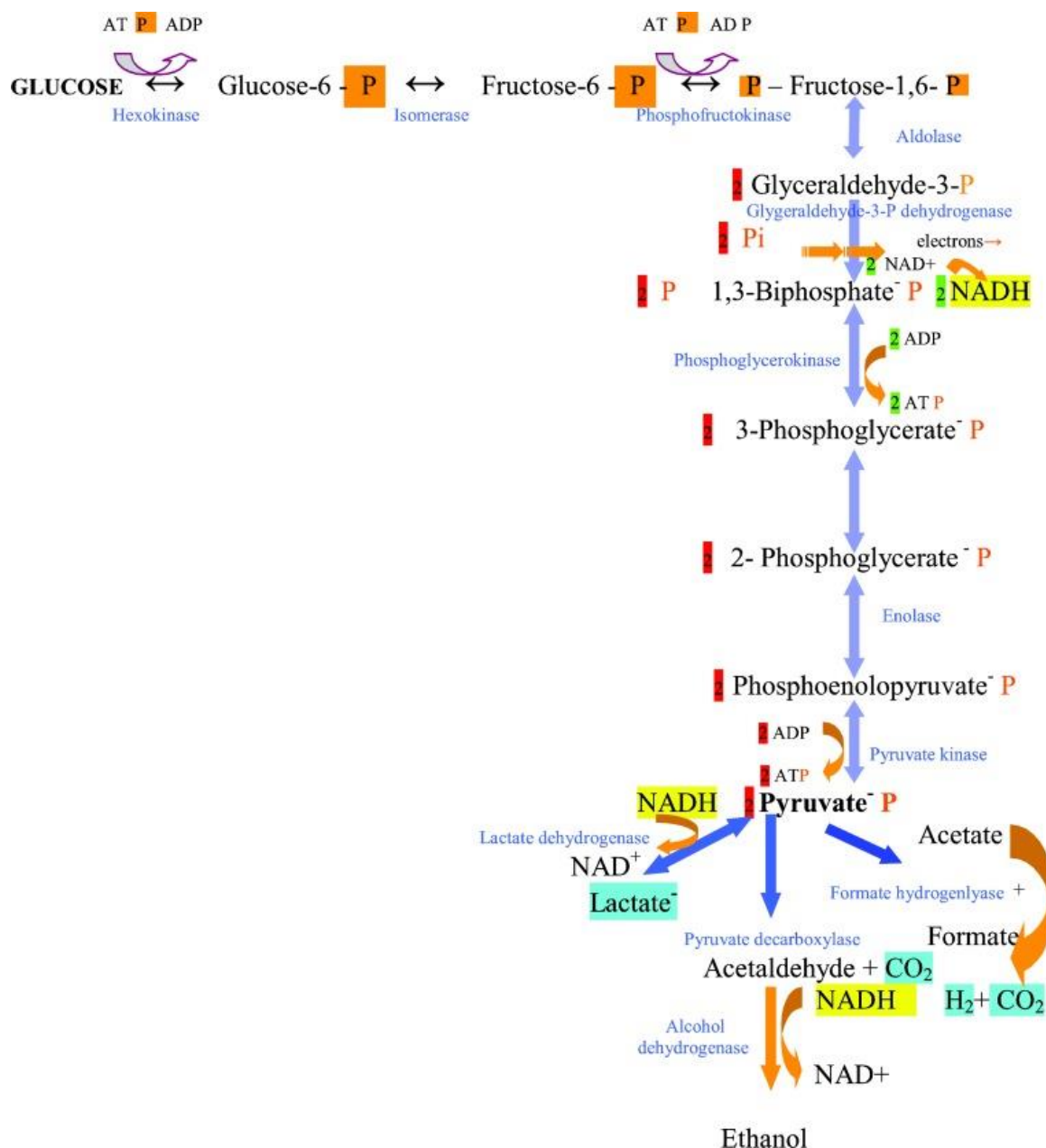
Előnye a fermentációnak a kémiai előállítási módszerekhez képest, hogy a mikrobák és enzimeik használatával a reakció lefutásához szükséges hőmérséklet és nyomás lecsökkenthető, valamint általánosan elmondható az is, hogy a konverzió és hozam is jelentősen nagyobb ezeknél a folyamatoknál. Továbbá az sem elhanyagolható, hogy a szubsztrátnak használt, általában növényi eredetű biomassa ára igen alacsony, így az eljárások költséghatékonyabbak is lehetnek, még a feldolgozási műveletek beleszámításával is.

A fermentáció általános menete a szubsztrátnak használt anyagunk tisztításával kezdődik, mely során megszabadulunk a különböző szennyeződésektől, melyek zavart okozhatnak a fermentációban. Ezt követően a hosszú szénhidrát láncokat hidrolízissel bontják, melynek körülményei az alkalmazott technológia szerint eltérhetnek, alkalmazható magas hő, nyomás, illetve különböző savak, valamint hidroláz enzimek is bevetethetők. Ez után következik a fermentációs lépés, mely során valamely mikroorganizmus felhasználásával, annak optimális körülményeinek fenntartásával etanol és szén-dioxid keletkezik. Az egyik leggyakrabban használt mikroba a *Saccharomyces cerevisiae*, mely az élesztők közé sorolható, széleskörűen elérhető és akár 18%-os etanol koncentrációt is képes termelni. Különböző törzsek azonban különböző alkohol-tűrőképességet mutathatnak, így amennyiben magas etilalkohol koncentráció elérése a célunk, érdemes alkoholtűrő törzset választani. A fermentáció lefutását követően következik a desztilláció/szűrés, melyek során az etanolt elválasztjuk a fermentlétől [4].

A *S. cerevisiae* glükózból való etanol termelésének fő metabolikus útja az Embden–Meyerhof út, mely során az exogén elektron donor, ami esetünkben és leggyakrabban a glükóz, piruváttá oxidálódik három fő lépésben. Az első lépés során két ATP molekula szolgáltatja az energiát, egyik a hexokináz enzimet segíti a glükóz-6-foszfát szintézisben, a másik egy izomeráz enzimet táplál, mely az előbb említett molekulát fuktóz-6-foszfáttá alakítja. A foszfofruktokináz tovább foszforilálja a vegyületet, mely fruktóz-1,6-bifoszfáttá alakul a második ATP felhasználásával. Az első lépés végén aldoláz hasítja a fruktóz-1,6-bifoszfát molekulát kettő gliceraldehid-3-foszfáttá [5].

A második lépés redoxfolyamatok sorozata, melyek a gliceraldehid-3-foszfátot 1,3-bifoszfoglicerinné alakítják dehidrogenáz enzim segítségével. Az enzimes reakció során NAD^+ alakul NADH molekulává. Ezek után 2 ATP szintetizálódik a 1,3-bifoszfoglicerin 3-foszfogliceráttá alakulása során, majd később a foszfopiroszölősav piroszölősavvá alakításakor, melyet piruvát kináz végez [5].

A harmadik lépésben a NADH molekulák oxidálódnak vissza NAD^+ molekulává, ebben a lépésben különböznek leginkább az egyes organizmusok. Míg például a *Lactobacillus kimchii* a piruvátot tejsavvá alakítja dehidrogenázzal, a *S. cerevisiae* redukálja a piruvátot, mely során etanol és szén-dioxid keletkezik piruvát-dekarboxiláz és alkohol-dehidrogenázfelhasználásával [5, 6]. A glükóznak etanollá való átalakulásának teljes folyamata az 1.5-ös ábrán található:



1.5 ábra: Az Embden-Meyerhof út

Egyéb metabolikus utak is léteznek, melyek úgyszintén glükózt használnak elektrondonorként, például a heterolaktikus, foszfoketolázos, illetve az Entner-Doudoroff út, azonban az Embden–Meyerhof út a legjelentősebb, főleg a *S. cerevisiae* esetében.

1.2. Bioelektrokémiai rendszerek

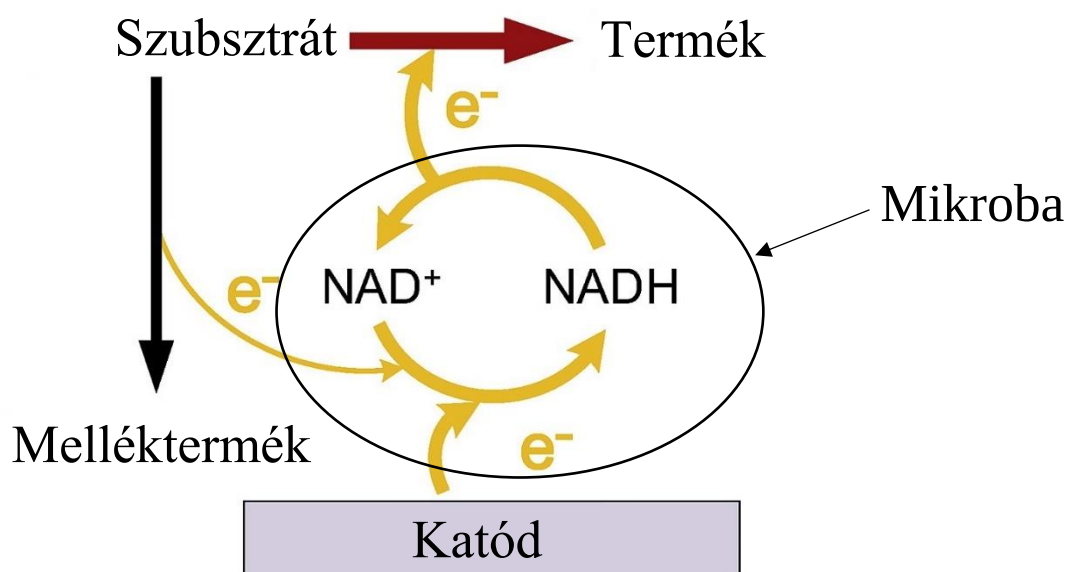
Az elektrokémiát és a mikrobiológiát összekötő folyamatokat úgynevezett bioelektrokémiai rendszerekben végezzük. Ezek általában két, egymástól membránnal elválasztott reaktortérből állnak, a két félcellában pedig egy anód és egy katód elektród található.

Az anódon oxidációs, míg a katódon redukációs folyamatok mennek végbe. A rendszernek legalább egyik cellájában mikroorganizmusokat alkalmaznak, melyek (i) a betáplált szubsztrátot különböző anyagcserefolyamatok során lebontják és az anaerob körülmények között keletkező elektronokat a sejtről az anódra átadni képesek, vagy (ii) a katódtérben a katódról elektronok felvétele mellett redukációs folyamatokban vesznek részt [7].

1.2.1. Elektrofermentáció

1910-ben M. C. Potter fedezte fel először, hogy a szerves vegyületek mikrobiális bontásával elektromos energia felszabadulása jár. Ez feltehetően az első megfigyelése az extracelluláris elektron transzfernek (EET), mely során mikroorganizmusok elektronokat transzportálnak a sejtfalukon keresztül egy külsőelektron akceptor felé [7].

Az elektrofermentáció a hagyományos fermentációt kombinálja elektrokémiával. A módszerhez egy bioelektrokémiai rendszert alakítunk ki, melyben a mikrobák természetes metabolikus útjait kontrolláljuk elektrokémiai módon (elektrokémiai redukáló erő bevitelével), ezzel befolyásolva a fermentáció lefutását (1.6-os ábra).



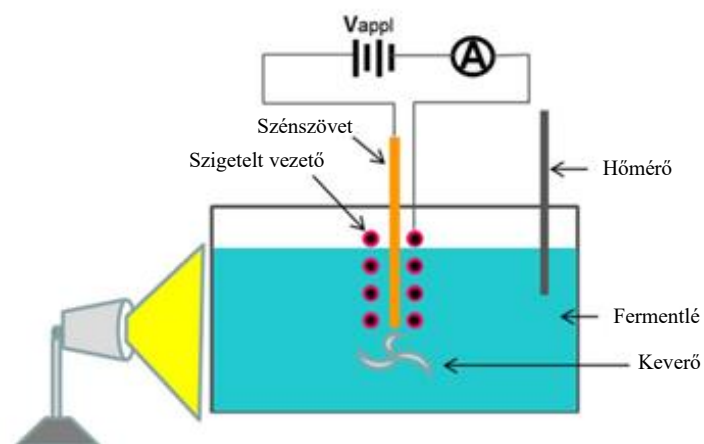
1.6 ábra: Az elektrofermentáció sémája [8]

A fermentáció során a sejten belüli redox egyensúly elérése érdekében termelődnek annak termékei, azonban ennek a folyamatnak akadálya lehet, ha az intercelluláris redukáló anyagok elfogynak, vagy túlzottan felgyülemlekednek. Az elektrofermentáció ezt a problémát oldja meg oly módon, hogy az elektródok által indukált elektrontranszfer segítségével megváltoztatják a sejteken belüli redoxpotenciált és a koenzimek oxidált, illetve redukált formájának arányát. Mikor az elektród elektron akceptorként viselkedik, akkor a folyamatot anódos elektrofermentációnak hívjuk, ilyenkor oxidált termék képződik. Ellenkező esetben az elektród szolgálja a sejteket elektronokkal, ilyenkor redukált termékek képződnek és a folyamatot katódos elektrofermentációnak nevezzük [9,10].

A mikroorganizmusban lejátszódó reakciók, illetve azok mechanizmusai tehát nem változnak, pusztán a redox egyensúly változtatásával befolyásolhatóak. Ezt felhasználva számos fermentációs úton előállított vegyület előállítása serkenthető, ilyen például a glükóz etanolá alakítása.

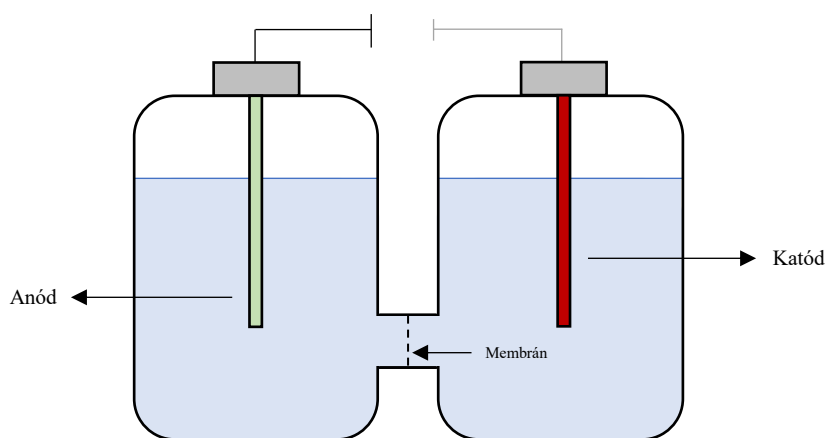
1.2.2. Elektrofermentációs cellák felépítése

Az elektrofermentáció többféle rendszerrel is kivitelezhető. Az egyik ilyen az egykamrás megoldás, mely során az anód- és a katódtér nincs elválasztva egymástól. Egy ilyen kialakítás látható az 1.7-es ábrán feltüntetett foto-elektrofermentoron.



1.7 ábra: Egykamrás foto-elektrofermentor [11]

A másik megoldásban az anód- és katódteret egy membránnal választjuk el egymástól, melyre példa az 1.8-as ábrán van feltüntetve. A katódterbe betöltjük a tápközeget, mely tartalmazza a mikrobákat, azok életfolyamataikhoz szükséges tápanyagokat, valamint a szubsztrátot.



1.8 ábra: Kétcellás elektrofermentor

Elektród anyagként érdemes katódnak szénből készült anyagokat választani, hiszen ezek nagy szaporodási felületet biztosít a mikroorganizmusok számára, valamint költségük szempontjából is igen gazdaságosak. Anódnak alkalmazható pl. szén-, titán- és acélalapú, elektród, esetenként katalizátorral (pl. platina) bevont formában.

1.3. Mikroorganizmusok

A fermentációs folyamatok középpontjában a mikrobák állnak, melyekben a különböző metabolikus utak által a kívánt terméket előállíthatjuk. Rendkívül fontos a megfelelő mikroba kiválasztása, mely során figyelembe kell venni azok egyedi igényeit és képességeit, hiszen egy termék előállítására több potenciális mikroorganizmus is felhasználható, azonban ezek jelentősen eltérhetnek tápanyag, pH, hőmérséklet igényükben, illetve ellenállásuk külső és belső behatásokkal szemben is eltérő lehet. Etanol elektrofermentációja esetén például érdemes olyan mikrobát választani, mely a magas etanol koncentrációt képes eltűrni [12].

2. Célkitűzés

A kutatás során azt vizsgáltam, hogy egy két cellás elektrofermentációs rendszerben az elektródpotenciálnak milyen szerepe van a fermentáció lejátszódásában. A kísérleteim célja az volt, hogy bebizonyítsam, hogy az etanol előállításra széleskörűen használt *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba anyagcserefolyamatai jelentősen serkenthetők elektrofermentációs rendszerben a hagyományos fermentációval összevetve.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Inokulum és tápközegek

A mérésekhez használt *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba (NCAIM szám: Y.00162) egy etanol tűrő törzs, melynek tápoldatát az alábbi recept alapján készítettem (DSMZ 186 Universal medium for yeasts):

- Élesztőkivonat: 3 g
- Maláta kivonat: 3 g
- Szójapepton: 5 g
- Glükóz: 10 g
- Agar: 15 g
- Desztillált víz: 1000 ml

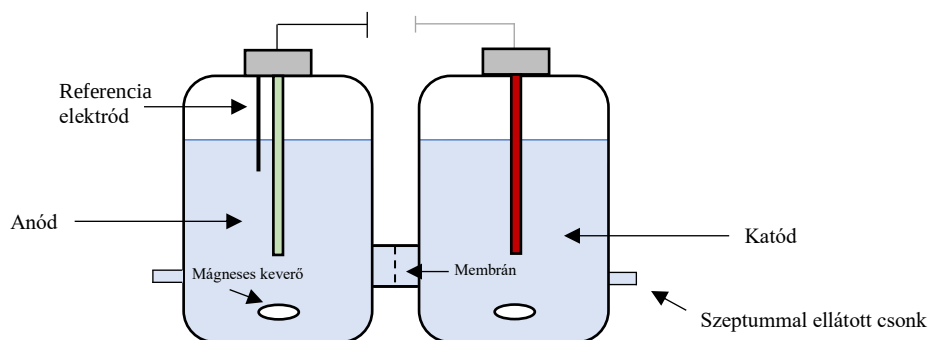
A felhasznált sejteket először kémcsőre, ferde agarra oltottam, majd ezekről a kémcsövekről oltottam az elkészített oldatba. Ez került végül a katódtérbe a sejtekkel való beoltás után.

A tápoldatba való beoltást a befertőződés esélyének minimálisra csökkentése érdekében lamináris box alatt végeztem. A ferdeagaros telepeimre a tápoldatból egy kis mennyiséget helyeztem, melyet aztán vortex-szel kevertem, hogy minél több sejt oldódjon bele, majd ezt

beleöntöttem a tápoldatba. Az így elkészített inokulumot 28 °C-on inkubáltam, valamint 150 rpm-el rázattam egy napon keresztül. Ebből vettem ki 10-10 ml-t inokulálás céljából a referencia és az elektrofermentációs reaktorba.

3.2. A fermentorok összeállítása

Az általam használt rendszert a tanulmányozott szakirodalommal analóg módon építettem fel [7]. Az elektrofermentációs cellát két laborüvegből készítettem el, melyek egyenként 250 ml-esek voltak, ezeket hengeres üveg csatlakozási pontjaikon kapcsoltam össze. Az 3.1-es ábra mutatja a szerkezetét:



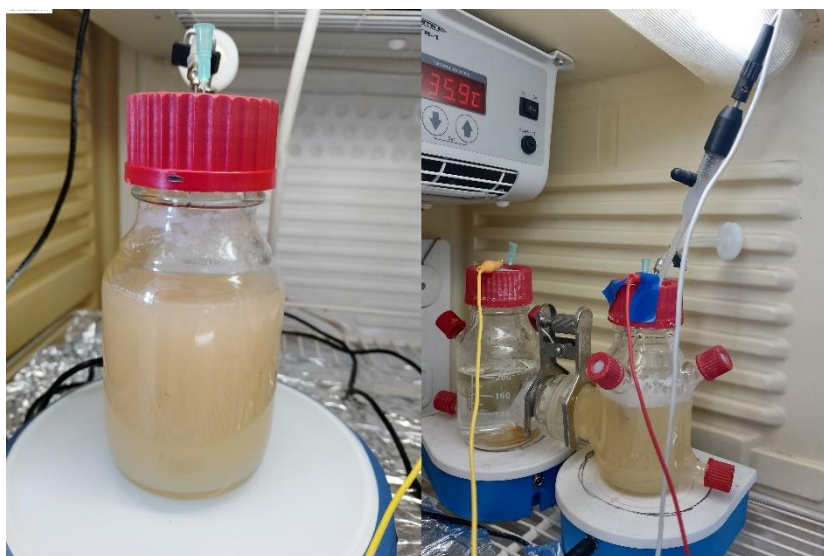
3.1 ábra: A mérés elektrofermentációs rendszere

Ezen kívül kialakítottam egy referencia cellát, mely egy 250 ml-es laborüvegből állt, amiben a hagyományos fermentáció párhuzamosan játszódott le azonos körülmények közt az elektrofermentációval. Mind a két rendszer kupakja szeptummal volt ellátva, így egy steril tű segítségével egy 0,22 μm -es szűrővel ellátott nyomásleengedő csövet helyeztem rájuk. A kétcellás rendszerben az anód egy platinázott titánháló volt, míg a katód, mely esetemben a munkaelektrod, 2x2 cm-es szénszövet, melyet titándróttal függesztettem. Az anódtérben ezen felül elhelyeztem egy Ag/AgCl referenciaelektrodot is, mely telített KCl-el volt töltve (SE11, Meinsberg Sensortechnik GmbH), valamint tartalmazott még egy nyomáskiegyenlítő szelepet is. A két reaktortér közé egy kationcserélő (Fumasep FKE, 3,6 cm átmérő) membránt helyeztem, hogy a katódtérben elhelyezkedő tápoldat ne keveredjen az anódtérbe helyezett pufferrel. A membránaktiváláshoz 1 mólos NaOH és HCl oldatokat használtam. Két ciklusban 24 órára lúgba, majd 24 órára savba helyeztem a membránt.

Beüzemeltetésük előtt a reaktorokat, az ezekbe helyezendő oldatokat, az elektródokat és autoklávozható részüket 20 percen át 120 °C-on sterilizáltam. A membrán sterilizálásához tízszeresen hígított hipóban áztattam 1 percen át, aztán steril desztillált vízzel mostam le, ez az egész folyamatot lamináris box alatt végeztem. Ezzel az eljárással sterilizáltam a referencia

elektrodot is. Érdeemes megjegyezni, hogy a sterilizációhoz a tápoldatot nem kész formájában helyeztem az autoklávba, hanem a glükóz tartalmát egy külön oldatban készítettem el, így külön tudtam sterilizálni. Ezt azért így módon végeztem, mert, ha ammónium, vagy nitrát tartalmú tápoldatot glükózzal együtt emelünk 120 °C-ra, akkor ezek a komponensek reakcióba léphetnek, termékeik pedig sejtek növekedését gátolják.

A fermentációs rendszert folyamatosan 37 °C-on tartottam egy biotermosz segítségével. Mind a referencia, mind az elektrofermentációs reaktorokba mágneses keverőt helyeztem, mellyel 100 rpm-mel kevertem, hogy biztosítsam az egyenletes koncentrációeloszlást belsejükben. A kész rendszereim a következő, 3.2-es ábrán láthatóak:



3.2. ábra: Öszeállított fermentorok

3.3. Mérési módszerek

3.3.1. Töltésátvitel követése

Két elektródpotenciálon vizsgáltam az elektrofermentáció lejátszódását, -0,8 V-on és -1,2 V-on (Ag/AgCl referencia elektródhoz képest). Ahhoz, hogy mérni tudjam a munkaelektrodról átvitt töltések számát, a teljes elektrofermentáció alatt kronoamperometriás görbéket rögzítettem egy potenciosztát (PalmSens 3) segítségével és PsTrace 5.8 szoftver használatával.

3.3.2. Fermentációs termékek nyomonkövetése

A fermentációk során előállított termékek mérésére YL9100 típusú HPLC-t alkalmaztam, melyben egy Aminex HPX-87H oszlopot használtam, melynek hőmérsékletét 35 °C-ra

állítottam be. A mozgófázishoz használt eluens 5 mM-os kénsav oldat volt, az áramlási sebesség 5 ml/min volt.

A mérések megkezdése előtt szükségem volt kalibrációs sorokra, melyekkel kiértékelhettem a mintáim glükóz és etanol tartalmát. Ezeket 0,1 g/l, 1 g/l és 10 g/l koncentrációban készítettem el, ezeket lemérve készítettem kalibrációs görbét.

Mivel a hagyományos és az elektrofermentáció párhuzamosan futott, ezért közel ugyanakkor vizsgáltam őket. A referenciareaktorból lamináris boxban, steril körülmények közt vettem mintát, ehhez steril hegyekkel, automata pipettát használva a reaktor közepéből pipettáztam ki a tápoldatból 500 µl-t, míg az elektrofermentációs reaktorból steril fecskendővel, az egyik szeptumos csonkon át vettem mintát.

Mérésük előtt a levett fermentleveket HPLC tisztaságú vízzel tízszeresére hígítottam, majd egy fecskendőbe felszívva a híg oldatot az arra helyezett steril 0.22 mikronos szűrőn átnyomva leszűrtem, hogy megszabaduljak a sejttömegtől. Manuális injektálással 100 µl-t juttattam a műszerbe a 30 µl-es hurok háromszori átöblítése után. A glükózt és az etanolt is a törésmutató detektor jelén láttam.

3.4. Kiértékelés

A fermentációs folyamatok hatékonyságának megadására gyakori jelzők a hozam, a konverzió, a produktivitás és a szelektivitás. A hozam megadja, hogy a rendszerben szintetizált anyag mólszáma hogyan aránylik a kezdeti szubsztrát mólszámával:

$$\eta_P = \frac{n_P - n_{P_0}}{\eta_{S_0}} * \left(\frac{v_S}{v_P} \right)$$

- n: mólszám
- v: sztöchiometria együttható
- S: szubsztrát
- P: termék

A konverzió a fellépő reakciók során átalakult szubsztrát móljainak számát arányosítja a kiindulási mólszámmal:

$$X_S = \frac{n_{S_0} - n_S}{n_{S_0}}$$

- n: mólszám
- S: szubsztrát

A produktivitás egy időegység alatt a reaktor hasznos térfogatából előállított termék. Megadható tömegre és mólszámmra is, én az utóbbit használtam:

$$Pr = \frac{n}{V * t}$$

- n: mólszám
- V: reaktor hasznos térfogata
- t: idő

Végül a szelektivitás arányosítja a szintetizált mólok számát a konvertált mólok számával, tehát egy jelzője a melléktermék keletkezésnek:

$$\sigma_P = \frac{n_P - n_{P_0}}{n_{S_0} - n_S} * \left(\frac{v_S}{v_P} \right)$$

- n: mólszám
- v: sztöchiometriai együttható
- S: szubsztrát
- P: termék

3.5. A mérés menete

A mérés megkezdése előtt sterilizáltam a reaktoraim, valamint az oldataim, ez után pedig összeállítottam a rendszereket és feltöltöttem őket. Elhelyeztem az elektródokat és csatlakoztattam a fermentáció során folyamatosan mérő analitikai eszközöket, végül pedig beállítottam a biotermosztátot.

A mérést magát két alkalommal végeztem el, különböző elektródpotenciált alkalmazva. Ettől eltekintve a mérések minden tulajdonsága és a rendszerek környezete teljes mértékben megegyezett, a hagyományos fermentáció is egy időben futott az elektrofermentációval az esetleges különbségek elkerülése érdekében.

Az első mérést -0,8 V elektródpotenciállal végeztem, mintavételezési időtartama technikai okok miatt összesen 27 óra volt. A második mérést -1,2 V elektródpotenciálon futtattam, összesen 75 órán át. Ezt a kísérletet addig végeztem, amíg az etanoltermelés mindkét rendszerben szignifikánsan lelassult. A mintavételeket az első mérés során kétóránként, a

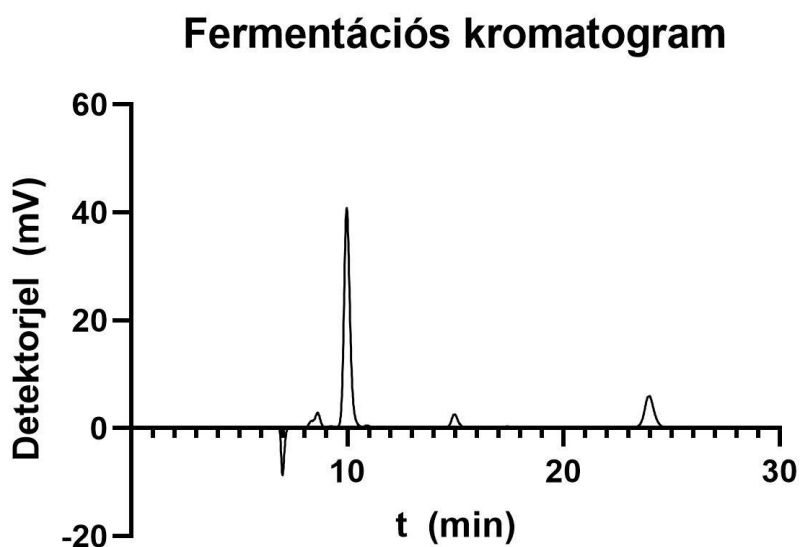
másodiknál óránként vettem, leszámítva a folyamatok végén, ahol a mintavételeket ritkábban végeztem. A fermentáció hossza miatt jelentős időintervallumokat kihagytam, ezek azonban nem befolyásolják a kapott eredményeim hitelességét.

4. Eredmények

4.1. Etanol termelés különböző elektródpotenciálokon

4.1.1. Mérések -0,8 V elektródpotenciál értéken

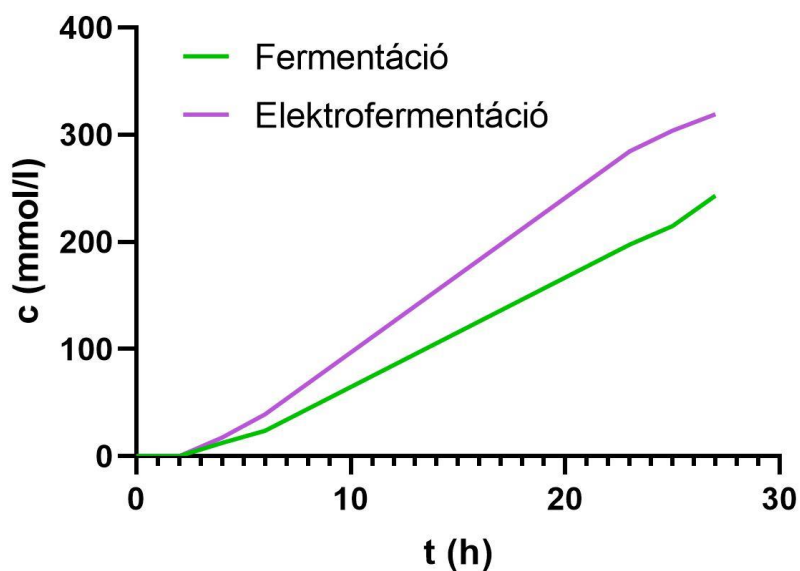
A mérések során kapott kromatogramok a 4.1-es ábra szerinti lefutásúak voltak.



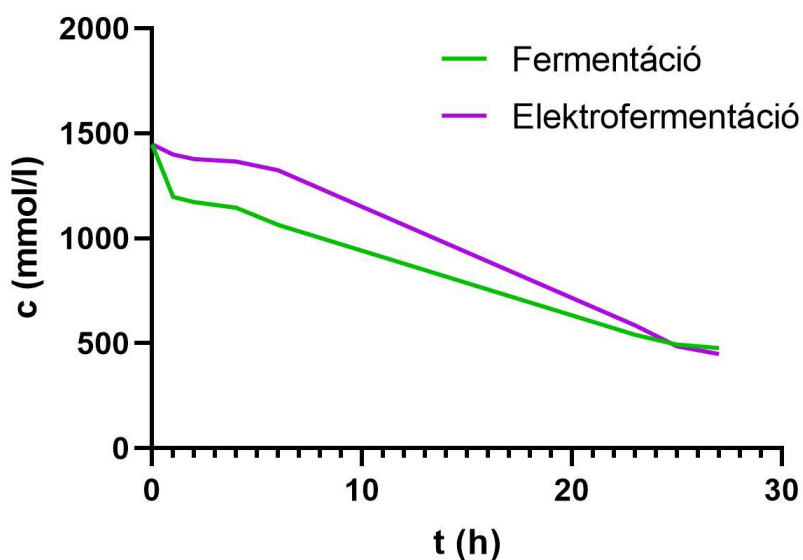
4.1. ábra: Fermentációs kromatogram (-0,8 V, 27. h)

A kirajzolt jel a HPLC törésmutató detektora által begyűjtött adatokból áll össze. A 10. perc körül látható a glükóz csúcsa, és nagyjából a 24. percnél jelenik meg az etanolé. A kettő között 15 percnél jelenik meg a folyamat mellékterméke, a glicerín.

Az ezek kiértékelésével kapott adatokból készítettem összefoglaló ábrákat (4.2-es és 4.3-as ábra), melyeken tisztán látható a folyamat során a koncentrációk változása:



4.2 ábra: -0,8 V-os mérés etanol koncentráció változása



4.3 ábra: -0,8 V-os mérés glükóz koncentráció változása

Ezekon jól látható, hogy egy kezdeti lag-fázist követően az etanoltermelés a két fajta fermentáció közt jelentős mértékben eltért. Maga a kezdeti lag-fázis, mely során a mikrobák a környezetükhöz alkalmazkodnak és szaporodnak az elektrofermentáció esetében csak kis mértékben rövidül, azonban az első néhány óra után az elektrofermentáció etanolkoncentráció növekedése elkezdett jelentősen eltérni a hagyományostól. Elmondhatjuk, hogy a mért adatok alapján átlagosan másfélszer nagyobb etanolkoncentrációt produkált az elektrofermentáció a mérés végéig. A glükóz koncentráció változás pedig azt mutatja, hogy bár az etanol

koncentráció magasabb az elektrofermentáció esetében, a glükóz kevésbé fogy, ez indikátora a glicerín termelődés csökkenésének.

Az eredményeket négy alapvető mutatóval jellemeztem, a hozammal, a produktivitással, a konverzióval és a szelektivitással, melyeket az 4.1-es táblázatban foglaltam össze:

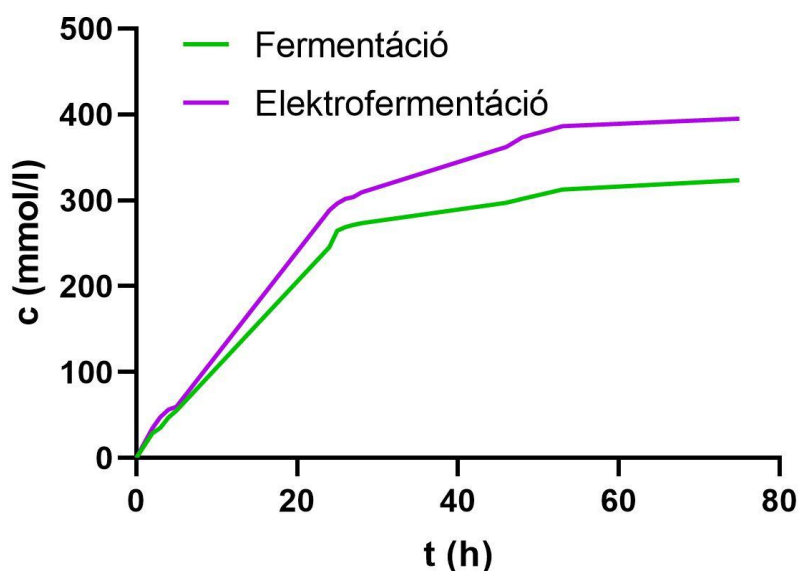
4.1 táblázat: -0,8 V-os mérés hatékonyság jelzői

	Fermentáció	Elektrofermentáció
Hozam	36,5 %	47,9 %
Produktivitás	9,0 mmol/l*h	11,8 mmol/l*h
Konverzió	67 %	69 %
Szelektivitás	12,5 %	15,9 %

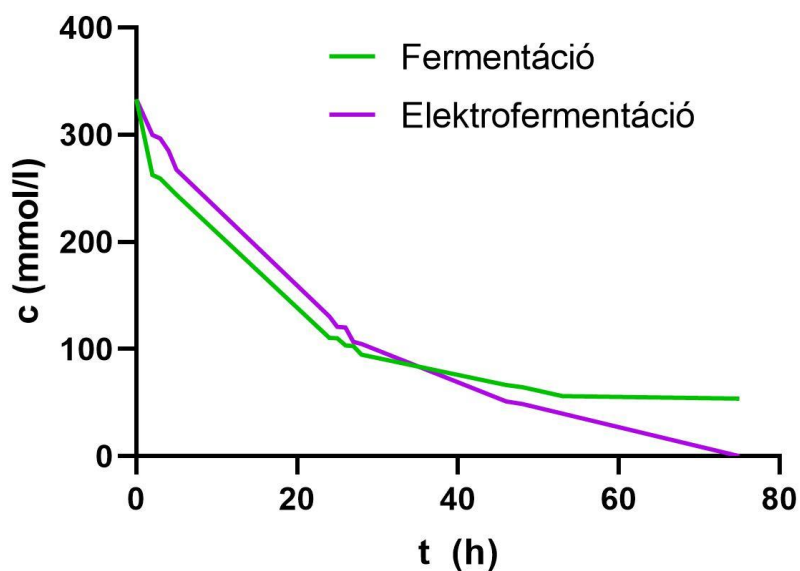
Azt láthatjuk, hogy a konverzió a folyamat végpontjánál mindössze 2%-kal nagyobb az elektrofermentáció esetében, a produktivitás, szelektivitás és a hozam pedig nagyjából 1,3-szorosa a hagyományos fermentációnak. Ez is példája, hogy egy részlegesen lejátszódott folyamat esetén is előnyt biztosít az elektrofermentáció alkalmazása.

4.1.2. Mérések -1,2 V elektródpotenciál értéken

A koncentrációváltozások egyszerű követése érdekében pedig ismét ábrákat készítettem (4.4-es és 4.5-ös):



4.4 ábra: -1,2 V-os mérés etanol koncentráció változása



4.5 ábra: -1,2 V-os mérés glükóz koncentráció változása

Az értékeket a két fajta fermentáció közt összehasonlítva azt láthatjuk, hogy átlagosan 1,2-szerese az elektrofermentáció során keletkezett etanol koncentrációja a hagyományoséhoz képest. A lag fázis az előbbiben rövidebbnek bizonyult, a koncentrációkülönbség pedig a 46-48. órára érte el a maximumát. A folyamatra ismét elmondható, hogy alacsonyabb szubsztrát felhasználáshoz nagyobb produktum gyártás párosul.

Kiszámolva a már említett mérőszámokat, a következő adatokat kaptam (4.2-es táblázat):

4.2 táblázat: -1,2 V-os mérés hatékonyság jelzői

	Fermentáció	Elektrofermentáció
Hozam	40,4%	45,6 %
Produktivitás	21,7%	24,3 mmol/l*h
Konverzió	69,1%	67,9 %
Szelektivitás	58,9%	67,2 %

Megfigyelhető, hogy az elektrofermentáció kedvezőbb eredményeket mutatott a hozam 1,2-szer nagyobb volt, hasonlóképpen a produktivitáshoz. A szelektivitás az egyetlen közeli érték, amely pusztán 1,4%-kal nagyobb.

4.2. Fermentációs kinetika vizsgálata a módosított Gompertz modellel

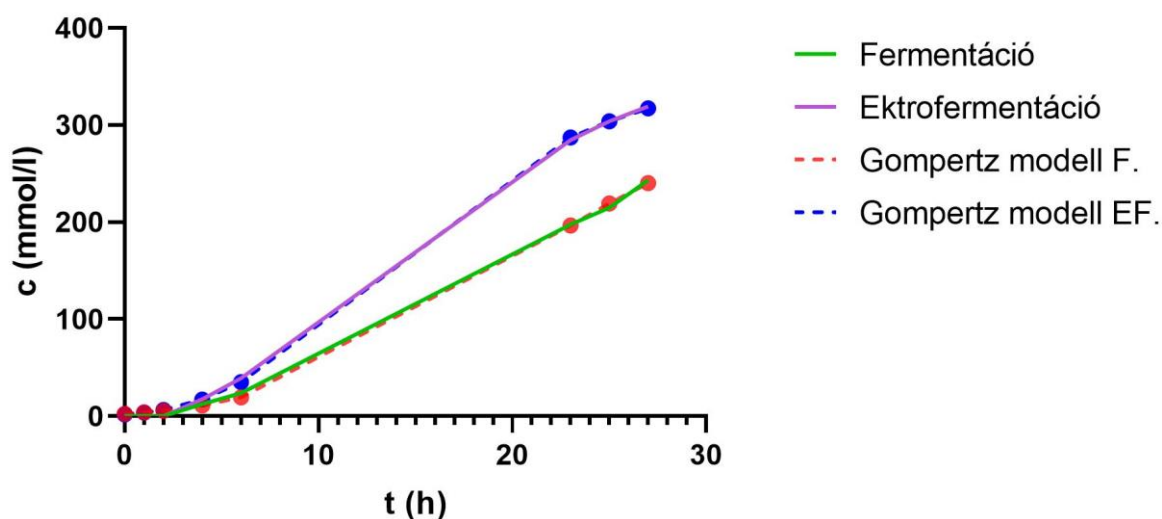
A kapott eredményeim kinetikai értékelése érdekében a módosított Gompertz modellt alkalmazva vizsgáltam meg az elektródpotenciál hatását az etanolfermentáció lefutására. Ez a modell az egyik leggyakrabban alkalmazott a tudomány sok területén a sejtnövekedéstől kezdve, egészen akár a bioreaktorok termelésének kinetikai elemzésében [13]. A szakirodalomban a függvény számos alakja megtalálható, az általam végzett kísérletben az etanolkoncentráció növekedésének jellemzéséhez az alábbi formát alkalmaztam:

$$c(t) = c_{max} * \exp(-\exp(\frac{r_{max}}{c_{max}}) * (t_L - t) + 1))$$

- c_{max} : maximális elérhető termék koncentráció
- r_{max} : maximális termelődési sebesség
- t_L : lag-fázis ideje

4.2.1. -0,8 V-os elektrofermentáció kinetikai viselkedése

Felhasználva a fentebb látható egyenletet és az Excel program Solver funkcióját a Gompertz modellel kielemezve az adatokat ráillesztettem a következő modell görbét a méréshez tartozó koncentráció-idő ábrára (4.6-os):



4.6 ábra: -0,8 V-os mérés Gompertz modell illesztése

Ezen felül pedig a következő adatokat kaptam a változókra (4.3-as táblázat):

4.3 táblázat: -0,8 V-os mérés Gompertz moell kinetikai változói

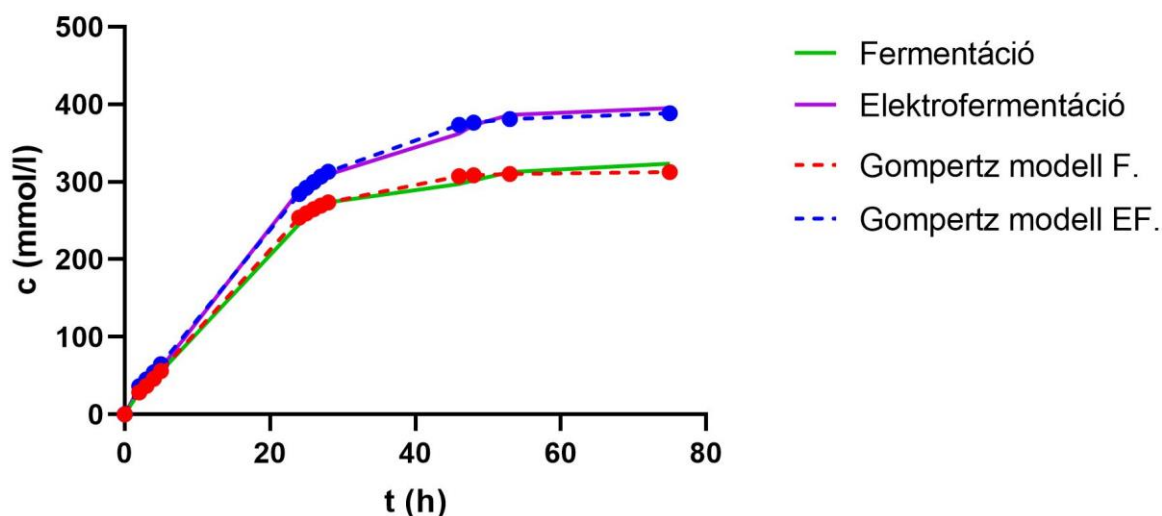
	$P_{\max}$ (mmol/L)	$r_{\max}$ (mmol/L*h)	t_L (h)
Fermentáció	387,1	33,8	7,1
Elektrofermentáció	364,5	48,9	4,9

Látható, hogy a modell szerint a maximálisan elérhető koncentráció a hagyományos fermentáció esetében 387,1 mmol/l, azonban a kísérletben 243,1 mmol/l volt a maximális koncentráció. Az eltérés az oka az, hogy a fermentáció nem játszódott teljes mértékben a mintavételezések végéig. A termelés becsült maximális sebessége 33,8 mmol/l*h, a lag-fázis ideje pedig a modell alapján hozzávetőlegesen 7 óra volt.

Az elektrofermentáció esetében a maximális koncentráció a modell szerint 364,5 mmol/l, míg a kísérlet utolsó mért pontjánál 319,1 mmol/l volt, így a modellel becsült érték megalapozottnak tűnik. A becsült maximális termelési sebesség az elektrofermentációnál 48,9 mmol/l*h, a lag-fázis ideje pedig 4,9 óra a modell alapján, ebből is levonható a következtetés, hogy az elektrofermentáció pozitívan befolyásolta a fermentáció kinetikáját.

4.2.2. -1,2 V-os elektrofermentáció kinetikai viselkedése

Az előző elektródpotenciális esettel analóg módon ismét alkalmaztam a módosított Gompertz modellt, mely a 4.7-es ábrán látható:



4.7 ábra: -1,2 V-os mérés Gompertz modell illeszkedése

A változók pedig az alábbiak lettek (4.4-es táblázat):

4.4 táblázat: -1,2 V-os mérés Gompertz moell kinetikai változói

	P_{max} (mmol/L)	r_{max} (mmol/L*h)	t_L (h)
Fermentáció	313,0	34,6	0,85
Elektrofermentáció	389,7	35,7	0,48

A modell szerint a maximális elérhető koncentráció a hagyományos fermentáció esetében 313,0 mmol/l. A becsült maximális termelési sebesség 34,6 mmol/l*h, míg a lag-fázis 0,85 óra.

Az elektrofermentáció esetén a modell a maximális elérhető koncentráció esetén minimális eltérést mutat. A becsült érték 389,7 mmol/l, a maximális termelési sebesség 35,7 mmol/l*h, a lag-fázis pedig 0,48 óra.

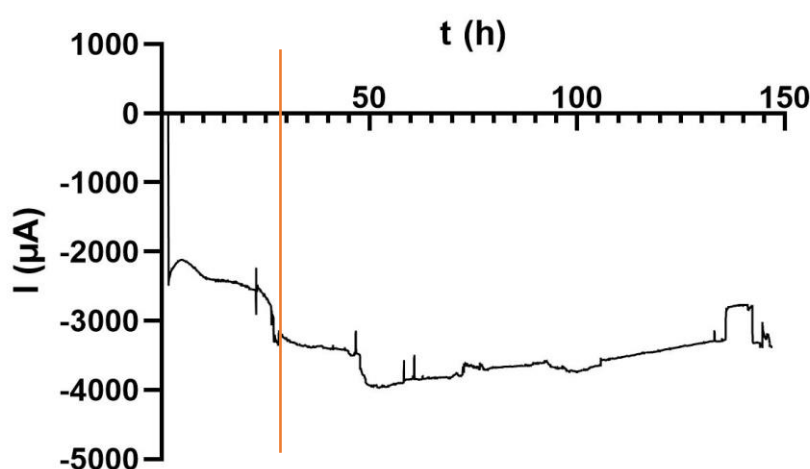
A modell illeszkedése a több mérési pontra helyesebben reprezentálja a valóságot, azonban a következő mérések során a fermentáció lineáris szakaszában is célszerű több mintavételezést beiktatni.

4.3. Töltéshasznosítás vizsgálata elektrofermentációnál

Az elektrofermentáció során mindkét potenciál esetében mértem az áramerősség időbeli változását annak érdekében, hogy meghatározhassam a munkaelektódról átadott – és várhatóan a sejtek metabolikus folyamataiban hasznosult – elektronok számát.

4.3.1. -0,8 V-os elektrofermentáció

Az áramerősség időbeli változása -0,8 V potenciál esetén a 4.8-as ábrán látható összefoglalva:



4.8 ábra: -0,8 V-os mérés kronoamperometriás görbéje

A görbe felvételére hosszabb ideig került sor, mint a HPLC-s mérésekre, hisz míg azok csak 27 óráig tartottak (a függőleges vonal által jelölve), maga az elektrofermentáció és a kronoamperometriás mérés több mint 140 óráig futott. Jól látható a görbe alakjából, hogy a folyamat első felében egyre több töltést adott át, majd egy pont után az átadott töltések száma elkezdett csökkenni. Ez annak a jele, hogy a kísérlet elején a mikrobák még szaporodtak, egyre több elektronra volt szükség, hogy a fermentáció lejártsódhasson, de egy pont után a szaporodás megállt, a glükóz pedig elkezdett fogyni, így a csökkenő etanoltermelés miatt a töltés igény is csökkenni kezdett.

A kapott adatokat a legkisebb négyzetek módszere segítségével integráltam, mellyel kaptam egy amper-szekundum adatot, mely a töltés, azaz a coulomb. Mivel tudjuk, hogy 1 mol etanol fermentációjához 4 mol elektron kell (lásd 4. ábra), ezért kiszámolhatjuk a Faraday-állandó segítségével (ami megadja 1 mol elektron töltésszámát) az átadott elektronok mólszámát, melyből aztán megadható, hogy a töltések hány százaléka vett részt az etanol fermentációjában:

- Faraday-állandó: 96485,3321 C/mol
- A 27.óraig kiintegrálva az átadott töltések száma: 221,3227 C
- **Átadott elektronok mólszáma:**

$$96485,3321 \text{ C} \rightarrow 1 \text{ mol elektron}$$

$$221,3227 \text{ C} \rightarrow x \text{ mol elektron}$$

$$x = \mathbf{0,0023 \text{ mol elektron}}$$

- Elektrofermentáció során termelt többlet a fermentációhoz képest: 0,0175 mol
- **Szükséges elektronok száma:**

$$4 \text{ mol elektron} \rightarrow 1 \text{ mol EtOH}$$

$$x \text{ mol elektron} \rightarrow 0,0175 \text{ mol EtOH}$$

$$x = \mathbf{0,0699 \text{ mol elektron}}$$

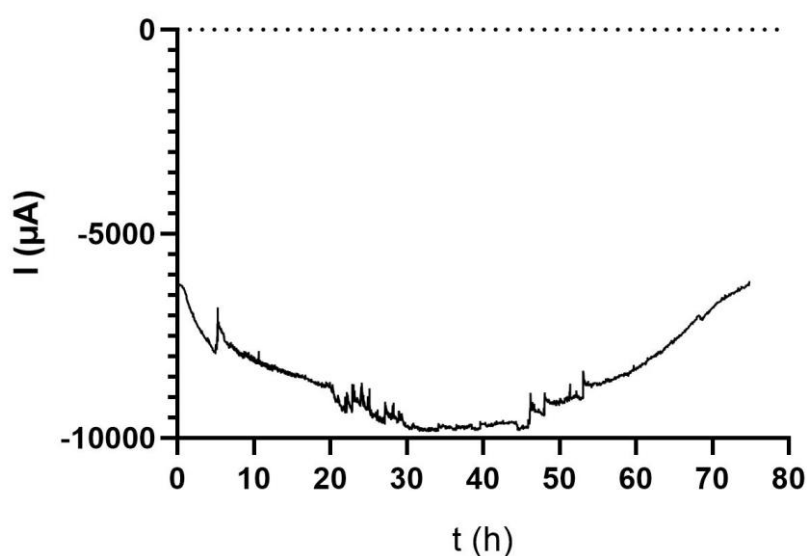
- **Átadott és felhasznált töltés aránya százalékosan:**

$$\frac{0,0023}{0,0699} * 100 = \mathbf{3,3\%}$$

Tehát az rendszer által biztosított elektronokból mindössze 3,3% került felhasználásra az etanol fermentációja során. A többi feltehetően a sejtek más folyamataihoz lettek felhasználva, esetlegesen a melléktermékek képződésében is részt vehettek.

4.3.2. -1,2 V-os elektrofermentáció

Az áramerősség változása a fermentáció alatt az alábbi 4.9-es ábrán látható:



4.9 ábra: -1,2 V-os mérés kronoamperometriás görbéje

Egy enyhén „u alakú” görbe látható, mely arra utal, hogy egy bizonyos pontig a töltések száma, melyek a sejtekbe jutottak az elektródról, növekedett, majd lecsökkent. Ennek magyarázata a sejtömeg növekedése/termékképzése lehet, ami valamely külső tényező elfogyása miatt (tápanyag, hely, stb.) leállt, így kevesebb töltésre volt szükség, különösen akkor, amikor elkezdett fogyni a szubsztrát és egyre kevesebb sejt alakított át glükózt etanollá. A görbe nagyjából 30 és 40 óra közt kezdett el visszafordulni, az átadott töltések száma itt volt a maximális. Ez korrelál a HPLC által mért adatokkal, hisz ott ebben az időszakban kezdett hanyatlani az etanolkoncentráció-idő görbe.

Az előző számolással megegyező módon a következőket kaptam a mért adatokból:

- A 27.óraig kiintegrálva az átadott töltések száma: 2303,1726 C

- **Átadott elektronok mólszáma:**

$$96485,3321 \text{ C} \rightarrow 1 \text{ mol elektron}$$

$$2303,1726 \text{ C} \rightarrow x \text{ mol elektron}$$

$$x = \mathbf{0,02387 \text{ mol elektron}}$$

- Elektrofermentáció során termelt többlet a fermentációhoz képest: 0,01647 mol
- **Szükséges elektronok száma:**

$$4 \text{ mol elektron} \rightarrow 1 \text{ mol EtOH}$$

$$x \text{ mol elektron} \rightarrow 0,01647 \text{ mol EtOH}$$

$$x = \mathbf{0,06590 \text{ mol elektron}}$$

- **Átadott és felhasznált töltés aránya százalékosan:**

$$\frac{0,023871}{0,065899718} * 100 = \mathbf{36,2\%}$$

Szóval ebben az esetben a teljes folyamat alatt az elektronok 36,2%-a lett hasznosítva az etanol előállítására.

Előzőleg már megállapítottam, hogy az elektrofermentáció jelentős mértékben növeli a szelektivitást. A fő melléktermék az eljárás során a glicerín, mely képződésének oka a redoxegyensúly fenntartása (NADH visszaalakítása NAD^+ -á), valamint az ozmotikus stressz kiküszöbölése. Az elektrofermentáció során ennek képződése csökken, ezért fordítódnak nagyobb arányban a rendszernek szolgáltatott elektronok az etanoltermelésre. Ebből tehát belátható, hogy a potenciál növelésével egyre jelentősebb etanol hozam-növelés érhető el, amit a szakirodalom is alátámaszt [11].

A glicerín koncentrációját a mérések után meg is mértem, az eredményeim pedig a 4.5-ös táblázatban össze is foglaltam:

4.5 táblázat: Glicerín koncentrációk

Alkalmazott potenciál	Fermentációs koncentráció	Elektrofermentációs koncentráció
-0,8	1,63 mmol/l	1,52 mmol/l
-1,2	2,88 mmol/l	1,69 mmol/l

Látható, hogy nagyobb elektródpotenciál esetén sokkal nagyobb fokú csökkenést tapasztalhatunk a keletkező glicerín koncentrációjában.

5. Összefoglalás

A kísérletem célja az volt, hogy megvizsgáljam, milyen különbségek figyelhetők meg a hagyományos és az elektrofermentáció között egy rendszerben, mely *Saccharomyces cerevisiae* mikroba alkalmazásával állít elő etanolt glükózból. A vizsgálat során sikeresen bebizonyítottam, hogy az elektrofermentáció számos előnnyel jár a hagyományos párjával szemben. Nagyobbnak bizonyult a hozam, konverzió, produktivitás, ezen felül pedig rövidebb lett a lefutási idő és nagyobb szelektivitás.

Mind a két fajta fermentáció során glicerín keletkezett melléktermékként, azonban az eredmények alapján az elektrofermentáció kiváló módszer ennek termelődésének visszaszorítására. Az is elmondható, ha összehasonlítjuk a két elektródpotenciált amit alkalmaztam, hogy a magasabb érték esetén jelentősen kevesebb termelődik, utalva arra, hogy a potenciálnöveléssel a szelektivitás drasztikusan növelhető.

Az eredmények alapján elmondható, hogy az elektrofermentáció további kutatásával érdemes foglalkozni, alkalmazása számos előnnyel jár. A jövőben érdemes lehet vizsgálni az optimális elektródpotenciált, illetve a léptéknövelés lehetőségét is.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Koók László témavezetőmnek, aki szakértelme, türelme és fáradhatatlan munkája nélkül nem valósulhatott volna meg a kutatás.

Hálával tartozom még Hülberné Beyer Éva Annának, aki ellátott szakmai tanácsokkal és segítséggel a fermentációk megvalósításához.

Szeretném megköszönni a segítséget Nagy Kristóf Bencének, aki a kutatás során végig támogatott és ahol csak tudta a segítségét nyújtotta.

Végül de nem utolsó sorban hálás vagyok a Pannon Egyetemért Alapítvány felé, hogy ösztöndíjukkal támogatták a kutatási témám.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Keller, M. (2021, March 5). Alcohol and society. Encyclopædia Britannica. Retrieved April 18, 2022, from <https://www.britannica.com/topic/alcohol-consumption/Alcohol-and-society>
- [2] U.S. Energy Information Administration - EIA - independent statistics and analysis. Use of ethanol - U.S. Energy Information Administration (EIA). (n.d.). Retrieved April 19, 2022, from <https://www.eia.gov/energyexplained/biofuels/use-and-supply-of-ethanol.php>
- [3] Encyclopædia Britannica, inc. (n.d.). Ethanol. Encyclopædia Britannica. Retrieved April 18, 2022, from <https://www.britannica.com/science/ethanol>
- [4] Ayaou Basil, et al. Ethanol Production by Catalytic Hydration of Ethylene, 2019
- [5] Godbey, W. T. (2021). Chapter 16 - Fermentation, beer, and biofuels. In *Biotechnology and its applications* (second edition) (pp. 369–387). essay, Academic Press.
- [6] Liu, S. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 83(2), 115–131. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00366-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00366-5)
- [7] Rabaey, K., & Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis — revisiting the electrical route for Microbial Production. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10), 706–716. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2422>
- [8] Chu, N., Liang, Q., Jiang, Y., & Zeng, R. J. (2020). Microbial electrochemical platform for the production of renewable fuels and chemicals. *Biosensors and Bioelectronics*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111922>
- [9] Gong, Z., Yu, H., Zhang, J., Li, F., & Song, H. (2020). Microbial electro-fermentation for synthesis of chemicals and biofuels driven by bi-directional extracellular electron transfer. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(4), 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.08.004>
- [10] Joshi, J., Dhungana, P., Prajapati, B., Maharjan, R., Poudyal, P., Yadav, M., Mainali, M., Yadav, A. P., Bhattarai, T., & Sreerama, L. (2019). Enhancement of ethanol production in electrochemical cell by *saccharomyces cerevisiae* (CDBT2) and *Wickerhamomyces Anomalous* (CDBT7). *Frontiers in Energy Research*, 7. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00070>
- [11] Mathew, A. S., Wang, J., Luo, J., & Yau, S.-T. (2015). Enhanced ethanol production via electrostatically accelerated fermentation of glucose using *saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep15713>
- [12] Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(6), 627–642. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0229-x>
- [13] Tjørve, K. M., & Tjørve, E. (2017). The use of Gompertz models in growth analyses, and New Gompertz-Model Approach: An addition to the unified-richards family. *PLOS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178691>