

B 3540



**FOLYAMATOS ECETSAV TERMELÉS RÖGZÍTETT MIKROORGANIZMUSOKKAL  
ÖSSZETETT RENDSZERBEN**

**DOKTORI (PhD) TÉZISEK**

**Készítette: KRISCH JUDIT**

**Témavezető: DR. SZAJÁNI BÉLA**

**JÓZSEF ATTILA TUDOMÁNYEGYETEM**

**BIOKÉMIAI TANSZÉK**

**SZEGED**

**1997**

## I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az utóbbi évtizedekben elterjedt a rögzített biokatalizátorok alkalmazása, melyek lehetnek enzimek, sejtek vagy sejtalkotórészek. Leginkább a szilárd hordozóhoz kötött enzimek felhasználása fejlődött, de egyre nagyobb területen kapnak szerepet a rögzített sejtek, elsősorban a többenzimes, többlépcsős folyamatokban. A rögzített sejtekkel kapcsolatos szakirodalom terjedelme egyre nő és számos félipari, ipari eljárásban kerül sor hasznosításukra.

A sejtrögzítés történhet kémiai és fizikai módszerekkel. Fizikai módszer a bezárás gélek, szálak üregeibe, az adszorpció porózus hordozókra. Kémiai módszer a kovalens vagy ionos kötésekön keresztüli rögzítés. Egész, élő sejtek rögzítésére a kémiai módszerek toxikus volta miatt a fizikai módszereket részesítik előnyben. Elsősorban mikroorganizmusokat használnak rögzített sejt formában, de találhatunk példát növényi és állati sejtek rögzítésére is. Az élő sejtek rögzítése leggyakrabban gélbezárással illetve adszorpcióval történik. A rögzítés gyakran megváltoztatja a sejtek tulajdonságait.

Célkitűzéseink a következők voltak:

1. Egy hazai fejlesztésű és előállítású új hordozó, az előformált cellulóz gyöngy tulajdonságainak, a mikroorganizmusok rögzítéséhez való felhasználhatóságának vizsgálata.
2. A tápoldatban szabadon lebegő, illetve alginát gélbe zárt és cellulóz gyöngyre adszorbeáltatott mikroorganizmusok tulajdonságainak vizsgálata és összehasonlítása.
3. Szakaszos és folyamatos etanol fermentáció megvalósítása cellulóz gyöngyre rögzített élesztősejtekkel.

3. Szakaszos és folyamatos etanol fermentáció megvalósítása cellulóz gyöngyre rögzített élesztősejtekkel.
4. Ecetsav termelés cellulóz gyöngyre adszorbeáltatott *Acetobacter aceti* sejtekkel szakaszos és folyamatos működésű rendszerben.
5. A rögzített mikroorganizmusokkal végzett folyamatos etanol és ecetsav termelés összekapcsolása integrált rendszerben, a rendszer jellemzése.

## II. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### II. 1. A kísérletekben vizsgált mikroorganizmusok

*Saccharomyces cerevisiae* var. *Dicsőszentmáton*, *Saccharomyces cerevisiae* SC1, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2044, *Saccharomyces diastaticus*, *Acetobacter aceti*.

II.2. A sejtögzítést Ca-alginát gélbe zárással illetve előformált cellulóz gyöngyökre történő adszorpcióval végeztük.

II. 3. Az élesztősejtek növekedéséhez és az etanol fermentációhoz szükséges tápoldatokat Wada és mtsi (1979) leírása alapján állítottuk össze. Az ecetsavbaktériumok növekedéséhez és az ecetsav temeléshez szükséges tápoldatokat Mori (1985) szerint készítettük el.

### II. 4. A kísérleti programban alkalmazott fontosabb vizsgálati módszerek

Az etanol koncentrációt gázkromatográfiával, az ecetsav koncentrációt titrálással határoztuk meg. A cukor koncentrációt anthron reagenssel mértük. A sejtszámot az optikai denzitás mérésével illetve közvetlen sejtszámolással határoztuk meg.

Mori, A. (1985): Production of vinegar by immobilized cells. *Process Biochemistry* 67-74.

Wada, M., Kato, J. and Chibata, I. (1979): A new immobilization of microbial cells. Immobilized growing cells using carrageenan gel and their properties. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8, 241-247.

### III. EREDMÉNYEK

Az értekezésben rögzített mikroorganizmusokkal végzett etanol és ecetsav termelést, a két folyamat egy rendszerbe történő összekapcsolását és a rögzített mikroorganizmusok tulajdonságait mutattuk be.

1. Megállapítottuk, hogy az előformált cellulóz gyöngyök felhasználhatók sejtrögzítésre. Közvetlen sejt számlálással, sejtszársúly méréssel és pásztázó elektronmikroszkópos felvételek segítségével bebizonyítottuk, hogy a mikroorganizmusok megtapadnak a cellulóz gyöngy külső felszínén és a makropórusok falán és ott szaporodnak, telepeket illetve biofilmet alkotva.

Megállapítottuk az etanol cellulóz gyöngyben mért effektív diffúziós együtthatóját, amely  $2.72 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ -nak adódott.

2. Összehasonlítottuk a szuszpenzióban lévő szabad sejtek, a gélbezárt és adszorbeált sejtek néhány tulajdonságát. Megállapítottuk, hogy rögzítés hatására a *Saccharomyces cerevisiae* és *Acetobacter acetii* sejtek szaporodási rátája csökken. A rögzítés védelmet nyújt az etanol és ecetsav toxikus hatása ellen mind a fiatal, szaporodó, mind a stationer fázisban lévő sejteknek. Rövid távú etanol és ecetsav kezelés hatására a szabad sejtekre halálos koncentrációnál a rögzített sejtek nagy része megőrizte életképességét.

Az etanol fermentáció hőmérséklet optimuma szabad sejtek esetében  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , a gélbezárt sejteknél kiszélesedik, míg adszorbeált sejteknél a szabad sejtekéhez hasonló lefutást mutat.

Az ecetsav termelés hőmérséklet optimuma rögzítés esetén az alacsonyabb értékek felé szélesedik, a magasabb értékek felé csökken, valószínűleg az oldott oxigén rosszabb hozzáférhetősége miatt.

Az etanol termelés pH optimuma szabad sejtekre nézve pH 4 körül van, míg gélbezárt sejteknél pH 3,0 és 6,0 között, adszorbeált sejteknél pH 3,5 és 6,0 között gyakorlatilag független a pH változásától.

Az ecetsav termelés pH optimuma szabad és adszorbeált sejtek esetében pH 5,3 körül van, gélbezárt sejteknél pH 5,3 és 6,2 közé esik. Meg kell jegyeznünk, hogy lúgos pH-n az alginát gyöngyök integritása csökken, ezért védő hatásukat nem tudják kifejteni.

3. A cellulóz gyöngyre adszorbeáltatott élesztősejteket sikeresen használtuk szakaszos és folyamatos etanol fermentációban. A folyamatos rendszerben a tanszéken kifejlesztett lyukacsos lemezekkel osztott terű oszlopreaktort használtuk.

4. Rögzített és szabad *Acetobacter aceti* sejtekkel ecetsavat termeltettünk szakaszos és folyamatos működésű rendszerben. Az elért maximális ecetsav koncentráció (31 -34 g/l) és az eléréséhez szükséges idő nem mutatott lényeges eltérést a szabad és rögzített sejteknél. A szakaszos fermentációt cellulóz gyöngyre adszorbeált ecetsavbaktérium sejtekkel végeztük levegőztetett tankreaktorban 48 vagy 72 óras ciklusidőkkel. A térfogati produktivitás 0.3-0.5 g/lh között változott.

Az adszorbeáltatott sejteket folyamatos rendszerben használva alacsonyabb ecetsav koncentrációt (7,5 g/l), de magasabb térfogati produktivitást (2,8 g/lh) kaptunk, mint a szakaszos fermentáció során.

5. Összekapcsoltuk az adszorbeált sejtekkel történő folyamatos etanol és ecetsav fermentációt. Három elrendezést állítottunk össze a két folyamat összekapcsolásához. A hígítási állandó növelésével, egy előlevegőztető egység beállításával, a levegőáram

sebességének növelésével és két, egymás után kapcsolt ecetsav termelő reaktor beállításával sikerült az ecetsav termelés térfogati produktivitását illetve a végtermékben mért ecetsav koncentrációját megnövelni. Elértük az ipari ecetsav- gyártás térfogati produktivitását (1,5 /gl/h).

Összefoglalva elért eredményeinket megállapíthatjuk, hogy a rögzítés védelmet nyújt a különböző káros környezeti hatások ellen. A cellulóz gyöngyre adszorbeáltatott élesztő és ecetsav-baktérium sejtek felhasználhatók szakaszos és folyamatos működésű fermentációs rendszerekben. Az adszorbeáltatott sejtekkel történő etanol és ecetsav termelés hatékonyan összekapcsolható egy rendszerbe.

#### IV. A DOLGOZAT TÉMÁJÁBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

##### Közlemények:

**J. Krisch**, Zs. Buzás, K. Dallmann, M. Tóth, I. Gimesi and B. Szajáni (1995) Application of preformed cellulose beads as a support in cell immobilization. *Biotechnology Techniques* 9:221-224

**J. Krisch** and B. Szajáni (1996) Effects of immobilization on biomass production and acetic acid fermentation of *Acetobacter aceti* as a function of temperature and pH. *Biotechnology Letters* 18: 393-396

B. Szajáni, Zs. Buzás, K. Dallmann; I. Gimesi, **J. Krisch**, M. Tóth (1996) Continuous production of ethanol using yeast cells immobilized in preformed cellulose beads. *Appl Microbiol Biotechnol* 46:122-125

**J. Krisch**, B. Szajáni (1997) Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. *Biotechnol Letters* 19:525-528

##### Szabadalmak:

Dr. Szajáni Béla, dr Cseri Zoltán, Gimesi István, Harsányi Ilona, Egresi Andrea, Takács Lajosné, **Krisch Judit**, dr. Buzás Zsuzsanna, dr. Dallmann Klára, Faragó Jenő: Eljárás biológiai anyagok adszorpciós rögzítésére cellulóz gyöngyökben  
szabadalom száma: 207 531

Dr. Szajáni Béla, dr Cseri Zoltán, Gimesi István, Harsányi Ilona, Egresi Andrea, Takács Lajosné, **Krisch Judit**, dr. Buzás Zsuzsanna, dr. Dallmann Klára, Faragó Jenő: Fermentációs eljárás új, szilárd fázisú biokatalizátorokkal  
szabadalom száma: 207 535



Posztterek és előadások:

**J. Krisch**, B. Szajáni (1995) A comparative study on free and immobilized *Acetobacter acetii* cells 2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, Szeged, Abstracts PA18

**Krisch Judit** és Szajáni Béla (1996) Bioacet előállításának lehetősége rögzített mikroorganizmusokkal. Műszaki Kémiai Napok 96, Veszpém, Összefoglalók 85.

**Krisch Judit** (1996) Összekapcsolt, folyamatos etanol és ecetsav termelés rögzített mikroorganizmusokkal. Doktoranduszok I. Országos Konferenciája, Debrecen, Összefoglalók, Ph.D.128

**J. Krisch** and B. Szajáni (1997) Continuous production of acetic acid in integrated systems using immobilized cells. ECB8, Budapest, Abstracts TH 3216