

Soproni Egyetem

Doktori értekezés tézisei

**Lignocellulóz rendszerek anaerob fermentációjának vizsgálata**

Makk Ádám Nándor

Sopron

2017

Soproni Egyetem  
Erdőmérnöki Kar  
Kitaibel Pál Környezettudományi Doktori Iskola  
Biokörnyezettudományi Program

Témavezetők:  
Dr. habil. Rétfalvi Tamás  
Dr. habil. Hofmann Tamás

## **BEVEZETÉS**

A megújuló energiaforrások vizsgálata napjaink egyik legígéretesebb kutatási területe. A biomassa felhasználása hazánkban jelentős mértékben közvetlen hőtermelésben hasznosul. Ennek egyik hátránya a hő-, illetve a konvertált villamos energia rossz hatásfoka, valamint a tárolhatóság megoldatlansága. Alternatív megoldásként lehetőség van a lignocellulóz anyagok, mint a legnagyobb mennyiségben keletkező alapanyagok anaerob fermentációjára, azonban az ipari alkalmazhatóság még számos megoldatlan problémával szembesül.

A disszertáció az erdészeti jellegű hulladék anyagokból előállítható biogáz lehetőségeire koncentrálna. Ez a téma a szakirodalom alapján kevésbé kutatott, rendkívül hiányosak az ismeretek arról, hogy fa alapú melléktermékekből a biogáz előállítás miként lehetséges.

A Jelölt munkájában a Magyarországon előforduló jellegzetes faipari melléktermékek fermentációját vizsgálta, kiválasztva a kocsánytalan tölgy kérget és a fekete bodza faanyagot. Anaerob, termofil körülmények között vizsgálta a kinyerhető biogáz hozamokat, melyeket szakirodalmi adatokkal hasonlított össze. A termelődő biogáz hozam fokozását különböző fizikai, kémiai és biológia előkezelésekkel végezte. Több szempont figyelembe vételével ítélte a korhasztó gombák alkalmazásával történő biológiai előkezelést a legeredményesebbnek. Annak bizonyítása érdekében, hogy a megnövekedett fajlagos metánhozam a korhasztó gombák degradációjának köszönhető további vizsgálatokat végzett az ilyen módon előkezelt fekete bodza faanyagon.

## **1. KUTATÁSI CÉLKITŰZÉSEK**

- **A minták előkezelési lehetőségeinek vizsgálata az optimális előkezelési eljárás kiválasztására**

A lignocellulóz rendszerek fermentációjának szűk keresztmetszete a makrokomponensek hidrolízisének lassúsága.

Ezt gyorsítandó, olyan előkezelési technikák alkalmazását hasonlította össze a Jelölt, amelyek segítségével a háromdimenziós mátrix szerkezet fellazítható, ezáltal a hidroláz enzimek hatékonysága fokozható. A módszerek összevetésénél az ipari alkalmazhatóság és gazdaságosság alapvető fontosságú.

- **Az előkezelt minták biogáz termelésének vizsgálata**

A különböző módon előkezelt lignocellulóz alapanyagok anaerob úton történő fermentációjának vizsgálatára került sor. Az alapanyagokon végzett előkezelések hatékonyságának összehasonlítását elsősorban a gázhozam mérések alapján történt. A Jelölt célja az volt, hogy a hatékonysági és gáztermelési szempontok figyelembe vételével kiválassza a legalkalmasabb módszert.

- **Az optimális módon előkezelt faanyag vizsgálata**

Az előkezelési eljárások közül az optimális eljárás kiválasztását követően, ezen előkezelés hatékonyságának megértése érdekében különböző vizsgálatok elvégzése szükséges. Annak bizonyítására, hogy valóban az előkezelés hatásának köszönhető a biogázhozam növekedése, szükséges vizsgálni a faanyag szerkezeti, kémiai változásait, továbbá a biogáz és biogáz iszapok összetételét.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A Szerzőnek fontos szempont volt a kísérleteihez használt alapanyagok kiválasztásánál, hogy iparilag értéktelen alapanyag vagy a feldolgozás során visszamaradó hulladék legyen. A kocsánytalan tölgy kéreg (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) alapanyag, mint hulladék, a fekete bodza (*Sambucus nigra* L.) faanyag, pedig mint iparilag értéktelen faanyag került a kísérleteibe. A fekete bodza faanyag mindamellett, hogy értéktelennek mondható, beltartalmi értékei miatt nagyon jól reprezentálja egy vegyes összetételű lignocellulóz alapanyagú hulladékot.

A Jelölt a mintavételi szempontok betartásával begyűjtött alapanyagokat, a begyűjtés után azonnal feldolgozta, mely folyamat végeredményéül 4 mm-nél kisebb szemcseátmérőjű alapanyagot kapott, melyet további felhasználásig fagyaszta tárolt.

### 2.1. ELŐKEZELÉSI ELJÁRÁSOK

A lignocellulóz biomasszát alkotó fő komponensek szoros kapcsolata a fő akadálya a poliszacharidok hidrolízisének. Ennek elősegítésére a Jelölt az alábbi előkezeléseket alkalmazta.

**Híg savas előkezelés:** A fekete bodza faanyag híg savas előkezelése 4%-os ecetsavoldat jelenlétében történt. A faanyag és ecetsav tömegaránya 1:3 volt, vagyis 100g száraz faanyaghoz 300 g ecetsav oldatot adagolt, majd 24 óráig állni hagyta szobahőmérsékleten (Phaiboonsilpa és Saka 2011).

**Extrakciós előkezelés:** A tölgy kéreg alapanyagán végezett extrakciós előkezelés célja a kéregben lévő járulékos anyagok eltávolítása, mivel ezek inhibitorokként viselkedhetnek.

100 g száraz tölgy kéreg aprítékhoz 800 ml desztillált víz extraháló szert adagolt, majd 24 óráig hagyta állni szobahőmérsékleten (Makk *et al.* 2013).

**Mikrohullámú előkezelés:** A Jelölt a mikrohullámú előkezelési technológiát fekete bodza és tölgy kéreg aprítékon is elvégezte. Mintánként 250 g alapanyag mikrohullámú előkezelésére került sor, háztartási mikrohullámú készülékkel. A mikrohullám 700 W teljesítményű volt. Az előkezelés időtartama 2 szakaszban 2 perc volt (Jackowiak *et al.* 2011/a, Makk *et al.* 2013). A végleges felhasználásig a mikrohullámmal kezelt alapanyagokat fagyaszttva tárolta.

**Hidrotermikus előkezelés:** A Szerző a hidrotermikus előkezelés során mikrohullámú hőkezelést végzett vizes közegben. Az eljárás során a fekete bodza faanyag hidrotermikus előkezelését Michem MD6 típusú mikrohullámú feltárával végezte. A hidrotermikus előkezelés 2 szakaszban 2 percig tartott. A fekete bodza faanyag és desztillált víz tömegaránya 1:3 volt, vagyis 100 g száraz faanyaghoz 300 g desztillált vizet adott. További felhasználásig az előkezelt mintákat fagyaszttva tárolta.

**Fizikai és kémiai előkezelés:** A Jelölt a fekete bodza alapanyagon fizikai, illetve kémiai előkezelési eljárásokat együttesen végezte el Michem MD6 típusú mikrohullámú feltárával. 700 W teljesítmény mellett 150°C illetve 210°C -on végezte a minták előkezelését, 2+2 percig. Az állandó teljesítmény mellett, a darált mintákat különböző hőmérsékletű és koncentrációjú híg ecetsavas közegbe is helyezte, mely 2%-os és 4%-os ecetsav oldatot jelentett. A faanyag apríték és az ecetsav oldat tömegaránya 1:3 volt, vagyis 100 g száraz faanyaghoz 300 g ecetsav oldat került.

**Biológiai előkezelés:** Két különböző korhasztó gombafaj alkalmazásával történt a fekete bodza faanyag biológiai előkezelése. Az egyik korhasztó gombafaj a pincegomba (*Coniophora Puteana* (Schumach.) P. Karst.), mely vörös korhasztó, a másik faj pedig a késői laskagomba (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.), mely fehér korhasztó volt. A korhasztó gombafajok táptalaja agar-agar/maláta, amely kb. 20x20 cm-es hőálló műanyag tárolóedényben volt. Az előkezelés során különböző inkubálási időtartamokat (14, 21, 28 nap) alkalmazott. A két korhasztó gombafajt egyidejűleg alkalmazására is sor került 21 napos inkubálási ideig. Mintánként 150-200 g, 120 °C-os gőzzel 20 percig sterilizált fekete bodza apríték került az ugyancsak sterilizált edényekbe. A minták az előkezelési idő alatt minden esetben szobahőmérsékleten, sötétben, klímakamrában voltak.

## **2.2. KORHASZTÓ GOMBÁKKAL KEZELT FAANYAG VIZSGÁLATA**

Annak érdekében, hogy bizonyosságot nyerjen a Szerző, hogy a fekete bodza faanyagon bekövetkezett változások valóban a korhasztó gombák tevékenységének következménye, az alábbi vizsgálatokat végezte el.

**Összes szervesanyag-tartalom meghatározás:** Az összes szervesanyag-tartalom mérése esetén a darált faanyag analitikai mérlegen történő bemérését, 600 °C-on 3 órán keresztül tartó izzítás követ. Az exikátorban történő lehűlés után a visszamaradt szervesanyag tömegének mérésével meghatározható a minta összes szervesanyag-tartalmát.

**Cellulóz tartalom meghatározás:** A Szerző a cellulóz tartalmat Kürschner-Hoffer módszere szerint határozta meg (Kürschner és Hoffer 1931).

### **Összes kioldható szénhidrát tartalom meghatározás:**

Extrakció: 0,25 g faanyag aprítékhoz 25 ml 4:1 - metanol:víz extraháló szer adagolása után 6 órán keresztül tartó mágneses kevertetés zajlott (Visiné Rajczy 2008). Az extraktumok szűrése Whatman G2-es üvegszálal fecskendőszűrővel történt.

Az összes kioldható szénhidrát tartalom meghatározását Dubois módszere szerint végezte a Jelölt (Dubois *et al.* 1956).

**Totálfenol tartalom meghatározás:** A méréséhez használt extraktumok az összes kioldható szénhidrát tartalom meghatározásánál használtakkal megegyezően készültek.

A totál fenol tartalom Folin-Ciocalteu módszere szerint került meghatározásra (Singleton és Rossi 1965).

**HPLC-MS/MS mérések:** A gombákkal előkezelt bodza faanyag extrakciója 0,75 g száraz faanyag 25 ml desztillált vízzel 6 óras mágnes kevertetéssel ment végbe.

Az extraktumok szűrése 0,45 µm pórusméretű cellulóz acetát fecskendőszűrővel történt.

A Szerző a HPLC-MS/MS méréseket egy Shimadzu LC-20 folyadékkromatográfval, valamint egy hozzá csatolt AB Sciex 3200 Qtrap típusú lineáris ioncsapda/hármas kvadrupól elrendezésű tömegspektrométerrel, mintánként 3 ismétléssel végezte.

**Elektronmikroszkópos felvételek:** A Jelölt az elektronmikroszkópos felvételeket Hitachi S-3400N pásztázó elektronmikroszkóppal készítette, 25 kV gyorsító feszültség és 70 kPa nyomás mellett, BSE (Back Scattering Electron) módban, 200-szoros nagyításban.



**Száranyag-tartalom meghatározás:** Az alapanyag apríték szárítása 105 °C-on tömegállandóságig történt. Az exikátorban történő lehűlés után a visszamért száraz faanyag tömegéből számítható a szárazanyag-tartalom, mintánként 3 párhuzamos méréssel.

### 2.3. BIOGÁZ ELŐÁLLÍTÁS ÉS BIOGÁZHOZAM MÉRÉS

**Biogáz előállítás:** A biogáz termelési kísérletekben használt reaktor 2500 ml űrtartalmú, csavarmenetes, barna üveg melyben a biogáz iszap 1000 ml volt. A növényi alapanyagokra adaptálódott oltóiszap a Magyar Cukor Zrt. kaposvári biogáz üzeméből származott. A biogáz kihozatali vizsgálatok félfolyamatos üzemben, anaerob, termofil (55°C) körülmények között átlagosan 30-60 napig tartottak. A Jelölt a Tedlar<sup>®</sup> gázgyűjtő zsákokba gyűjtött biogáz mennyiségének mérését 500 ml-es Hamilton fecskendővel végezte. A hőmérsékleti körülményeket Memmert WNB 14 Basic vízfürdő biztosította.

**Biogáz összetétel meghatározása:** A Jelölt a biogáz összetételét meghatározó CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> gázok mennyiségét Ecoprobe 5-IR készülékkel végezte. A kalibráláshoz használt gázelegy összetétele: 60% metán, 30% széndioxid és 10 % oxigén, a gázelegy tisztasága 99,995% volt.

**Genomikai vizsgálatok:** A különböző biogáz iszap minták teljes genomikai összetételének feltérképezése érdekében a Jelölt metagenomikai szekvenciát és a minták bioinformatikai analízisét végezte el.

**Biogáz iszap monitoring:** A Jelölt a biogáz iszap kémiai paramétereit (pH, kémiai oxigén igény, totál foszfor, ammónium) szabványos eljárásokkal ellenőrizte (Rétfalvi *et al.* 2016).

### 3. TÉZISEK

- 1. tézis:** A vizsgálatok eredményeképpen bizonyítást nyert, hogy az erdészeti lignocellulóz anyagok közül a kocsánytalan tölgy kéreg (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) és a fekete bodza faanyag (*Sambucus nigra* L.) a biogáz előállításra alkalmas termofil, anaerob körülmények között. A legáltalánosságban felhasznált mezőgazdasági melléktermékek fajlagos metán kihozatalához képest 20-35% érhető el.
- 2. tézis:** Félfolyamatos laboratóriumi termofil anaerob fermentáció során bizonyításra került, hogy az aprított kocsánytalan tölgy kéreg (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) a fajlagos metántermelését (67 ml/g szerves szárazanyag) a fizikai (mikrohullámú) előkezelés jelentősen (20%) rontotta, míg a kémiai (vizes extrakciós) előkezelés és ezek együttes alkalmazása lényegében nem befolyásolta.
- 3. tézis:** Az aprított fekete bodza faanyag félfolyamatos, laboratóriumi termofil anaerob fermentációja során megállapításra került, hogy a relatív alacsony metánhozam (87 ml / g szerves szárazanyag) az alkalmazott kémiai, fizikai, fizikai-kémiai és biológiai előkezelésekkel javítható. A legkedvezőbb hatás a hidrotermikus (38%-os növekedés) és biológiai (30%-os növekedés) előkezeléssel érhető el.

**4. tézis:** Félfolyamatos, termofil anaerob fermentációs labor kísérletek során bebizonyosodott, hogy a fekete bodza (*Sambucus nigra* L.) faanyag fehér-, és vörös korhasztó gombákkal (*Coniophora Puteana* (Schumach.) P. Karst; *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) végzett biológiai előkezelése eredményesen javította a fajlagos metán kihozatalt. Az előkezelés időtartalma jelentős hatással van a metánkihozatalra. Leghatékonyabbnak (30%-os növekedés) a 28 napos előkezelési idő bizonyult. A biológiai előkezelés vörös- és fehér korhasztó gombák egyidejű alkalmazásával 7 nappal lerövidíthető.

#### **4. JAVASLATOK, JÖVŐBENI CÉLOK**

A Szerző laboratóriumi fermentációs kísérletek során bizonyította, hogy a fekete bodza faanyag és a tölgy kéreg alapanyagok alkalmasak biogáz előállításra, megfelelő előkezelési eljárások alkalmazásával a metánhozam fokozható. A Disszertáció megfelelő alapot jelent, az alkalmazott alapanyagok, illetve egyéb erdészeti- és faipari melléktermék biogáz célú hasznosításához, akár ipari méretű felhasználásukhoz. A kutatás során célul kitűzött kérdések megválaszolása közben számos új kérdés merült fel illetve marad megválaszolatlanul, melynek tisztázás további kutatásokat igényel.

Jövőbeni kutatási lehetőségek:

- Egyéb fafajok (akác, tölgy, nyár, fenyő) alkalmazása biogáz előállításra.
- Egyéb korhasztó gomba fajok alkalmazása biológiai előkezelés céljából.
- A tölgy kéreg faanyag biológiai előkezelésének vizsgálata.
- Az ipari alkalmazhatóság érdekében nagy mennyiségek alkalmazása.
- A nagy mennyiségű alkalmazás kivitelezéséhez nélkülözhetetlen technológiai fejlesztések.

## 5. PUBLIKÁCIÓK

### 5.1. A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

#### Szakfolyóiratcikk:

Makk, Á.N., Rétfalvi, T., Hofmann, T. (2017) *Utilization of oak bark (Quercus petraea (Matt.) Liebl.) for anaerobic digested biogas production.* Acta Silvatica & Lignaria Hungarica, (megjelenés alatt)

#### Könyvrészlet/Konferencia közlemények:

Makk, Á., Bak, M., Hofmann T., Németh, R., Rétfalvi T. (2014) *Effect of fungal pretreatment on anaerob fermentation of bourtree (Sambucus Nigra).* Eco-efficient Resource Wood with special focus on hardwoods: IAWS Plenary Meeting 2014.09.15-18- Sopron (Hungary) In: Róbert Németh, Alfred Teischinger, Uwe Schmitt (szerk.), (ISBN:978-963-334-191-9), pp. 23-24.

Makk, Á., Rétfalvi, T., Hofmann, T., Németh, R., Bak. M. (2014) *Fekete bodza (Sambucus nigra L.) faanyag fehér- (Pleurotus ostreatus L.) és vöröskorhasztó (Coniophora puteana L.) gombákkal való kezelése.* Tavasz Szél Konferencia, Debrecen 2014. 03.21-23, (ISBN: 978-963-89560-9-5), pp. 289-299

Makk, Á.N., Rétfalvi, T., Hofmann, T., Farkas, B. (2013) *Lignocellulózok anaerob fermentációja - Az előkezelés hatása.* Kémia, környezettudomány, fenntarthatóság: Kémiai Intézet Tudományos Ülése, 2013.08.29. Sopron, In: Albert L, Szabó P (szerk.) (ISBN:978-963-334-147-6), pp. 71-76

### **Konferencia- és poszter előadások:**

Makk, Á., Bak, M., Hofmann T., Németh R., Rétfalvi T. (2014) *Effect of fungal pretreatment on anaerob fermentation of bourtree (Sambucus nigra L.)*. Poszter előadás. Eco-efficient Resource Wood with special focus on hardwoods: IAWS Plenary Meeting 2014, Bécs, Sopron, 2014. szeptember 15-18.

Makk Á, Rétfalvi T, Hofmann T, Németh R, Bak M (2014) *Fekete bodza (Sambucus nigra L.) faanyag fehér- (Pleurotus ostreatus L.) és vöröskorhasztó (Coniophora puteana L.) gombákkal való kezelése*. Konferencia előadás. Tavaszi Szél Konferencia, Debrecen, 2014. március 21-23.

Makk, Á.N., Rétfalvi, T., Hofmann, T., Farkas, B., (2013) *Lignocellulózok anaerob fermentációja - Az előkezelés hatása*. Konferencia előadás. Kémia, környezettudomány, fenntarthatóság: Kémiai Intézet Tudományos Ülése, Sopron, 2013. augusztus 29.

Makk, Á., Hofmann, T., Rétfalvi, T. (2012) *Lignocellulóz rendszerek előkezelési lehetőségei az anaerob fermentáció elősegítésére*. Konferencia előadás. MTA, Természetes Polimerek Munkabizottsági ülés, Sopron 2012.05.22.

## 5.2. EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

### Szakfolyóiratcikk:

Makk Á.N., Hofmann T., Rétfalvi T. (2013) *A (+)-catechin kinyerése tölgyek kérgéből*. *Faipar*, 61 (2), 16-26

### Konferencia- és poszter előadások:

Hofmann, T., Makk, Á.N., Rétfalvi T., Albert, L. (2009) *Antioxidáns polifenolok kinyerése tölgyek kérgéből*. Poszter előadás. IX. Környezetvédelmi analitikai és technológiai konferencia, Környezetvédelem és élelmiszerminőség a III. évezredben, Sopron, 2009. október 7-9.

Albert, L., Hofmann, T., Rajczi E., Csepregi, I., Makk, Á. (2007) *Polifenolok kinyerése: Extrakciós eljárások hatékonyságának vizsgálata*. Poszter előadás. Nyugat-magyarországi Egyetem, Erdőmérnöki Kar Konferencia, Sopron, 2007

## 6. FELHASZNÁLT SZAKIRODALOM

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Anal. Chem., 28, 350- 356
- Jackowiak, D., Bassard, D., Paus, A., Ribeiro, T. (2011) *Optimisation of a microwave pretreatment of wheat straw for methane production*. Bioresource Technol. 102, 6750–6756
- Kürschner, K., Hoffer, A. (1931) *Eine neue quantitative Cellulosebestimmung*. Chem. Ztg. 17, 161-168
- Makk, Á.N., Hofmann, T., Rétfalvi, T. (2013) *A (+)-catechin kinyerése tölgyek kérgéből*. Faipar, 61, 2, 16-26
- Phaiboonsilpa, N., Saka, S. (2011) *Effect of acetic acid addition on chemical conversion of woods as treated by semi-flow hot-compressed water*. Holzforschung 65, 667-672
- Rétfalvi, T., Szabó, P., Tukacs-Hájos, A., Albert, L., Kovács, A., Milics, G., Neményi, M., Lakatos, E., Ördög, V. (2016) *Effect of co-substrate feeding on methane yield of anaerobic digestion of Chlorella vulgaris*. J. Appl. Phycol. 28(5), 2741–2752
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. Am. J. Enol. Vitic. 16, 144–158
- Visiné Rajczi, E. (2008) *Bükk (Fagus sylvatica L.) extraktanyagok képződése akkumulációja és megoszlása*. PhD disszertáció, Nyugat-Magyarországi Egyetem