

dc_22_10

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS
TÉZISEI

Lignocellulózok biofinomítása és
konverziója második generációs üzemanyagalkohollá

Réczey Istvánné Csorba Katalin

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék
2012

1 Bevezetés, tudományos előzmények, kutatási célkitűzések

Az emberiség nyersanyagait és energiaforrásait a körülvevő természetből szerezte be egészen addig, amíg a kőolaj olcsóbbnak nem bizonyult a természetes anyagoknál. A kőolaj térhódításával fokozatosan felborult az egyensúly és a millió évekkel ezelőtt megkötött széndioxid nagy mennyiségben felszabadult, evvel jelentős változást okozva a légkör széndioxid koncentrációjában és éghajlatunkban. Ezekről a változásokról hosszú éveken át csak a tudósok vettek tudomást, de a közelmúltban a környezetvédelmi gondok, az energiahiány illetve az energetikai ellátásban jelentkező problémák már a döntéshozókat is a megújuló, pontosabban megújítható nyersanyagok és energiaforrások használata felé fordították. Ezáltal a biomassza felhasználása - egyelőre főként energiaforrásként - újra előtérbe került.

A biomassza energetikai célú felhasználására a közvetlen égetésen kívül a bioüzemanyagok előállítása jelenthet megoldást. Ezek előnye, hogy a nettó üvegházhatású gáz kibocsátásuk kicsi, így csökkenthető az üzemanyagok környezetre (pl. az éghajlatváltozásra) gyakorolt negatív hatása. Mivel a megújuló nyersanyagok földrajzi eloszlása viszonylag egyenletes, a fosszilis energiahordozókkal nem rendelkező országok energiafüggsége hosszútávon megszüntethető.

Az EU célja, hogy 2030-ra a felszíni közlekedés üzemanyag szükségletének 25%-a biológiai eredetű legyen, s ezt legalábbis részben a versenyképes európai ipar állítsa elő. Ezért Európában is egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a bioüzemanyagok előállításával kapcsolatos kutatások, fejlesztések. Kezdetben az etilalkohol és a biodízel, majd a biohidrogén, biobutanol és biogáz előállítási technológiákat fejlesztették. Az utóbbi években pedig elterjedtek a teljes biomasszát felhasználó BTL (biomass to liquid) eljárások, melyek a biomassza gázosítása után Fischer-Tropsch szintézissel állítják elő az ún. „biocrude”-ot, melynek hidrokrakkolásával nyerik a könnyűbenzint, paraffint és kenőanyagokat. A bioüzemanyagok közül a bioetanolt és a biodízelt már ma is használjuk többnyire benzinhez, illetve dízelolajhoz keverve. A biodízelt növényolajból átszterezezással, illetve a NExBTL eljárásban katalitikus hidrogénezéssel, az etilalkoholt erjesztéssel állítják elő cukorból, keményítő hidrolizátumból. Jelenleg a világ etilalkohol termelés nyersanyagának mintegy fele cukornád, a másik fele kukorica. Mind a szacharóz, mind a keményítő alapú technológia évszázadok óta ismert és alkalmazott ipari méretekben. Ma ezeket a köznyelvben „első generációs” üzemanyag előállítási technológiának nevezzük. Ezt a technológiát, miután élelmiszer és takarmány alapanyagot használ fel, számos kritika éri az élelmiszerárakra, és az élelmiszerellátás biztonságára gyakorolt kedvezőtlen hatása miatt. A kutatások és fejlesztések ezért a lignocellulóz alapú („második generációs”) etanol előállítás területén folynak nagy intenzitással.

Kutatómunkám mindvégig a lignocellulózok biokonverziójához kapcsolódott. Ez volt a témája Műszaki Doktori értekezésemnek (Penész eredetű cellulózbontó enzimek előállítása, BME, 1981) és az 1992-ben megvédett Kandidátusi Disszertációmnak is (Lignocellulózok biotechnológiai hasznosításának lehetőségei és problémái). Doktori értekezésemben a kandidátusi dolgozatom beadása óta eltelt 20 év tudományos eredményeit foglalom össze. Ebben az időben arra törekedtem, hogy kutatócsoportommal minél szélesebb körben vizsgáljam a megtermeszthető, illetve a melléktermékként keletkező növényi biomasszát összetétele, éves mennyisége és feldolgozhatósága tekintetében. Meggyőződésem, hogy a nagyon heterogén növényi

biomassza előkezelésére, frakcionálására, felhasználására különböző technológiai javaslatokat kell adni. Dolgozatomban ezeket foglalom össze. Munkám során arra is rámutatok, hogy a mezőgazdasági termelés, az élelmiszeripar, a takarmányozás és a bioüzemanyagok egy egységet kell, hogy alkossanak. A számos potenciális termék közül a legnagyobb hangsúlyt az etilalkohol, mint második generációs üzemanyag kapta, de emellett foglalkoztunk a biohidrogén, a növényi gumik és növényi szterinek előállításával, ill. kinyerésével is. A lignocellulóz alapú etanol előállítási technológia kidolgozásának elengedhetetlen velejárója a celluláz enzim előállítása és a celluláz enzimes hidrolízisének vizsgálata. Enzimfermentációs kísérleteink során különösen az új nyersanyagok fermentációs szénforrásként való felhasználását vizsgáltuk, az enzimes hidrolízisben pedig a különböző összetételű enzimkomplexek, segítő enzimek és polimerek hatását néztük a hidrolízis kezdeti sebességére ill. a konverzióra.

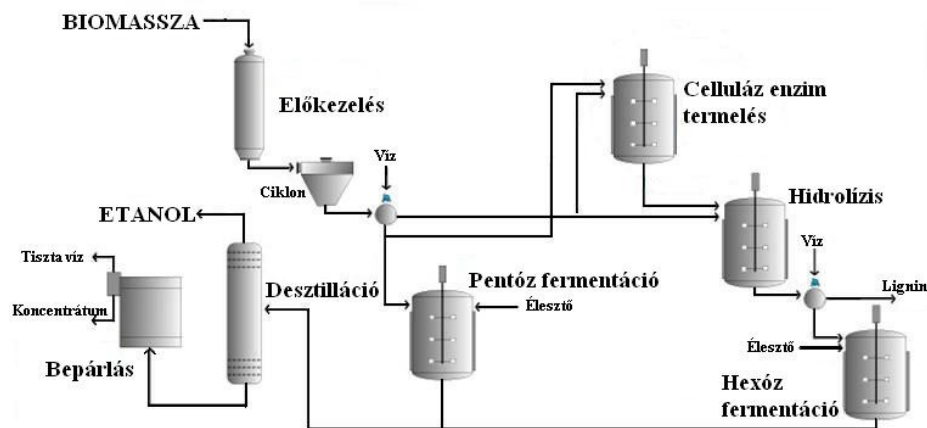
Célkitűzéseimet az alábbiakban foglalom össze:

1. Megfelelő előkezelési módszerek kidolgozása, optimalizálása különböző lignocellulóz alapú nyersanyagokra (kender, kenderpozdorja, kukoricaszár, cukorcirokbagasz, nád, energiafű, kukoricarost). A lignocellulózok előkezelését és enzimes hidrolízisét felhasználva egyes nyersanyagok „biofinomítás” jellegű feldolgozása.
2. Celluláz enzimkomplex előállítása *Trichoderma* fermentációjával. Az „on site”, azaz helyben történő enzim előállítás megvalósításához mind a fermentációs technológia, mind a nyersanyag biztosítás területén megfelelő ismeretek megszerzése.
3. A kandidátusi dolgozatomban ismertetett β -glükozidáz enzimkomponenssel kapcsolatos kutatások folytatása, enzimfermentáció és az „in situ” immobilizált pelletek stabilitásának javítása területén.
4. Az enzimes hidrolízist befolyásoló lényegesebb tényezők vizsgálata, törekedve a maximális szénhidrátkonverzió elérésére a különböző módon előkezelt, különböző típusú lignocellulóz szubsztrátoknál.
5. Etanolfermentáció körülményeinek és hatékonyságának meghatározása egyidejű, illetve szeparált hidrolízissel és erjesztéssel (SSF, SHF) különféle módon előkezelt, különböző típusú lignocellulóz nyersanyagok felhasználásával.
6. Ipari és fermentált celluláz enzimek alkalmazása a papíripar és a takarmányozás területén. Szeparált lignocellulóz komponensek (cellulóz, CFG:corn fibre gum) alkalmazása termoplasztikus keményítő (TPS) egyes tulajdonságainak javítására.

2 A vizsgált technológia lépései, kísérleti és vizsgálati módszerek

Kísérleti munkánk lényegi része az 1. ábrán bemutatott lignocellulóz alapú etanol előállítás egyes pontjaihoz kapcsolódik. A lignocellulózokban a hasznosítható cukrok komplex, poliszacharidokban kötött formában találhatók meg, melyek felszabadítása a polimer mátrixból nem egyszerű, mivel a növényi sejtfal szerkezete mind vegyszereknek, mind mikroorganizmusoknak meglehetősen ellenálló.

Munkánk első lépése a különböző nyersanyagok előkezelése volt. Az előkezelések hatékonyságát a polimerfrakciók elválasztásával, a rostfrakcióban feldúsult cellulóz enzim bonthatóságával, a hidrolizátum erjeszthetőségével, és/vagy a folyadék frakcióban lévő cukrok mennyiségével, felhasználhatóságával határoztuk meg.



1. ábra Második generációs etil-alkohol előállításának technológiai sémája

A fellazított polimer szerkezetet ipari cellulázokkal, vagy helyben előállított celluláz aktivitású fermentalevekkel hidrolizáltuk, a hidrolízis hatékonyságát „segítő” enzimek, illetve adszorpciót csökkentő polimer adagolásával javítottuk.

Az enzimfermentációval egyrészt a hidrolízishez szükséges enzimeket biztosítottuk, másrészt a „lignocellulózból etanol” technológiában keletkező mellékáramok hasznosítását oldottuk meg. Kísérleteinket rázatott lombikokban és különböző méretű laboratóriumi fermentorokban hajtottuk végre.

Az előkezelt lignocellulókat szimultán hidrolízis és fermentáció (SSF) konfigurációban, a hidrolízis eredményeképpen kapott monoszacharidokat közvetlen erjesztéssel (SHF) etanollá fermentáltuk.

3 Új tudományos eredmények

A növényi biomassa nemcsak élelmiszer alapanyag és takarmány. Energia- és nyersanyagforrásként is jelentős szerepet játszott a múltban, és reményeink szerint ez a típusú felhasználása a jövőben még inkább elterjed majd. Lényeges tulajdonsága, hogy megújuló, illetve megújítható, s a kőolajjal ellentétben előfordulása nemcsak bizonyos területekre koncentrálódik, hanem megterem vagy megtermeszthető mindenütt, ahol mezőgazdasági, erdészeti termelésre alkalmas körülmények vannak. Fontos kiemelni azt is, hogy felhasználása, a nem megújuló energiaforrásokkal szemben, széndioxid semleges.

Doktori disszertációmban a rostonövények, a kemény- és tűlevelű fák, valamint különböző mezőgazdasági, agro-ipari melléktermékek vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket foglaltam össze. A közös vonás a vizsgált nyersanyagokban, hogy valamennyi lignocellulóz, azaz főtömegüket cellulóz, hemicellulóz és lignin alkotja. Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a különböző melléktermékek (kukoricaszár, kukoricarost, cukorcirok bagasz, kenderpozdorja), esetenként főtermékek (fűzfa, fenyőfa, kender, energiafű), egyes esetekben hulladékok (papírszap, hulladék papír), hogyan bonthatók komponenseikre, s az elválasztott komponensek hogyan hasznosíthatók. Munkánk fő irányát a második generációs etanol előállításához kapcsolódó kutatások adták.

Eredményeinket az alábbi csoportosításban tárgyalom:

- Lignocellulózok előkezelése,
- Celluláz és β -glükózidáz fermentáció,
- Enzimes hidrolízis,
- Etanol és hidrogénfermentáció,
- Cellulázok és különböző lignocellulóz komponensek felhasználása egyéb iparokban.

Legfontosabb tudományos eredményeimnek az alábbiakat tekintem:

3.1 A lignocellulózok előkezelése területén

Bebizonyítottuk, hogy a kukoricaszár, a kukoricarost, a cukorcirok bagasz, a kender, a kenderpozdorja, valamint a balatoni nád és az energiafű megfelelő előkezelés után enzimesen egyszerű cukrokká bontható, s így a második generációs etanoltermelés nyersanyaga lehet. Valamennyi nyersanyag vizsgálatában Európában elsők voltunk. Kukoricarost előkezelésével valódi biofinomítást valósítottunk meg, azaz az előkezeléssel nemcsak a nyersanyag szerkezetét lazítottuk fel, hanem egyidejűleg értékes termékeket (CFG, rostolaj) is állítottunk elő.

Az alábbiakban nyersanyagonként részletezem a leglényegesebb eredményeinket.

3.1.1 Kukoricaszár előkezelése

- ♦ Híg kénsavas előkezeléssel, a hemicellulóz frakciót kiválóan el lehet választani a cellulóz és lignin tartalmú maradéktól, ezáltal lehetővé téve a hemicellulóz eredetű cukrok szeparált felhasználását. Megállapítottuk, hogy az előkezelés egymagában nem eredményez kielégítő javulást a kukoricaszár enzimes bonthatóságában, megfelelő glükán konverzió elérése érdekében egy második előkezelési lépés szükséges (1).
- ♦ NaOH-os kezeléssel ugyan a glükán konverzió négyszeresre javítható, de a nagy anyagvesztesség (cukorbojlás) és vegyszer felhasználás miatt a módszer nem ajánlható a kukoricaszár előkezelésére (2).
- ♦ Híg lúgos és híg savas kezelések egymásutáni alkalmazásával az enzimes hidrolízisben kiváló glükánkonverzió érhető el (2).
- ♦ Mind gőzrobbantással, mind nedves oxidációs előkezeléssel a kísérleti körülmények optimalizálásával a kukoricaszár glükán komponensének enzimes bonthatósága jelentősen, mintegy négyszeresre növelhető (3, 4).
- ♦ A hemicellulóz veszteségek minimalizálása érdekében mind a nedves oxidációs, mind a gőzrobbantásos előkezelést célszerű híg savas előkezelésnek megelőznie.

3.1.2 Kukoricarosttal végzett frakcionálási kísérletek

- ♦ Lúgos extrakcióval úgy izolálható polimer formában a hemicellulóz frakció, hogy közben a szilárd maradék enzimes hidrolizálhatósága jelentősen javul (5).
- ♦ A lúgos hemicellulóz izolálás szilárd maradéka celluláz enzim fermentációra kiválóan alkalmas szénforrás (6).
- ♦ Mikrohullámú reaktorban vegyszer alkalmazása nélkül, a lúgos extrakcióval összemérhető molekulatömeggel, de gyengébb hozammal lehet hemicellulózt izolálni. A hozam a reakció hőmérsékletének emelésével növekszik, ugyanakkor az izolált hemicellulóz molekulatömege csökken (8).
- ♦ Kukoricarost híg kénsavas előkezelésével a hemicellulóz frakciót monomerként csaknem kvantitatíve el lehet választani, megteremtve ezáltal a szeparált hasznosítás lehetőségét. A maradék rost enzimes bonthatósága ezzel egyidejűleg jelentősen javul (9).
- ♦ A kukoricarost híg savas és enzimes frakcionálásakor az enzimes hidrolízis maradékában a rostolaj koncentrációja jelentősen megnő, megteremtve ezáltal a gazdaságos rostolaj kinyerés alapjait (10).
- ♦ A kukoricacsíra olaj előállításakor keletkező kukoricacsíra dara eredeti olajtartalma a kukoricamaghéjnál kidolgozott frakcionálási eljárás alkalmazásával háromszorosára növelhető, lehetővé téve ezáltal egy második préselési lépés alkalmazását a vegyszerigényes extrakció helyett (11).

3.1.3 Cukorcirok bagasz előkezelése

- ♦ Gőzrobbantással, kéndioxidos előimpregnálás után a cukorcirok bagasz enzimes bonthatósága a kezeletlen nyersanyag hidrolizálhatóságának 4-5-szörösére növelhető (13).

3.1.4 Kender és kenderpozdorja vizsgálata

- ♦ A mezőgazdasági melléktermékeknek jól sikerrel alkalmazott kémiai módszerekkel sem a kender, sem a kenderpozdorja nem tártatható fel a kívánt mértékben, előkezelés tekintetében a fásszárú anyagokhoz hasonlítanak, melynek valószínű oka a zártabb struktúra (14).
- ♦ Gőzrobbantással mind a kenderkórót, mind a silózással tarósított kenderkórót hatékonyan lehet előkezeli. Kéndioxidos előimpregnálás után optimális körülmények között végzett előkezelés hatására a glükánvesztesség csekély, az enzim bonthatóság pedig már jelentősen javul (15).
- ♦ Silózott kender esetén a gőzrobbantást követően a pentózfrakció elválasztása jelentősen javítja az előkezelt rost szimultán hidrolízisének és erjesztésének konverzióját (15).
- ♦ A kenderpozdorja gőzrobbantásos előkezelésénél legjobbnak talált körülmények sem kielégítőek, mivel az elért maximális glükánkonverzió eléréséhez szükséges körülmények között a hemicellulóz bomlás következtében fellépő veszteség nagyon jelentős (16).
- ♦ Gőzrobbantás utáni SSF folyamatban mindhárom nyersanyagból jó hozammal lehet etanolt előállítani (15, 16).

3.1.5 Balatoni nád előkezelése

- ♦ Balatoni nád nedves oxidációs előkezelésének hatására az enzim bonthatóság a kezeletlen nádéhoz viszonyítva közel négyszeresre növelhető, de a jó bonthatóságot biztosító körülmények alkalmazásakor nemcsak a hemicellulóz, de a cellulóz is jelentős bomlást szenved (17).

3.1.6 Energiafű előkezelése

- ♦ Híg kénsavas előkezeléssel megoldható az energiafű hemicellulóz frakciójának elválasztása, de ez nem eredményez kielégítő konverzió javulást a maradékban (18).

3.2 Celluláz és β -glükózidáz fermentáció területén

T. reesei Rut C30 fermentációval igazoltuk, hogy a lignocellulózok előkezelésével nyert frakciók megfelelő körülmények között alkalmazhatók celluláz és β -glükózidáz fermentáció szénforrásának. A gőzrobbantásnál, illetve a nedves oxidációnál elválasztható folyadékfázist, mely főként hemicellulóz eredetű monoszacharidokat illetve oligomereket tartalmaz, valamint az újrapapír gyártás során hulladékként keletkező papírszapot mi használtuk először celluláz fermentáció szénforrásául. Új fermentációs és „downstream” technikák alkalmazásával (puffer rendszer alkalmazása, vízzoldható és szilárd szénforrás külön hasznosítása, szuperkritikus sejtfeltárás) megteremtettük a megfelelő összetételű celluláz enzimkomplex előállításának lehetőségét.

Rekombináns *Trichoderma*kkal nagylaboratóriumi fermentorban, ipari táptalajon sikeresen állítottuk elő a célfehérjéket. β -glükózidázt hatékonyan stabilizáltuk

mikrobiális pelletekben, megnövelve ezzel a pelletek felhasználhatóságát. Sikeresen alkalmaztunk vizes kétfázisú rendszereket β -glükózidáz koncentrálásra és tisztításra.

Az alábbiakban részletezem az enzimfermentáció területén elért leglényegesebb eredményeinket.

3.2.1 Szénforráskísérletek

- ◆ Gőzrobbantással előkezelt fűzfa minták lignin tartalmuktól függetlenül alkalmazhatók a cellulázfermentáció szénforrásaként (19).
- ◆ Besűrített pentózfrakción (gőzrobbantott fűzfa) szaporítva a *T. reesei* Rut C30 törzs képes a pentózok hasznosítására és a közeg biológiai detoxifikálására (20).
- ◆ Besűrített pentózfrakció (gőzrobbantott fűzfa) felhasználásával a fermentáció szénforrása (SPW) fele részben helyettesíthető, miközben a hozam növekszik. A fermentációs lag szakasz hosszára a tenyészetek pH-jának van jelentős hatása (21).
- ◆ A sűrítetlen pentóz frakció (gőzrobbantott fűzfa), ellentétben a besűrített változattal, csak korlátozottan alkalmas enzimfermentáció szénforrásául (21).
- ◆ Gőzrobbantott lucfenyő felhasználásával biztosítható a celluláz fermentáció szénforrása mosott rostfrakció és fele részben hemicellulóz frakció alkalmazásával (22).
- ◆ Hullámpapír hulladék sikeresen használható enzimfermentáció szénforrásaként, a melasz alapú szesz- illetve élesztőgyártás mellékterméke, a vinasz, képes a celluláz fermentációs technológiában a Mandels' sók kiváltására (23).
- ◆ *T. reesei* Rut C30 és a *T. viride* OKI B1 törzsek a papíriszapot (papírgyári hulladék) szénforrásként képesek hasznosítani (24).
- ◆ Gőzrobbantással előkezelt kukoricaszár és laktóz, mint fermentációs szénforrások alkalmasak a SF helyettesítésére, a laktóz különösen a β -glükózidázt indukálására alkalmas.
- ◆ Nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár hemicellulóz hidrolizátuma (HH) úgy alkalmas a fermentáció során a víz helyettesítésére, hogy a térfogati aktivitás minden esetben, a hozam az enyhe körülmények között nyert HH alkalmazásakor nagyobb a kontroll csapvízen elértnél.

3.2.2 A celluláztermelést befolyásoló tényezők vizsgálata

- ◆ A maleát és trisz-maleát puffer rendszer alkalmas a rázatott tenyészetek pH-jának állandó értéken tartására. Trisz-maleát puffer alkalmazásakor az extracelluláris β -glükózidáz aktivitás jelentősen nagyobb, mint a nem pufferolt rendszerekben (25).
- ◆ pH szabályzott laboratóriumi fermentorban állandó pH-n, a pufferek adagolása nélkül nem termelhető meg a rázatott lombikokban elért β -glükózidáz aktivitás, tehát a jó enzintermeléshez nem elegendő az állandó pH biztosítása. A trisz-maleát puffer összetevőinek hatása még nem tisztázott (25).
- ◆ Szuperkritikus CO₂-ban *Trichoderma* micélium maradéktalanul feltárható (26).
- ◆ Solka Floc (ligninmentesített fenyőcellulóz, SF) szénforráson a *T. reesei* Rut C30 teljes enzintermelése, azaz az intra- és az extracelluláris aktivitások összessége

kiegyensúlyozott, de mivel a megtermelt β -glükózidáz részben a sejtfalhoz kötött, a fermentlé felülúszó β -glükózidázban szegény (26).

- ◆ *T. reesei* Rut C30 növekedési dinamikájának vizsgálatakor megállapítottuk, hogy pillanatszerűen képes metabolizmusát glükóz hasznosításról cellulóz hasznosítására átkapcsolni, mellyel együttjár az intenzív celluláztermelés (27).

3.2.3 Rekombináns *Trichoderma*kkal végzett fermentációk

- ◆ Genetikailag módosított *T. reesei* QM9414 törzsekkel rázatott lombikos fermentációban *T. reesei* teljes Cel7B (EG I)-t, illetve Cel7B katalitikus alegységet jó hozammal lehet szelektíven előállítani (29).

- ◆ *T. reesei* QM9414 törzs rátáplálásos fermentációjában nagy szervesen N-tartalom alkalmazásakor a celluláz enzim mellett nagy mennyiségben szintetizálódik egy szerin proteáz. Ennek jelenlétével magyarázható, hogy a rekombináns törzsszel csak a CBD nélküli Cel7B-t tudunk előállítani (30).

- ◆ *Thermoascus aurantiacus* cbh1/cel7A génjét hordozó *T. reesei* mutáns (RF6026) ipari táptalajon, nagylaboratóriumi fermentorban hőstabil cellobiohidrolázt (CBH I) képes szintetizálni és kiválasztani. Méréseinkkel igazoltuk, hogy a mutáns a többi enzimkomponenst a szülő törzshöz (Rut C30) hasonló arányban termeli. A heterológ CBH I enzimtermelés sikerességét saját hőmérséklet optimumán végzett enzimaktivitás méréssel igazoltuk (31).

3.2.4 β -glükózidázzal kapcsolatos kísérleteink

- ◆ Az *Aspergillus* pelleték β -glükózidáz aktivitása szárítás következtében drasztikusan lecsökken, a csökkenés a sejtfal töredezésének következménye, mely az egymást követő hidrolízisekben enzimiáramlást (enzimvesztéséget) eredményez (32).

- ◆ Az optimalizált glutáraldehydes kezelés hatására a pelleték stabilitása olymértékben megnő, hogy tíz egymást követő kísérlet alatt sincs mérhető csökkenés a kezdeti hidrolízis sebességben (32).

- ◆ Gőzrobbantott fűzfa hemicellulóz hidrolizátuma mind eredeti, mind koncentrált formában jó szénforrás mindhárom vizsgált *Aspergillus* fermentációjához (*A. niger*, *A. foetidus*, *A. phoenicis*). Az elért β -glükózidáz aktivitás értékek meghaladják a kontroll szénforráson elértet (33).

- ◆ *Aspergillus niger* β -glükózidáz tartalmú fermentlevének felülúszója polietilén-glikol-dextrán vizes kétfázisú rendszerben az enzim tisztítása mellett kiválóan koncentrálható (35).

3.3 Az enzimes hidrolízis vizsgálata területén

Igazoltuk új, rekombinánsokkal előállított egyedi enzimkomponensek alkalmazhatóságát kristályos és amorf cellulóz szubsztrátokon. Előkezelt lignocellulózok tiszta enzimkomponensekkel végzett hidrolízisekor tisztáztuk a xilanáz és xiloglükánáz adagolás szerepét. Csak részben sikerült igazolnunk azt a hipotézisünket, hogy jobb konverziót érhetünk el, ha az enzimfermentáció szénforrása és az enzimes hidrolízis szubsztrátja azonos. Különböző lignocellulóz szubsztrátokon

igazoltuk a polietilén-glikol (PEG 4000) adagolásnak a nem-produktív enzimkötődés csökkentésére gyakorolt pozitív hatását.

Az alábbiakban részletezem a leglényegesebb eredményeinket, igazolásainkat, bizonyításainkat az enzimes hidrolízis területén.

3.3.1 Tisztított enzimkomponensekkel végzett hidrolízis kísérletek

♦ *Melanocarpus albomyces* eredetű tiszta enzimkomponensek, endoglükánáz (Cel7A) és cellobiohidroláz (Cel7B) együttes hatása mind Avicel (mikrokristályos cellulóz) mind Walsbeth cellulóz (foszforsavban duzzasztott cellulóz, PASC) hidrolízisekor szinergizmust mutat. Cellulózkötő alegységet is tartalmazó *M. albomyces* enzimkomponensek alkalmazásakor a hidrolízis konverziók javulnak, a javulás az endoglükánázok esetén jelentősebb (36).

♦ *Trichoderma* enzimkomponensekből (CBH I, CBH II és EG II) és *Aspergillus* eredetű β -glükozidázból készített „enzimkocktállal” végzett hidrolíziseinkben tisztított xiloglükánáz, valamint xiloglükánáz+ xilanáz kiegészítés hatását vizsgálva rámutattunk arra, hogy az előkezelt lignocellulózok glükán konverziója azáltal fokozható, hogy az enzim szubsztráthoz való hozzáférését gátló hemicellulóz réteget eltávolítjuk a cellulóz rostokról. A legjelentősebb javulás a nagy hemicellulóz tartalmú szubsztrátok esetében tapasztalható (37).

3.3.2 Különböző szénforrásokon fermentált celluláz aktivitású fermentlevek vizsgálata

♦ Megállapítottuk, hogy az enzimkomplexek összetételét jelentősen befolyásolja a fermentációban alkalmazott szénforrás minősége. A nagy xilán tartalmú szénforrások alkalmasak nagy fajlagos xilanáz és xilobiáz aktivitás létrehozására (38).

♦ A hemicellulózt is tartalmazó SF hidrolízisekor az alkalmazott enzimkomplex összetétele, míg a mikrokristályos tiszta cellulóz (Avicel) hidrolízisekor a cellulázok aktivitása a sebesség és konverzió meghatározó. Gőzrobbantott kukoricaszár hidrolízisekor a SF-hoz hasonlóan az enzimkomplex összetételének van jelentősége (39).

♦ Az enzimes hidrolízisben a β -glükozidáz aktivitás nemcsak a glükán, hanem a xilán konverziót is növeli valószínűleg azáltal, hogy a kis tagszámú oligószacharidok felhalmozódásának megakadályozásával csökkenti a termék inhibíciót a cellulázok illetve xilanázok működésekor (39).

♦ A hidrolízis eredmények elemzése szerint a glükánkonverzióra a β -glükozidáz, míg a xilánkonverzióra a β -glükozidáz mellett, a xilanáz aktivitásnak van szignifikáns hatása (39).

3.3.3 Az enzimek adszorpciójára és az enzimes hidrolízis konverziójára gyakorolt PEG hatás vizsgálata

♦ Gőzrobbantott lucfenyő enzimes hidrolízisekor polimerek adagolásával a cellulázok nem-produktív kötődése azáltal csökkenthető, hogy az adagolt PEG adszorbeálódik a lignin felületén ezáltal a celluláz mintegy fele (FPA) deszorbeálódik, illetve nem is kötődik és újra felhasználhatóvá válik a hidrolizátumban (40).

- ♦ A gőzrobbantott lucfenyőnél talált adszorpciót csökkentő hatás nem általános, függ a lignocellulóz szubsztráttól.
- ♦ A β -glükozidáz adszorpció, illetve az adszorpciót csökkentő PEG hatás a β -glükozidáz eredetének függvénye *Trichoderma* eredetű enzimek esetén mind az adszorpció, mind a PEG hatás jelentős, *Aspergillus* eredetű enzim esetében az adszorpció kisebb mérvű és a PEG hatás mérsékeltebb.

3.4 Etanol és biohidrogén előállítása területén

Igazoltuk különböző lignocellulóz nyersanyagok alkalmazhatóságát hidrogén és etanol fermentáció szénforrásaként. Kidolgoztuk az etanol koncentráció növelésének technológiáját lignocellulóz szubsztrátokon. Megállapítottuk, hogy az enzimes hidrolízishez közelítő hőmérsékleteken, valós szubsztátokon a termotoleráns *Kluyveromyces* törzsek nem erjesztenek jobban, mint a közönséges pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*). Az etanolfermentáció valós idejű detektálására kifejlesztettünk egy nyolc párhuzamos erjesztés egyidejű kivitelezését és detektálását lehetővé tevő rendszert.

Az alábbiakban részletezem a leglényegesebb eredményeinket az etanol és biohidrogén előállítása területén.

3.4.1 Hidrogén anaerob fermentációval történő előállítása

- ♦ Igazoltuk, hogy a különböző termofil hidrogéntermelők közül (*Thermotoga elfii*, *Thermotoga neapolitana*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*), amelyek mind képesek a papíriszap hidrolizátumot szénforrásként hasznosítani, a *C. saccharolyticus* felhasználása a legkedvezőbb, miután ennek az előző kettővel ellentétben nincs speciális só, nyomelem vagy élesztőextrakt igénye (41).
- ♦ Igazoltuk, hogy a *C. saccharolyticus* a kontroll táptalajon (glükóz+xilóz) elért hozammal összemérhető eredménnyel szaporítható papíriszap hidrolizátumon (42).

3.4.2 Etanol fermentáció

- ♦ Kifejlesztettünk egy olyan rendszert, mellyel jól reprodukálható körülmények között, nyolc párhuzamos erjesztést tudunk kivitelezni és detektálni egyidejűleg (43).
- ♦ Gőzrobbantással előkezelt lucfenyő szénforrás egyidejű hidrolízise és fermentációja során 5% szubsztrát koncentrációnál érhető el a legnagyobb hozam. Nagyobb szubsztrát koncentrációnál nem kielégítő a fermentáció (a megnövekedett inhibitor koncentráció következtében), kisebb szubsztrát koncentrációnál a jelentős tejsavképződés csökkenti a hozamot (44).
- ♦ Gőzrobbantással előkezelt kukoricaszár hemicellulóz hidrolizátuma (glükóz kiegészítéssel) *S. cerevisiae* ATCC 26602 inhibitor rezisztens törzsszel, az ipari termelésben elengedhetetlen alacsony pH-jú fermentációban hígítás nélkül erjeszthető. Fűzfa és lucfenyő esetében az erjesztés csak hígított hemicellulóz hidrolizátumon folytatható le. Az élesztőtörzs inhibitor tűrése folyamatos adaptációval tovább javítható (45).

- ♦ Termotoleráns *Kluyveromyces* törzsek kis inhibitor toleranciájuk miatt gőzrobbantott lignocellulóz szubsztráton nem alkalmasak a hosszú fermentációs időt igénylő szimultán hidrolízisre és fermentációra (46, 47, 48).
- ♦ Papírgyári iszapon mind a *K. marxianus*, mind a *S. cerevisiae* képes közepes hozammal etanolt fermentálni. A termofil *K. marxianus* lignocellulóz szubsztrátok SSF átalakításában emelt hőmérsékleten nem bizonyul jobb etanol termelőnek, mint a mezofil *S. cerevisiae* (48).
- ♦ Nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár felhasználásával többlépcsős szubsztrát adagolással megoldható a szubsztrát koncentráció olyan mértékű növelése, hogy az etanol koncentráció a fermentáció végén meghaladja a gazdaságos etanolkinyerés határértékét (49).
- ♦ Első és második generációs etanolelőállítás összekapcsolásával, hidrolizált búzadara és gőzrobbantással előkezelt búzaszalma felhasználásával elérhető a gazdaságos etanolkinyerés határértéke. A maximális etanol koncentrációhoz a szubsztrátot fele-fele arányban cellulóz illetve keményítő tartalmú nyersanyaggal kell biztosítani (50).

3.5 Cellulázok és különböző lignocellulóz komponensek felhasználása területén

Bizonyítottuk a celluláz enzimek alkalmazásának fontosságát a szekunder rostokat felhasználó technológiákban. Enzimesen kezelt takarmányokkal végzett etetési kísérletekkel igazoltuk a cellulázok pozitív hatását a nyulak fejlődésének kezdeti szakaszában. Bemutattuk a hemicellulóz adagolás pozitív hatását a tépőszilárdságra, a biodegradációra és a vízadszorpcióra keményítő alapú bioműanyagoknál.

Az alábbiakban részletezem a leglényegesebb eredményeinket, igazolásainkat, bizonyításainkat cellulázok papír- és takarmányipari alkalmazásakor, valamint a bioműanyagok tulajdonságainak javításánál.

3.5.1 Cellulázok papíripari felhasználása

- ♦ Celluláz enzimek hatékonyságát igazoltuk szekunder rostok víztelenedési tulajdonságainak javításában (28).
- ♦ Megállapítottuk, hogy a celluláz komponens szubsztrátkötő alegységének (CBD) megléte vagy hiánya a vizsgált szekunder rost- és papírjellemzőknél általában nem befolyásolja az elért hatást (28).
- ♦ Genetikailag módosított *T. reesei* QM9414 törzsek által, az endogén cellulázok glükóz-repressziója mellett szelektíven termelt TrCel7B (EG I) és TrCel7B katalitikus alegységét tartalmazó fermentlé alkalmas közvetlenül, azaz tisztítás és egyéb feldolgozás nélkül szekunder rostok víztelenedési tulajdonságainak javítására (29).

3.5.2 Nyúltáp cellulázos kezelése

Megállapítottuk, hogy celluláz-hemicelluláz enzimkiegészítés elősegíti fiatal nyulakban a tápanyagok feltárását és hasznosulását. A takarmánnyal bejuttatott celluláz-hemicelluláz enzimkomplex kedvező hatása elsősorban az elválasztást követő két hétben jelentkezik.

3.5.3 Lignocellulóz komponensek felhasználása bioműanyagok tulajdonságának javításában

Az izolált hemicellulóz (CFG - Corn Fibre Gum) a termoplasztikus keményítő (TPS) egyes tulajdonságainak javítására sikeresen felhasználható, miután adagolásának hatására a TPS minta vízádszorpciója és biodegradációja csökken, szakítószilárdsága növekszik (7).

Legfontosabb tudományos eredményeim mellett feltétlenül említésre méltónak tartom, hogy: Magyarországon elsőként sikerült megalapoznom a második generációs lignocellulóz alapú üzemanyagetanol gyártás kutatói bázisát nemzetközi együttműködésben, hazai és nemzetközi pályázatokkal az infrastruktúrától a személyi feltételekig. Elért tudományos eredményeink nemcsak hazánkban, de világviszonylatban ismertek és elismertek. A témavezetésem mellett végzett doktoránsok Európa jelentős kutatóintézeteiben és egyetemein (Svédország, Dánia, Finnország) posztdoktorként tevékenykedtek ill. dolgoznak jelenleg is.

4 Közlemények, melyekre az értekezés épül

1. Kálmán, G., Varga, E., Réczey, K. (2002) Dilute sulphuric acid pretreatment of corn stover at long residence times. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 16:151-157.
2. Varga, E., Szengyel, Z., Réczey, K. (2002) Chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100:73-88.
3. Varga, E., Schmidt, A.S., Réczey, K., Thomsen, A.B. (2003) Pretreatment of corn stover using wet oxidation to enhance enzymatic digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104:37-50.
4. Varga, E., Réczey, K., Zacchi, G. (2004) Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113:509-523.
5. Gáspár, M., Kálmán, G., Réczey, K. (2007) Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. *Process Biochemistry*, 42,:1135-1139.
6. Gáspár, M., Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K. (2005) Fractionation and utilisation of corn fibre carbohydrates. *Process Biochemistry*, 40:1183-1188.
7. Gáspár, M., Benkő, Z., Dogossy, G., Réczey, K., Czigány, T. (2005) Reducing water adsorption in compostable starch-based plastic. *Polimer Degradation and Stability*, 90:563-569.
8. Benkő, Z., Andersson, A., Szengyel, Z., Gáspár, M., Réczey, K., Stålbrand, H. (2007) Heat extraction of corn fiber hemicellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137:253-265.
9. Kálmán, G., Recseg, K., Gáspár, M., Réczey, K. (2005) Novel approach of corn fiber utilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 131:738-750.

10. Kálmán, G., Juhász, T., Réczey, K. (2006) Lignint és rostolajat tartalmazó készítmény és eljárás annak előállítására. Magyar Szabadalom, Lajstromszám: P0400804.
11. Kálmán, G., Réczey, K. (2008) Consecutive aqueous extraction of wet-milled corn germ cake. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22:221-226.
12. Gyalai-Korpos, M., Feczák, J., Réczey, K. (2008) Sweet sorghum juice and bagasse as possible feedstock for bioethanol production. *Hungarian Journal of Industrial Chemistry*, 36:43-48.
13. Sipos, B., Réczey, J., Somorai, Z., Kádár, Z., Dienes, D., Réczey, K. (2009) Sweet sorghum as feedstock for ethanol production: Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153:151-162.
14. Sebestyén, Z., Kádár, Z., Réczey, I. (2008) Lehet-e a kender a bioetanol gyártás alapanyaga? *Műszaki Kémiai Napok'08, Veszprém*, Konferencia kiadvány, 321-325.
15. Sipos, B., Kreuger, E., Svensson, S.E., Réczey, K., Björnsson, L., Zacchi, G. (2010) Steam pretreatment of dry and ensiled industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 34:1721-1731.
16. Barta, Z., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Dienes, D., Ballesteros, M., Réczey, K. (2010) Refining of hemp hurds into fermentable sugars or ethanol. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 24:331-339.
17. Szijártó, N., Kádár, Z., Varga, E., Thomsen, A.B., Costa-Ferreira, M., Réczey, K. (2009) Pretreatment of reed by wet oxidation and subsequent utilization of the pretreated fibers for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 155:386-396.
18. Soós, N., Szengyel, Z., Réczey, K. (2004) Energiafű felhasználása alternatív energiaforrásként. *Műszaki Kémiai Napok'04, Veszprém*, Konferencia kiadvány, 148-142.
19. Réczey, K., Szengyel, Z., Eklund, R., Zacchi, G. (1996) Cellulase production by *T. reesei*. *Biorecourse Technology*, 57:25-30.
20. Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Szengyel, Z., Zacchi, G., Réczey, K. (1997) Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 20:286-293.
21. Szengyel, Z., Zacchi, G., Réczey, K. (1997) Cellulase production based on hemicellulose hydrolysate from steam-pretreated willow. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63-65:351-362.
22. Szengyel, Z., Zacchi, G., Varga, A., Réczey, K. (2000) Cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30 using steam-pretreated spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86:679-691.
23. Szijártó, N., Faigl, Z., Réczey, K., Nézes, M., Bercsényi, A. (2004) Cellulase fermentation on a novel substrate (waste cardboard) and subsequent utilization of home-produced cellulase and commercial amylase in a rabbit feeding trial. *Industrial Crops and Products*, 20:49-57.
24. Réczey, K., Bollók, M., Brumbauer, A., Varga, A., Frankó, T. (1998) Utilization of paper mill sludge for cellulase enzyme production and in enzymatic

hydrolysis. *10th European Conference and Technology Exhibition: Biomass for Energy and Industry, Würzburg, Germany*, Proceedings, 638-640.

25. Juhász, T., Szengyel, Z., Szijártó, N., Réczey, K. (2004) Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113-116:201-211.

26. Egyházi, A., Dienes, D., Réczey, K., Simándi, B. (2004) Examination of cellulase enzyme production by *Trichoderma reesei* Rut C30 using supercritical carbon dioxide cell disruption. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 18:257-261.

27. Szijártó, N., Szengyel, Z., Lidén, G., Réczey, K. (2004) Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 as a response to addition of cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113:115-124.

28. Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K. (2004) Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. *Industrial Crops and Products*, 20:11-21.

29. Dienes, D., Börjesson, J., Stålbbrand, H., Réczey, K. (2006) Production of *Trichoderma reesei* Cel7B and its catalytic core on glucose medium and its application for the treatment of secondary fibers. *Process Biochemistry*, 41:2092-2096.

30. Dienes, D., Börjesson, J., Häggglund, P., Tjerneld, F., Lidén, G., Réczey, K., Stålbbrand, H. (2007) Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:1087-1094.

31. Benkő, Z., Drahos, E., Szengyel, Z., Puranen, T., Vehmaanperä, J., Réczey, K. (2007) *Thermoascus aurantiacus* CBHI/Cel7A production in *Trichoderma reesei* on alternative carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136-140:195-204.

32. Flachner, B., Brumbauer, A., Réczey, K. (1999) Stabilization of β -glucosidase in *Aspergillus phoenicis* QM 329 pellets. *Enzyme and Microbial Technology*, 24: 362-367.

33. Réczey, K., Brumbauer, A., Bollók, M., Szengyel, Z., Zacchi, G. (1998) Use of hemicellulose hydrolysate for β -glucosidase production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72:225-235.

34. Juhász, T., Kozma, K., Szengyel, Z., Réczey, K. (2003) Production of beta-glucosidase by mixed culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30. *Food Technology and Biotechnology*, 41:49-53.

35. Johansson, G., Réczey, K. (1998) Concentration and purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger* by using aqueous two-phase partitioning. *Journal of Chromatography*, 711:161-172.

36. Szijártó, N., Siika-aho, M., Tenkanen, M., Alapuranen, M., Vehmaanperä, J., Réczey, K., Viikari, L. (2008) Hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose by heterologously produced cellulases of *Melanocarpus albomyces*. *Journal of Biotechnology*, 136:140-147.

37. Benkő, Z., Siika-aho, M., Viikari, L., Réczey, K. (2008) Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 43:109-114.

38. Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-aho, M., Viikari, L. (2005) Characterisation of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, 40:3519-3525.
39. Sipos, B., Benkő, Z., Dienes, D., Réczey, K., Viikari, L., Siika-aho, M. (2010) Characterisation of the specific activities and hydrolytic properties of the cell-wall degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* RUT C30 on different carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161:347-364.
40. Sipos, B., Schleicher, Á., Perazzini, R., Dienes, D., Crestini, C., Siika-aho, M., Réczey, K. (2010) Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam pretreated spruce in the presence of poly(ethylene glycol). *Enzyme and Microbial Technology*, 47:84-90.
41. Kádár, Z., de Vrije, T., Szengyel, Z., Claassen, P.A.M., Réczey, K. (2003) Hidrogén, mint alternatív üzemanyag. *Műszaki Kémiai Napok'03, Veszprém, Konferencia kiadvány*, 372-377.
42. Kádár, Z., de Vrije, T., van Noorden, G.E., Budde, M.A.W., Szengyel, Z., Réczey, K., Claassen, P.A.M. (2004) Yields from glucose, xylose, and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113:497-508.
43. Gyalai-Korpos, M., Kádár, Z., Geier, J., Réczey, I. (2007) Etanol fermentáció nyomon követésének lehetőségei laboratóriumi körülmények között – Fermentációs online monitoring rendszer bemutatása. *Műszaki Kémiai Napok'07, Veszprém, Konferencia kiadvány*, 29-33.
44. Sternberg, K., Bollók, M., Réczey, K., Galbe, M., Zacchi, G. (2000) Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*, 68:204-210.
45. Kádár, Z., Maltha, S.F., Szengyel, Z., Réczey, K., de Laat, W. (2007) Ethanol fermentation of various pretreated and hydrolyzed substrates at low initial pH. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137:847-858.
46. Bollók, M., Réczey, K. (2000) Screening of different *Kluyveromyces* strains for simultaneous saccharification and fermentation. *Acta Alimentaria*, 29:59-70.
47. Bollók, M., Réczey, K., Zacchi, G. (2000) Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86:69-80.
48. Kádár, Z., Szengyel, Z., Réczey, K. (2004) Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*, 20:103-110.
49. Varga, E., Klinke, H.B., Réczey, K., Thomsen, A.B. (2004) High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol, *Biotechnology and Bioengineering*, 88:567-573.
50. Erdei, B., Barta, Z., Sipos, B., Réczey, K., Galbe, M., Zacchi, G. (2010) Ethanol production from mixtures of wheat straw and wheat meal. *Biotechnology for Biofuels*, 3:16.