

dc_22_10

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Lignocellulózok biofinomítása és
konverziója második generációs üzemanyagalkohollá

Réczey Istvánné Csorba Katalin

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék
2012

Tartalomjegyzék

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2 BEVEZETÉS	8
3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
3.1 A lignocellulóz alapú etilalkohol gyártás potenciális nyersanyagai	11
3.1.1 Cellulóz.....	12
3.1.2 Hemicellulózok	12
3.1.3 Lignin.....	12
3.2 A lignocellulózok szerkezete	13
3.3 Lignocellulóz biomassa előkezelése.....	13
3.3.1 Fizikai előkezelés	14
3.3.2 Kémiai előkezelés.....	14
3.3.3 Biológiai előkezelés	15
3.3.4 Fiziko-kémiai előkezelések	15
3.4 Különböző lignocellulózok előkezelése	16
3.4.1 Kukoricaszár	17
3.4.2 Kukoricarost	18
3.4.3 Cukorcirok bagasz	19
3.4.4 Kender	19
3.4.5 Kenderpozdorja	20
3.5 Celluláz fermentáció	20
3.5.1 <i>Trichoderma reesei</i>	21
3.5.2 <i>T. reesei</i> eredetű cellulázok és működési mechanizmusuk.....	21
3.5.3 Enzim expresszió szabályozása	22
3.5.4 Fermentáció körülményeinek hatása a celluláz termelésre.....	23
3.6 Béta-glükozidáz fermentáció	24
3.7 Lignocellulózok enzimes hidrolízise	26
3.7.1 Cellulóz hidrolizáló enzimek.....	27
3.7.2 Segítő enzimek - hemicellulázok	28
3.7.3 Cellulázok és hemicellulázok együttműködése lignocellulózok hidrolízisében	28
3.7.4 Felületaktív anyagok és polimerek hatása az enzimes hidrolízisre	29
3.8 Etanol- és hidrogénfermentáció.....	30
3.8.1 Hidrogénfermentáció	30
3.8.2 Etanolfermentáció.....	31
4 FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	34
4.1 Nyersanyagok, szubsztrátok, szénforrások	34
4.1.1 Az előkezelések során alkalmazott nyersanyagok	34
4.1.2 Az enzimfermentáció során alkalmazott szénforrások.....	34
4.1.3 Az enzimes hidrolízis és SSF során alkalmazott szubsztrátok.....	35
4.1.4 Szekunder rost az enzimes kezelésekhez	36
4.2 Alkalmazott mikroorganizmusok.....	36
4.3 Felhasznált enzimek.....	37
4.3.1 Alkalmazott ipari enzimek	37
4.3.2 Celluláz aktivitású fermentlevek	38
4.3.3 Tisztított (egyedi) enzimkomponensek	38
4.4 Enzimaktivitás mérési módszerek	38

4.5 Lignocellulózok előkezelése	40
4.5.1 Kémiai előkezelések	40
4.5.2 Előkezelések gőzrobbantással, illetve nedves oxidációval	40
4.5.3 Előkezelés mikrohullámú reaktorban.....	41
4.6 Enzimes hidrolízis.....	41
4.6.1 Az előkezelések hatékonyságának meghatározására.....	41
4.6.2 Enzimes hidrolízis egyedi enzimkomponensekkel	41
4.6.3 Enzimes hidrolízis saját fermentlevekkel	42
4.6.4 PEG hatásának vizsgálata az enzimes hidrolízisben	42
4.7 Fermentáció	42
4.7.1 Enzimfermentáció.....	42
4.7.2 Hidrogénfermentáció	43
4.7.3 Etanolfermentáció.....	44
4.8 Cellulázok és lignocellulóz komponensek felhasználása egyéb iparokban	45
4.8.1 Szekunder rostok kezelése	45
4.8.2 Takarmányok enzimes kezelése	46
4.8.3 Lignocellulóz komponensek felhasználása bioműanyagok tulajdonságának javításában	46
4.9 Analitika	46
4.9.1 Nyersanyagok makrokomponenseinek meghatározása	46
4.9.2 HPLC analízis	47
4.9.3 Méretkizárásos kromatográfia (SEC).....	47
4.9.4 Redukálócukor tartalom meghatározása	47
4.9.5 Fehérjetartalom meghatározás	47
4.9.6 Glükóz, ammónia meghatározás enzim kittel.....	48
4.10 Számítások, a módszerek pontossága	48
5 EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	49
5.1 Lignocellulózok előkezelése, frakcionálása.....	49
5.1.1 Kukoricaszár előkezelése	49
5.1.2 Kukoricarost frakcionálása.....	60
5.1.3 Cukorcirok bagasz előkezelése.....	67
5.1.4 Kender és kenderpozdorja előkezelése	70
5.1.5 Egyéb lignocellulózok előkezelése	78
5.2 Enzim fermentáció.....	81
5.2.1 Szénforráskísérletek <i>Trichoderma reesei</i> Rut C30 gombatörzsszel	81
5.2.2 A celluláztermelést befolyásoló tényezők, enzimlokalizáció, indukció	91
5.2.3 Cellulázfermentáció rekombináns <i>Trichoderma</i> kkal	95
5.2.4 Béta-glükózidázal kapcsolatos kutatások	99
5.3 A lignocellulózok enzimes hidrolízisével kapcsolatos kutatások.....	102
5.3.1 Kísérletek egyedi enzimkomponensekkel	103
5.3.2 Különböző szénforrásokon fermentált celluláz aktivitású fermentlevek és ipari enzimkészítmények vizsgálata lignocellulózok és tiszta cellulázok hidrolízisében	109
5.3.3 PEG adagolás hatása a lignocellulózok enzimes hidrolízisére és a celluláz komponensek adszorpciójára (40. cikk).....	112
5.4 Etanol és biohidrogén fermentatív előállítás	115
5.4.1 Biohidrogén fermentáció (41., 42. cikk)	115
5.4.2 Etilalkohol fermentáció	116
5.5 Cellulázok és különböző lignocellulóz komponensek felhasználása egyéb iparokban.....	128
5.5.1 Cellulázok papíripari felhasználása	128
5.5.2 Cellulázok alkalmazása a takarmányozásban	132
5.5.3 Lignocellulóz komponensek alkalmazása bioműanyagok egyes tulajdonságának javításában (24. cikk)	132
6 ÖSSZEFOGLALÁS.....	134

6.1	A lignocellulózok előkezelése	134
6.2	Enzimfermentáció.....	136
6.3	Az enzimes hidrolízis vizsgálata	137
6.4	Biohidrogén és etanol előállítása.....	138
6.5	Cellulázok és különböző lignocellulóz komponensek felhasználása egyéb iparokban.....	139
7	TÉZISEK	140
7.1	A lignocellulózok előkezelése területén.....	140
7.1.1	Kukoricaszár előkezelése	140
7.1.2	Kukoricarosttal végzett frakcionálási kísérletek	140
7.1.3	Cukorcirok bagasz előkezelése.....	141
7.1.4	Kender és kenderpozdorja vizsgálata.....	141
7.1.5	Balatoni nád előkezelése	141
7.1.6	Energiafű előkezelése	141
7.2	Celluláz és β-glükózidáz fermentáció területén.....	142
7.2.1	Szénforráskísérletek	142
7.2.2	A celluláztermelést befolyásoló tényezők vizsgálata	143
7.2.3	Rekombináns <i>Trichoderma</i> kkal végzett fermentációk	143
7.2.4	β -glükózidázzal kapcsolatos kísérleteink	143
7.3	Az enzimes hidrolízis vizsgálata területén	144
7.3.1	Tisztított enzimkomponensekkel végzett hidrolízis kísérletek	144
7.3.2	Különböző szénforrásokon fermentált celluláz aktivitású fermentlevek vizsgálata	144
7.3.3	Az enzimek adszorpciójára és az enzimes hidrolízis konverziójára gyakorolt PEG hatás vizsgálata	145
7.4	Etanol és biohidrogén előállítása területén.....	145
7.4.1	Hidrogén anaerob fermentációval történő előállítása.....	145
7.4.2	Etanol fermentáció.....	145
7.5	Cellulázok és különböző lignocellulóz komponensek felhasználása területén	146
7.5.1	Cellulázok papíripari felhasználása	146
7.5.2	Nyúltáp cellulázos kezelése.....	146
7.5.3	Lignocellulóz komponensek felhasználása bioműanyagok tulajdonságának javításában	147
8	KÖZLEMÉNYEK, MELYEKRE AZ ÉRTEKEZÉS ÉPÜL	148
9	IRODALOMJEGYZÉK.....	152

1 Rövidítések jegyzéke

Ac-195-15	Savkatalizált 195°C-os nedves oxidációs előkezelés, 15 perc
ACE	Alap celluláz enzim keverék (CBH I + CBH II + EG II + BGL)
AFEX	Ammóniás szál robbantás / Ammonia fiber explosion
Alk-195-15	Lúgkatalizált 195°C-os nedves oxidációs előkezelés, 15 perc
Alk-185-5	Lúgkatalizált 185°C-os nedves oxidációs előkezelés, 5 perc
AMG	Amiloglikozidáz
ARP	Ammónia perkoláció és visszanyerés / Ammonia recycle percolation
ATCC	American Type Culture Collection
BGL	β -glükózidáz
BSA	Marha szérum albumin / Bovine serum albumin
BTL	Biomasszából folyadék / Biomass to liquid
CBB	Coomassie Brilliant Blue reagents
CBD/CBM	Cellulóz kötő régió / Cellulose binding domain / module
CBH	Cellobiohidroláz
cF	Betöményített hemicellulóz frakció / Concentrated filtrate
CF	Kukoricarost / Corn fiber
CFG	Kukoricarost gumi / Corn fiber gum
CGF	Kukorica fehérje takarmány / Corn gluten feed
CIEMAT	Centre for Energy-Related, Environmental and Technological Research (Madrid, Spanyolország)
CMC	Karboxi-metil-cellulóz
c _{sav}	Kénsav koncentráció
DCF	Keményítő mentes kukoricarost / Destarched corn fiber
DHH	Detoxifikált hemicellulóz hidrolizátum
DMC	Közvetlen mikrobiológiai átalakítás / Direct microbial conversion
DNS	Dinitroszalicilsavas reagents
DO	Oldott oxigén / Dissolved oxygen
DP	Polimerizáció fok / Degree of polymerization
E/S	Enzim : szubsztrát arány
EC	Enzyme Commission
EG	Endoglükanáz
EG I	Endoglükanáz I enzim
EG II	Endoglükanáz II enzim
ENEA	Italian National Agency for New Technologies, Energy and Sustainable Economic Development (Trisaia, Olaszország)
ETBE	Étil-tercier-butil-éter
F (HH)	Szűrlet / Filtrate (hemicellulóz hidrolizátum); Pentóz frakció, Folyadékfrakció

dc_22_10

FAO	Az ENSZ Élelmezési és Mezőgazdasági Szervezete / Food and Agricultural Organization
FOSHU	Funkcinális élelmiszerek / Foods for specified health use
FPA	Szűrőpapír lebontó aktivitás / Filter paper activity
FPLC	Gyors fehérje folyadékkromatográfia / Fast protein liquid chromatography
FPU	Szűrőpapír lebontó aktivitási egység / Filter paper unit
GH	Glükózid-hidroláz
GPD	Glicerinaldehyd-foszfát-dehidrogenáz
GTL	Gázból folyadék / Gas to liquid
h	Óra / Hour
HEC	Hidroxi-etil-cellulóz
HMF	Hidroxi-metil-furfurol
HPLC	Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia / High-performance liquid chromatography
IEF	Izoelektromos fókuszálás
IU	Enzimegység / International unit
IU/ml	Enzimegység/ml / International Unit/ml
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kDa	Kilo dalton
KSH	Központi Statisztikai Hivatal
Mt	Molekulatömeg
OCC	Újrahasznosított karton hulladék / Old corrugated cardboard
OECD	Gazdasági Együttműködési és Fejlesztés Szervezete / Organization of Economic Co-operation and Development
PASC	Foszforsavban duzzasztott cellulóz / Walseth cellulóz
PCF	Előkezelt kukoricarost / Pretreated corn fiber
PDA	Burgonya-glükóz-agar / Potato-dextrose agar
PEG 4000	Polietilén glikol (Mt: 4000)
pI	Izoelektromos pont
pNPC	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-cellobiozid
pNPG	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glükopiranozid
PSF	Előhidrolizált Solka Floc / Prehydrolysed Solka Floc
PWM	Előhidrolizált búzaliszt / Presaccharified wheat meal
RI	Törésmutató index / Refractive index
S	Szubsztrát / Substrate
SDS-PAGE	Na-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis / Sodium dodecylsulphate polyacrilamide gelelectrophoresis
sec	Másodperc / Secundum
SEC	Méretkizárásos kromatográfia / Size exclusion chromatography
SF	Solka Floc (ligninmentesített, csökkentett hemicellulóz tartalomú lucfenyő cellulóz)

dc_22_10

SHF	Szeperált hidrolízis és fermentáció / Separate hydrolysis and fermentation
SPAS	Gőzrobbantott nyárfa / Steam pretreated aspen
SPCS	Gőzrobbantott kukoricaszár / Steam pretreated corn stover
SPH	Gőzrobbantott kender / Steam prtetreated hemp
SPHH	Gőzrobbantott kenderpozdorja / Steam prtetreated hemp hurds
SPHS	Gőzrobbantott silózott kender / Steam pretreated hemp silage
SPOW	Gőzrobbantott tölgyfa / Steam pretreated oak wood
SPS	Gőzrobbantott lucfenyő / Steam pretreated spruce
SPSSB	Gőzrobbantott cukorcirok bagasz / steam pretreated sweet sorghum bagasse
SPW	Gőzrobbantott fűz / Steam pretreated willow
SPW-D 4%	Gőzrobbantott fűz 4%-os H ₂ O ₂ -dal ligninmentesítve / Steam pretreated willow delignified with 4% H ₂ O ₂
SPW-D 4%, H 48h	Gőzrobbantott fűz 4%-os H ₂ O ₂ -dal ligninmentesítve, majd enzimesen hidrolizálva / steam pretreated willow delignified with 4% H ₂ O ₂ and enzymatically hydrolysed
SPW-D 50%	Gőzrobbantott fűz 50%-os H ₂ O ₂ -dal ligninmentesítve / Steam pretreated willow delignified with 50% H ₂ O ₂
SPW-H 24h	Gőzrobbantott fűz 24 órás enzimes hidrolízis után / Steam pretreated willow enzymatically hydrolysed
SPW-H 48h	Gőzrobbantott fűz 48 órás enzimes hidrolízis után / Steam pretreated willow enzymatically hydrolysed
SSF	Egyidejű cukrosítás és fermentáció / Simultaneous saccharification and fermentation
sz.a. / D.M.	Szárazanyag tartalom / Dry matter
T	Hőmérséklet
t	Reakcióidő
tf	Térfogat
TPS	Termoplasztikus keményítő / Thermo plasticized starch
TrCel7B	<i>Trichoderma reesei</i> EG I
TrCel7Bcore	<i>Trichoderma reesei</i> EG I katalitikus mag (domén)
V	Reakciótérfogat
Vinasz	Etanol-, vagy sűtőélesztőfermentáció besűritett fermentációs (desztillációs) maradéka
WIS	Vízoldhatatlan szilárd anyag / Water-insoluble solid
WOCS	Nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár / Wet-oxidised corn stover
XG	Xiloglükánáz
XL	Xilanáz
XO	Xilooligoszacharid
Y _{ethanol}	Etanol hozam [g/g szénhidrát]

2 Bevezetés

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, ezzel 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 növényi biomassza a szén, a földgáz és a kőolaj után a negyedik legnagyobb mennyiségben előforduló energiaforrás. A Földön található teljes élő anyag becsült mennyisége nedvességtartalommal együtt közel 2000 milliárd tonna (Whittaker és Likens, 1975). Magyarországon a biomassza teljes mennyisége 350-360 millió tonna, az ebből évente újratermelődő mennyiség 105-110 millió tonna (Energiatermelés biomasszából, 2007). Ennek bruttó energiataralma 1100-1200 PJ, ami jócskán felülmúlja hazánk energiafelhasználását. Ebből a potenciális készletből hazánkban a ténylegesen energiatermelésre felhasználható biomassza becsült mennyisége ágazatonként a következő: növénytermesztés 4-4,5 millió tonna, erdőgazdaság 3-4 millió tonna, állattenyésztés 1,8-2,3 millió tonna, élelmiszeripar 150-200 ezer tonna, települési hulladék 25-30 millió tonna (Bai és mtsi., 2002).

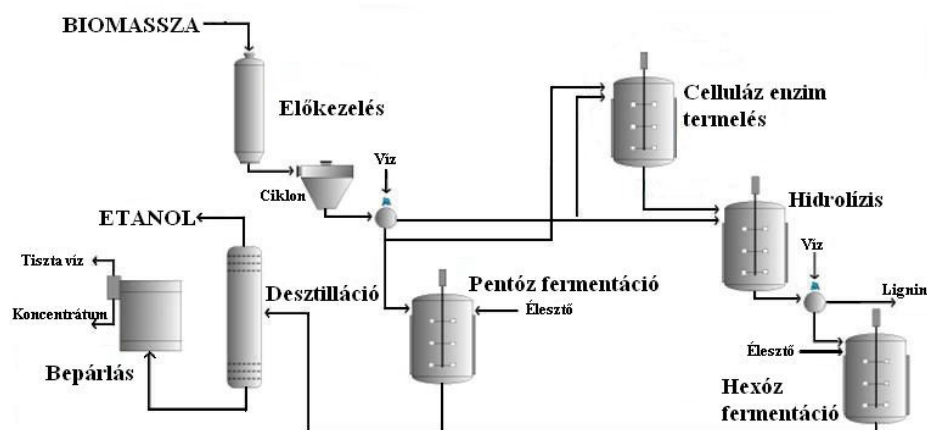
A biomassza energetikai célú felhasználására a közvetlen égetésen kívül a bioüzemanyagok előállítása jelenthet megoldást. Ezek előnye, hogy a nettó üvegházhatású gáz kibocsátásuk kicsi, így csökkenthető az üzemanyagok környezetre (pl. az éghajlatváltozásra) gyakorolt negatív hatása. Mivel a megújuló nyersanyagok földrajzi eloszlása viszonylag egyenletes, a fosszilis energiahordozókkal nem rendelkező országok energiafüggősége hosszútávon megszüntethető. Egyúttal a biomassza lokális feldolgozásával lehetőség van vidéki munkahelyek teremtésére, ami csökkentheti a centralizált területek és ezen régiók közti gazdasági különbségeket (Hahn-Hägerdal és mtsi., 2006).

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 eljárások, melyek a biomassza gázosítása után Fischer-Tropsch szintézissel állítják elő az ún. „biocrude”-ot, melynek hidrokrakkolásával nyerik a GTL üzemanyagot, könnyűbenzint, paraffint és kenőanyagokat. A bioüzemanyagok közül a bioetanolt és a biodízelt már ma is használjuk többnyire benzinhez, illetve dízelolajhoz keverve. A biodízelt növényolajból átészterezéssel, 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 cellulóz 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.

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. A szerkezetet ezért valamilyen előkezeléssel fel kell lazítani. Ez történhet fizikai, kémiai, fiziko-kémiai, illetve biológiai módszerekkel. Az előkezelések hatékonysága mérhető a rostfrakcióban feldúsult cellulóz enzimes bonthatóságával, a hidrolizátum erjeszthetőségével, és/vagy a folyadék frakcióban lévő cukrok mennyiségével, felhasználhatóságával.



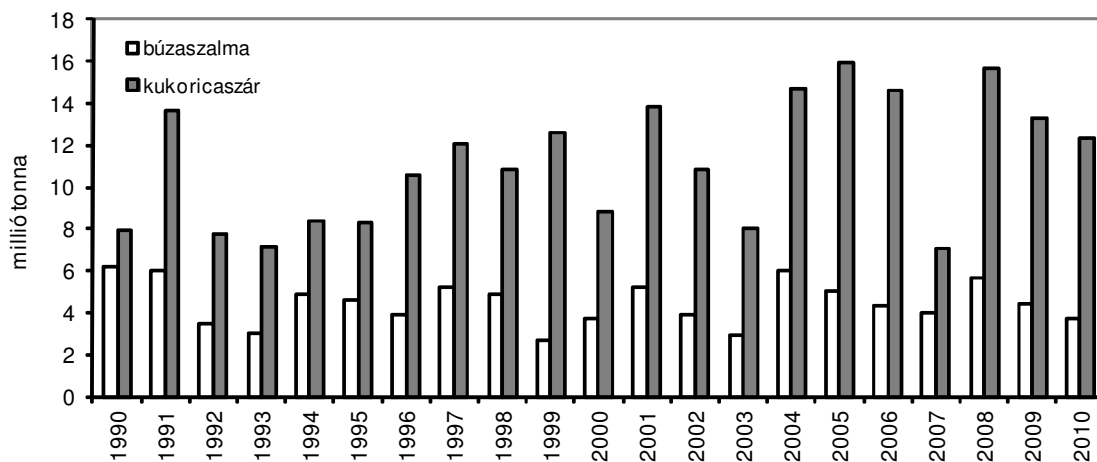
1. ábra Második generációs etil-alkohol előállításának technológiai sémája

A fellazított polimer szerkezet ezt követően hidrolizálható enzimek vagy vegyszerek felhasználásával. Utóbbira példa az egy- vagy kétlépcsős híg savas, előbbire pedig a kereskedelmi vagy saját fermentálású enzimekkel végrehajtott enzimes hidrolízis. Korábban a hígsavas hidrolízis, napjainkban az enzimes technológia (1. ábra) megvalósulása látszik valószínűnek. Egyre több kísérleti és demonstrációs üzem kezdi meg működését búzaszalmát, erdészeti hulladékot és egyéb lignocellulózokat használva fel nyersanyagául. Kanada, USA, Svédország, Dánia, Norvégia, Finnország, Spanyolország már rendelkezik működő kísérleti üzemmel (Bacovsky és mtsi., 2011). Az enzimes technológiák előnye, hogy a környezetet kevésbé terhelik, emellett az enzimes reakciók szelektívek, enyhe körülmények között valósulnak meg, s így nem következik be a keletkező cukrok bomlása, mely a savas technológiákban gyakran előfordul. A hidrolízis eredményeképpen kapott monoszacharidok mikroorganizmusok segítségével (pl. *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*) etanollá fermentálhatók, amely desztillációt követően üzemanyagként felhasználható.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A lignocellulóz alapú etilalkohol gyártás potenciális nyersanyagai

Magyarország mezőgazdasági melléktermékei közül a kukoricaszár és a búzaszalma együttes éves mennyisége 15-20 millió tonna (2. ábra). Meggyőződésem, hogy az első lignocellulóz alapú etanolgyár mezőgazdasági, vagy agroipari mellékterméket fog elsődleges nyersanyagául felhasználni, ezért vizsgáltuk a kukoricaszár, kukoricarost, búzaszalma, cukorcirok bagasz, kenderpozdorja felhasználhatóságát. Miután kutatómunkánk nagy részét skandináv együttműködésben folytattuk, az ott rendelkezésre álló nyersanyagokat (fűzfa, fenyőfa) is felhasználtuk. Emellett a kender, a nád, az energiafű, mint termesztett, illetve megtermő teljes növény kerültek a vizsgálandó nyersanyagok közé.



2. ábra Búzaszalma és kukoricaszár hazai éves becsült mennyisége a KSH gabonatermés adatai alapján (<http://portal.ksh.hu>)

A cellulóz tartalmú biomassza, vagyis a lignocellulózok a növény fajtájától és érettségi fokától függően eltérő mennyiségben tartalmaznak cellulózt, hemicellulózt és lignint, mely három polimer adja a szárazanyag 85-90%-át. A lignocellulózok jellemzően 40-50% cellulózból, 25-30% hemicellulózból és 15-20% ligninből állnak (Wyman és mtsi., 2005), melyek mellett ásványi anyagok, olajok, fehérjék, egyéb poliszacharidok is megtalálhatók bennük. Az egyes növények fő lignocellulóz komponenseinek arányát az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat Lignocellulóz nyersanyagok összetétele (100% sz.a.-ra vonatkoztatva)

Nyersanyag	Glükán	Xilán	Galaktán	Arabinán	Mannán	Lignin
Fűzfa (keményfa) ¹	41,5	15,0	2,1	1,8	3,0	23,3
Lucfenyő (tülevelű) ²	49,9	5,3	2,3	1,7	12,3	28,7
Kukoricaszár ³	37,2	21,1	3,0	6,1	-	26,0
Búzaszalma ⁴	32,6	20,1	0,8	3,3	0	24,2

¹Sassner és mtsi., 2005, ²Söderström és mtsi., 2003, ³Öhgren és mtsi., 2006b, ⁴Linde és mtsi., 2008

3.1.1 Cellulóz

A növényi biomassza legnagyobb hányadát, mintegy 40%-át a cellulóz polimerek alkotják. A cellulóz homopoliszaharid, legkisebb ismétlődő egysége a cellobióz, mely két β -1,4-kötéssel kapcsolódó glükóz molekula dimerje, benne a glükóz monomerek egymáshoz képest 180° -kal elforgatva helyezkednek el. A cellulóz hosszú (100-15 000 glükóz egységnyi) lineáris polimer, mely inter- és intramolekuláris hidrogén kötések kialakítására nagymértékben hajlamos, az így stabilizált makromolekula nagyfokú rendezettséggel jellemezhető, vízben oldhatatlan, kémiaiilag stabil és enzimeknek is viszonylag ellenálló. Az elsődleges sejtfalban a cellulóz rostok átmérője jellemzően 3 nm. A cellulózt a roston belül kristályos és amorf (parakristályos) részek alkotják.

3.1.2 Hemicellulózok

Az élő és az egyházi növényekben a hemicellulózok alkotják a biomassza 25-35%-át. A hemicellulózok mindazon nem keményítő jellegű poliszaharidok, melyek magasabb rendű növények elsődleges és másodlagos sejtfalában a cellulózzal asszociálva fordulnak elő és lúggal kiextrahálhatók (Schulze, 1891). Polimerizációs fok és összetétel tekintetében nagy változatosságot mutatnak. A lánchossz általában kisebb, mint cellulóz esetében, ugyanakkor nagyszámú oldallánc helyezkedik el a fő vázon, így a hemicellulózok kevésbé kristályos, reaktívabb molekulák. Legfőbb alkotóelemeik az L-arabinóz, D-galaktóz, D-glükóz, D-glükuronsav, D-mannóz és D-xilóz, de ezen kívül L-fukóz, L-rhamnóz és L-galaktóz is megtalálható oldalláncaikban.

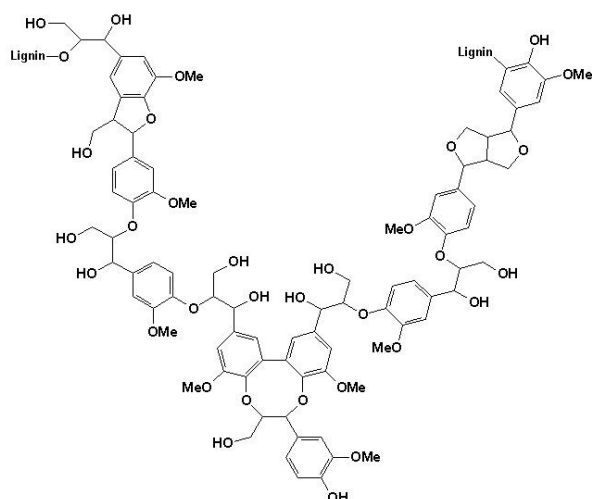
A hemicellulózok a cellulóz láncokat beburkolva védik, illetve összeköttetést biztosítanak a cellulóz láncok és a lignin régiói között.

A főlánc alapján megkülönböztetünk xilánokat, mannánokat, vegyes kötésű β -glükánokat, xiloglükánokat és arabinogalaktánokat (Ebringerová és mtsi., 2005).

3.1.3 Lignin

A lignin a fenil-propán alegységekből felépülő nagyon változatos aromás polimerek gyűjtőneve (Ralph és mtsi., 2004). Három fenil-propán származék, a *p*-kumaralkohol, a koniferil-alkohol és a szinapil-alkohol a fő alkotóelemei, melyeket a ligninben *p*-hidroxifenil, guaiacil és sziringil csoportoknak nevezik. Ezekből képződik enzim katalizált polimerizációs reakcióban az amorf, elágazó szerkezetű, éter és szén-szén kötésekkel tartalmazó lignin hálózat (3. ábra).

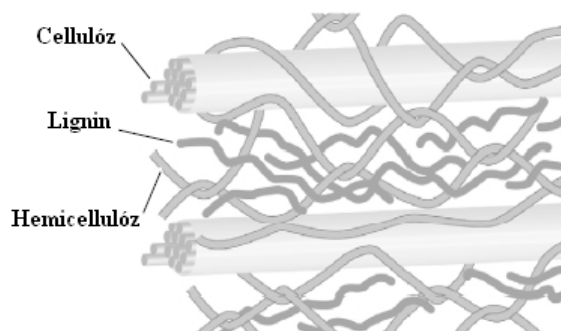
A lignin szerkezetének bonyolultsága miatt azt a mai napig nem sikerült egzakt módon leírni. A lignin a hemicellulózzal együtt impregnálja a cellulóz rostokat a másodlagos sejtfalban (Christiernin, 2006). Szerepe a sejtfal erősítésében, a növények stabilitásának biztosításában van. Nagy mennyiségben található a középső lamellában is, ahol egyfajta „ragasztóanyag” szerepét tölti be, a sejtek összekapcsolásáért felelős (Suhas és mtsi., 2007).



3. ábra Lignin polimer szerkezetének sematikus ábrázolása

3.2 A lignocellulózok szerkezete

A lignocellulóz szerkezet mikroorganizmusoknak és vegyszereknek egyaránt rendkívül ellenálló, mely a bioetanol célú feldolgozást jelentősen megnehezíti. Ennek az ellenállóságnak a legfőbb okai magában a szerkezetben keresendők, azaz az epidermális szövetek erősségében, a szállítónyalábok sűrűségében és elhelyezkedésében, a lignin mennyiségében, a sejtfal komponensek szerkezeti inhomogenitásában és komplexitásában, az enzimek számára nehezen hozzáférhető oldhatatlan szubsztrátban és a sejtfalban jelen lévő, vagy valamely technológiai folyamat során képződő fermentációs inhibitorok jelenlétében (Himmel és mtsi., 2007). A másodlagos sejtfal három fő komponensének, a cellulóznak, hemicellulóznak és ligninnek a „térbeli” elhelyezkedését szemlélteti a 4. ábra.



4. ábra Lignocellulózok fő alkotóelemeinek egymáshoz viszonyított elhelyezkedése (SciDAC review, 2009)

3.3 Lignocellulóz biomassza előkezelése

Miután a cellulóz a lignocellulózokban komplex struktúrában, hemicellulózzal és ligninnel átszőve van jelen, ahhoz, hogy enzimesen hidrolizálni tudjuk, a lignocellulóz szerkezetet fel

kell lazítani. Ezt a fellazítást nevezzük előkezelésnek. Ennek célja a lignin és hemicellulózok részleges vagy teljes eltávolítása, a cellulóz kristályosságának csökkentése, és a porozitás növelése. A ligninmentesítéssel jelentősen növelhető a hidrolízis sebessége (McMillan, 1994), mert a lignin gátolhatja az enzimeknek a szubsztráthoz történő hozzáférését a hidrolízis során. Emellett felületén irreverzibilisen kötődhetnek hidrolitikus enzimek (Berlin és mtsi., 2006; Palnonen és mtsi., 2004; Börjesson és mtsi., 2007), így csökkenhet az aktív enzim koncentrációja, mely szintén a hidrolízis sebesség csökkenéséhez vezet. A hemicellulózok oldatba vitele kettős célt szolgál, egyrészt a cellulóz rostok felszínéről eltávolítva azokat, nő a cellulázok számára hozzáférhető szubsztrátfelület (Wyman, 1996), másrészt, mivel a lignint a cellulózhoz kötik, kioldásukkal a lignin egy része is eltávolítható, vagy a cellulóz-lignin kapcsolat fellazítható. Az előkezelés erősségének növelésével az előkezelt szilárd anyagban maradó xilán tartalom általában csökken, a folyadék fázisban xilooligomerek, xilóz (és esetleges degradációs termékei) jelennek meg, egyúttal nő a cellulóz enzim bonthatósága is (Kabel és mtsi., 2007).

A jó előkezelés kritériumai, hogy a cellulóz hozzáférhetőségének javítása mellett ne keletkezzenek olyan melléktermékek, melyek a hidrolízis (Palmqvist, 1996), vagy az alkohol fermentáció (hidrogénfermentáció) lépésében inhibitorként viselkedhetnek (Klinke és mtsi., 2004; Palmqvist és Hahn-Hägerdal, 2000a,b). Az előkezelés alapvetően négy féle lehet: fizikai, kémiai, biológiai és fiziko-kémiai, emellett lehetőség van az egyes előkezelések kombinációjára is.

3.3.1 Fizikai előkezelés

A fizikai előkezelés célja a szemcseméret csökkentése őrléssel illetve darálással. Ezeknek energiaigénye általában nagy, ezért ipari méretben nem lehetnek gazdaságos eljárások (Datta, 1981). Takács és mtsi. (2000) gammasugárzás alkalmazásával növelték a cellulóz szubsztrát fajlagos felületét, s csökkentették a kristályosságot, de nem tapasztaltak bonthatóság javulást a kezelés hatására.

A legegyszerűbb előkezelés az ún. „hidrotermolízis”, vagy „aquasolv” eljárás, melynek során az alapanyagot vízzel keverik, majd 200°C körüli hőmérsékleten termosztálják kb. 15 percig (van Walsum és mtsi., 1996). Ezzel a módszerrel a ligninnek és a hemicellulózoknak egy része oldatba megy, a módszer hatékonyságát növeli, ha savas vagy lúgos katalizátort is alkalmazunk, ekkor az eljárást híg savas, illetve lúgos előkezelésnek nevezzük. A savak elsősorban a hemicellulózt viszik oldatba, a lúgok inkább a lignint.

3.3.2 Kémiai előkezelés

A kémiai előkezelések egyik lehetséges módja az ózonnal történő lignin bontás, mely szobahőfokon, légköri nyomáson végbemegy, és alkalmazása során nem keletkeznek toxikus melléktermékek. Ez a módszer azonban az ózon használata miatt nagyon költséges. A gyakorlatban nagyobb jelentőségű a savas vagy lúgos hidrolízis. Előbbire jellemző példa a kénsavval végrehajtott híg savas előkezelés, mely kivitelezhető nagy hőmérsékleten folyamatos üzemű reaktorban kis szárazanyag koncentráció mellett, illetve alacsonyabb hőmérsékleten, szakaszos reaktorban nagy szárazanyag koncentrációval (Schell és mtsi. 1992). A lúgos előkezelés során a hemicellulózok közötti észterkötések elszappanosodása okozza a szerkezet fellazulását (Hespell, 1998; Doner és Hicks, 1997; Doner és mtsi., 1998). Az ammóniás vagy nátrium-hidroxidos kezelés hatékonysága a nyersanyag lignintartalmától függ. Mezőgazdasági melléktermékek kezelésére általában alkalmasabb, mint fás anyagokra (Galbe és Zacchi, 2007). Kim és Holtzaple (2005) mezőgazdasági melléktermékek

kezelésére a kalciumhidroxidot találta a legalkalmasabbnak. A kémiai előkezelések nagy előnye, hogy egyszerű kémiai laboratóriumban kivitelezhetők, és viszonylag egyszerű eszközökkel megvalósíthatók méretnövelt rendszerekben is. Az utóbbi években az ionos folyadékokat (pl. 3-metil-N-butilpiridinium klorid) “zöld oldószerekként” használták előkezelésre. Dadi és mtsi. (2006) azt tapasztalták, hogy az ionos folyadékokkal történő kezelés hatására a szénhidrátok és a lignin egyaránt oldódnak, de nem degradálódnak. Yang és Wyman (2008), kiknek lignocellulózok hasznosítására vonatkozó munkássága több évtized óta töretlen, egyelőre kételkednek, hogy az ionos folyadékok jelentik-e az áttörést a lignocellulózok előkezelésében. További lehetőség a kémiai előkezelésre a szerves oldószerek alkalmazása („organoszolv” eljárás), ebben az esetben szerves oldószert vagy annak vizes elegyét használják valamilyen szervesetlen sav katalizátor jelenlétében a hemicellulózok és a lignin közti kötések bontására, a lignin oldatba vitelére.

3.3.3 Biológiai előkezelés

Biológiai előkezelés alatt többnyire mikrobiológiai lignin eltávolítást értünk. Leginkább különböző gombákat használnak e célra (*Trametes*, *Polyporus*, *Plaeotus* nemzetségből), melyek oxido-reduktáz enzimeik révén (mangán-peroxidázok, lakkázok, lignin-peroxidázok) bontják a lignint (Valanskova és mtsi., 2007). Hátrányuk egyrészt, hogy nemcsak a lignint támadják meg, hanem gyakran a cellulózt és a hemicellulózokat is, így az előkezelés során cukor veszteség jelentkezhet, másrészt, hogy a kezelések nagyon időigényesek (Wyman, 1996; Lynd és mtsi., 1999).

3.3.4 Fiziko-kémiai előkezelések

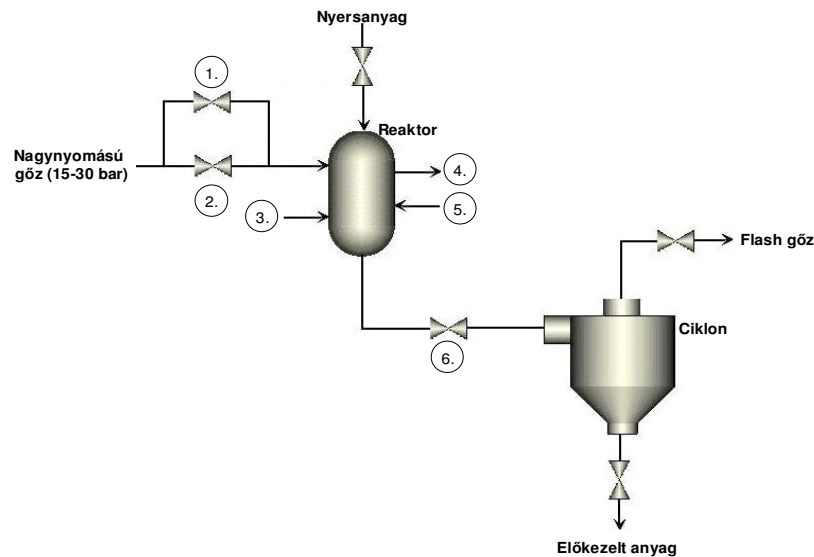
A leggyakrabban alkalmazott előkezelések a fiziko-kémiai csoportba tartozó gőzrobbantás, nedves oxidálás és ammóniás robbantás (AFEX - Ammonia Fiber EXplosion).

Az **AFEX** kezelés során nagy hőmérsékleten (~90°C) és nyomáson folyékony ammóniával (1-2 kg ammónia / kg nyersanyag) kezelik a nyersanyagot, majd a nyomást hirtelen lecsökkentik. E módszer előnye a lúgos kezeléssel szemben, hogy az ammónia, illékonyasága következtében, a folyamat végén könnyen visszanyerhető (Wyman és mtsi., 2005). Az előkezelt nyersanyagot nem szükséges méregteleníteni (detoxifikálni), sőt a rostokban maradó ammónia az etanolfermentáció során a mikroorganizmusok számára hasznosítható (Teymouri és mtsi., 2005). Elsősorban az USA-ban alkalmazzák, kizárólag mezőgazdasági melléktermékek és fűfélék előkezelésére. Különösen sok eredmény fűződik kukoricaszár előkezelése kapcsán Bruce Dale kutatócsoportjának munkásságához (Alizadeh és mtsi., 2004; Garlock és mtsi., 2009; Bals és mtsi., 2011; Li és mtsi., 2011).

Nedves oxidáció során nagy hőmérsékleten (150-200°C-on) vizes közegben, nagynyomású oxigénnel vagy levegővel kezelik a nyersanyagot (Schmidt és Thomsen, 1998). A folyamat katalízise céljából lehetséges gyenge sav vagy lúg alkalmazása. A kezelés eredményeként cellulózban gazdag szilárd fázist, és hemicellulózokban, illetve hemicellulóz hidrolízis termékeiben gazdag folyadékfázist kapunk. Az eljárást elsősorban Dániában alkalmazzák a RISØ kutatóintézetben búzaszalma előkezelésére.

Gőzrobbantás (5. ábra) során az aprított nyersanyagot néhány percig nagynyomású (0,69-4,83 MPa) telített gőzzel kezelik, majd a nyomást hirtelen atmoszférikusra csökkentik, minek következtében a rostok szerkezete egyfajta robbanás mellett fellazul (Schultz és mtsi., 1983; Saddler és mtsi., 1993; Allen és mtsi., 2001). A nagy hőmérsékletnek köszönhetően (160-260°C) a hemicellulózok egy része hidrolizál és oldatba megy, a lignin részben átalakul, így a cellulóz jobban hozzáférhetővé válik. Az előkezelés hatékonyságát befolyásoló tényezők

a hőmérséklet, tartózkodási idő, a nyersanyag szemcsemérete és nedvességtartalma (Galbe és Zacchi, 2007).



5. ábra Gőzrobbantó berendezés

1: szabályozó szelep, 2: közvetlen gőzbevezető szelep, 3-4-5: kis nyomású gőz (1 bar) be- és kivezetés, 6: a reaktor alsó szelepe

A keményfák és egyes lágyszárú növények esetében a gőzrobbantás bizonyult az egyik leghatékonyabb előkezelési módszernek. Ennek ellenére hátrányai is vannak. Az alapanyag bomlásából gyakran képződnek olyan inhibitor komponensek, melyek a későbbi fermentáció vagy hidrolízis lépésében a mikroorganizmusokat, illetve az enzimeket gátolják (Hendriks és Zeeman, 2009; Sun és Cheng, 2002). Ilyen inhibitorok a pentózokból keletkező furfurool, a glükózból keletkező hidroximetil-furfurool (HMF), az ezek további bomlásából keletkező hangyasav, a hemicellulózból felszabaduló ecetsav, valamint a savoldható ligninből származó aromás komponensek (Stenberg, 2000). Kénsav, kéndioxid vagy széndioxid katalizátor adagolásával javítható a hemicellulóz hidrolízise és a cellulóz enzimes bonthatósága, emellett visszaszorítható bizonyos inhibitorok keletkezése (Tenborg és mtsi., 1998; Puri és Mamers, 1983).

A gőzrobbantás optimális körülményeinek laboratóriumi meghatározására alkalmazható módszer a mikrohullámú kezelés (Palm és Zacchi, 2003), melynek kicsi az anyag- és energiaigénye, emellett gyors, így tájékozódó mérésekhez jól használható. Néhány lignocellulóz esetében a mikrohullámú előkezelés hatékonyabbnak bizonyult az összehasonlításra alkalmazott lúgos kezeléseknél (Doner és Hicks, 1997; Doner és mtsi., 1998; Zhu és mtsi., 2005, 2006). Emellett a módszer a hemicellulóz izolálás eszköze is lehet (Lundqvist és mtsi., 2002, 2003). Mikrohullámú kezelés során a hemicellulóz oldatba megy a lignin egy része pedig depolimerizálódik.

3.4 Különböző lignocellulózok előkezelése

Bärbel Hahn-Hägerdahl, aki az európai lignocellulóz kutatás egyik úttörője, helyesen állapítja meg, hogy nincs általános érvényűen javasolható előkezelési módszer a különböző lignocellulóz nyersanyagokra, annak optimális körülményeit minden nyersanyagra külön-

külön kell meghatározni (Hahn-Hägerdahl és mtsi., 2006). Ennek értelmében a következőkben néhány, hazánkban jelentőséggel bír, de mindeztideig egyáltalán nem, vagy csak nagyon keveset vizsgált nyersanyag előkezelési lehetőségeit foglalom össze.

3.4.1 Kukoricaszár

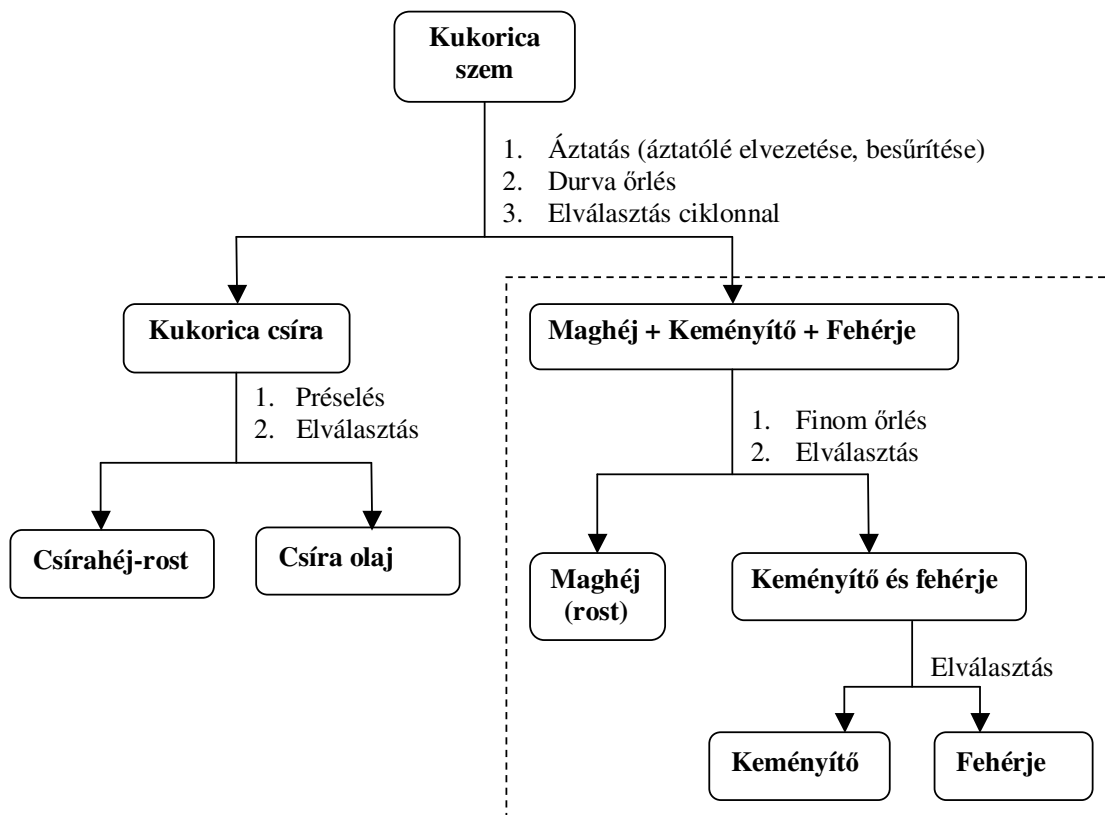
A kukoricatermesztés során a szemterméshez képest jó másfélszeres mennyiségben keletkező kukoricaszár hasznosításának megoldása elsődleges fontosságú, mennyisége ugyanis hazánkban 8-10, estenként 14 millió tonna évente. A világon évente 520 millió tonna (sz.a.) kukoricaszár képződik, melynek egy részét ugyan a talajerózió megakadályozása céljából vissza kell juttatni a talajba, de a fennmaradó, felhasználható hányad így is jelentős (Kim és Dale, 2004).

Míg a különböző tülevelű és keményfa nyersanyagok előkezelésével az 1980-as 90-es évektől kezdődően az USA-ban, Kanadában és Svédországban intenzíven foglalkoztak a kutatók (Dekker, 1987; Eklund és mtsi., 1994; Saddler és mtsi., 1982), a kukoricaszár előkezelésével és hasznosításával főként csak az USA kutatói foglalkoztak az ezredfordulót megelőző időben.

Torget és mtsi. (1991) 0,92% kénsav koncentráció alkalmazásával 160°C-on 10% sz.a. tartalom mellett kezeltek kukoricaszárat. Az előkezelést követő enzimes hidrolízis során 91%-os glükánkonverziót értek el, de az előkezelés alatt bekövetkezett tetemes glükánvesztesség (25%) következtében az enzimes hidrolízisben a glükóz kinyerése az elméleti maximumnak csak 68%-a volt (kb. 31 g glükóz/100 g kukoricaszár). Az eredmények értékét tovább csökkenti, hogy mindehhez 2 mm-nél kisebbre aprított nyersanyagot és nagy, 42 FPU/g glükán enzimdózist alkalmaztak. A szerzők sem a hidrolizátum erjeszthetőségét, sem az inhibitorok koncentrációját nem vizsgálták. Schell és mtsi. (1992) szerint 20-30% szárazanyag tartalom mellett végzett híg (1%) kénsavas előkezelést követően el lehet érni 85-96%-os enzimes konverziót, ehhez 3,2 mm-nél kisebbre aprított kukoricaszárra, 180°C reakcióhőmérsékletre és 40 FPU/g sz.a. enzimdózisra van szükség (sajnos a cikkben szénhidrát veszteségi adatokat nem adnak meg). Öhgren és mtsi. (2005, 2006a,b, 2007a,b) kukoricaszár gőzrobbantásakor kísérletet tettek a teljes folyamat (gőzrobbantás, cukrosítás és erjesztés) optimalizálására. Savkatalizált gőzrobbantást követően (T=190°C, t=10 perc) ipari celluláz enzimekkel és pékélesztővel végzett egyidejű cukrosítással és erjesztéssel (SSF) az elméleti etanol kitermelés 70%-át ritkán tudták meghaladni. Ezt szignifikánsan meghaladó, 73-80% közötti etanol kitermelést csak a hidrolízist segítő hemicellulázok alkalmazásával tudtak elérni. Teymouri és mtsi. (2005) AFEX kezelést (90°C-on 5 perc 1 kg ammónia/kg sz.a.) követően 15 FPU/g glükán enzim dózis alkalmazásával 95%-os (38,5 g/100 g sz.a.) glükóz kinyerést értek el, s a cefrét 96%-ban erjeszthetőnek találták. Ezek egyéb előkezelésekkel összehasonlítva rendkívül jó eredmények. Az AFEX előkezelést követően a lignocellulóz egyik frakcióját sem választották el, s az alkalmazott celluláz enzimkomplex a xilán 80%-át is hidrolizálta. Kim és mtsi. (Kim és mtsi., 2003; Kim és Lee, 2005, 2006) folyamatos technológiában használtak folyékony ammóniát; az eljárást „ammónia perkoláció és visszanyerés” (Ammonia Recycle Percolation – ARP) –nek nevezték. Ennek során jelentős lignin depolimerizációt tapasztaltak, a glükán veszteség viszont mindössze 7-8% volt. A szerzők, Teymouri és mtsi. (2005) eredményeihez hasonlóan az elméleti maximumot közelítő eredményt kaptak az előkezelt cellulóz enzimes bonthatóságát illetően.

3.4.2 Kukoricarost

A kukorica nemcsak takarmány- és élelmiszeripari növényünk, hanem mintapéldája a jövőben remélhetőleg egyre jobban elterjedő megújuló nyersanyagoknak is. A szemtermés ipari célú feldolgozáskor az első lépés az aprítás, ez történhet száraz- vagy nedvesőrléses technológiával. Ez utóbbit akkor alkalmazzuk, ha a szem valamely alkotórészének, például a keményítőnek tiszta formában történő kinyerése a cél. A Hungrana Keményítő és Izocukorgyártó Kft 3000 t/nap kapacitással dolgoz fel kukoricát, s állít elő keményítőt, glükózt, izocukrot, nagy fruktóz tartalmú szirupot és etilalkoholt. A kukoricarost (maghép) keletkezésének folyamata a 6. ábrán látható.



6. ábra A kukoricaszem feldolgozásának folyamata

A kukoricarostot az egyéb kukoricafeldolgozási melléktermékekhez (áztatólé, fehérjefrakció, desztillációs maradék) keverve CGF (corn gluten feed) takarmánnyként értékesítik. Napjainkban a megnövelt kapacitás következtében fellépő CGF eladási nehézségek miatt tüzipelletet is állítanak elő a rostból, melyet más agropelletekhez hasonlóan értékesítenek.

Ezen felhasználási lehetőségekre kínál alternatívát a rost további frakcionálása. A kukoricarost savas előkezelése azon technológiákban lehet fontos, ahol a mono-és diszacharidokra hidrolizált hemicellulóz további átalakítása a cél, pl. alkohollá (Grohman és Bothast, 1997), xilitté (Rao és mtsi., 2006), astaxanthinná (Nghiem és mtsi., 2009). Singh és mtsi. (2003) 121°C-os, híg kénsavas kezeléssel a szilárd frakció 76,1%-át vitték oldatba, mialatt a szilárd maradék kukoricarostolaj tartalma az eredeti 1,4-ről 12,2%-ra nőtt.

A lúgos kezelésekkel a hemicellulóz frakció polimer formában történő kinyerése a cél. Rutenberg és Herbst (1957) keményítő mentesített kukoricarost $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -os kezelésével (70°C , 16 h) 28,2%-os hemicellulóz-B kitermelést ért el. Watson és Williams (1959) 1 órással refluxszal 35,1%-ra javította a konverziót. A keletkezett hemicellulóz sárga színű volt, s mint azt Saulnier és mtsi. (1995) kimutatták, hemicellulóz színét a hozzá kapcsolódó fehérje és lignin okozza, ezért célszerű ezen komponenseket eltávolítani. Doner és mtsi. (1997) hemicellulóz-B kukoricarostból való izolálása során az extraháláshoz használt lúgos közegben peroxidot is alkalmaztak, melynek pozitív hatása mind a kinyert hemicellulóz világosabb színén, mind pedig a kitermelés hatásfokán (51%) megmutatkozott. Vizsgálataik szerint az előkezelésnél alkalmazott lúg típusa jelentősen befolyásolja az alkoholos csapadékképzéssel izolálható hemicellulóz-B színét (Doner és mtsi., 1998). A fenti kezelések célja kizárólag a CFG izolálása, vagy a rostolaj kinyerése volt, egyik szerző sem foglalkozott a hemicellulóz frakció eltávolítása után nyert rost vizsgálatával, hasznosításával.

3.4.3 Cukorcirok bagasz

A legújabbkori üzemanyagcélú etilalkohol előállítás Brazíliából indult az 1970-es évek elején az első olajválság hatására. Brazíliában cukornádból gazdaságosan állítanak elő üzemanyag alkoholt, a technológia során melléktermékként keletkező bagaszt (kipréselt cukornád szár) elégetik, s ezzel biztosítják az etanol előállítási technológia energiaigényét. Amikor a klímaváltozás és egyéb környezetvédelmi, energetikai problémák miatt Európa is komolyabban kezdett foglalkozni üzemanyag célú etanol kutatásával, előtérbe került a „legjobb európai nyersanyag” kiválasztásának problémája is (Negro és mtsi., 1999). Miután a cukorcirok Dél - Európában jó termésátlagokkal rendelkezik (Sree és mtsi., 1999), felmerült ennek a növénynek is az alkoholcélú felhasználása. A cukornádhoz hasonlóan a növény szára tartalmazza a közvetlenül erjeszthető cukoroldatot, mely szacharózból, glükózból és fruktózból gazdag, s mely a szárból préseléssel nyerhető ki. A visszamaradó lignocellulóz présmaradék, melyet cukorcirok bagasznak nevezünk, átlagosan 36-38% cellulózt, 24-28% hemicellulózt és 18-20% lignint tartalmaz. A cukorciroklé erjesztésével hektáronként mintegy 6000 liter etanol nyerhető, mely mellett 15 tonna szerkezeti poliszacharid is keletkezik a préselési maradékból (Dolciotti és mtsi., 1998). Manapság még a direkt égetéssel történő energiatermelés (Monti és Venturi, 2003) az elterjedtebb, de ennek gátja a nagy hamutartalom, mely az égetésnél problémát okozhat (Monti és mtsi., 2008). Az utóbbi években elkezdődtek mind a cukornád-, mind a cukorcirok bagasz egyéb (nem égetés) felhasználását célzó kutatások. A cukorcirok bagasznak takarmány illetve más anyagokkal együtt komposztálva, talajjavító hasznosításáról Negro és mtsi. (1999) számolnak be. Antonopoulou és mtsi. (2008) biogáztermelésre, Belayachi és Delmas (1997) papír előállításra használta fel a cukorcirok bagaszt.

3.4.4 Kender

A kender nem is olyan régen Magyarország értékes rosnövénye volt, több ezer hektáron termesztették és több gyárban dolgozták fel, elsősorban kötelet állítva elő belőle. Az 1990-es évek elején a piacok beszűkültek és a kendertermesztés csaknem megszűnt. Napjainkban, egyelőre csak a kutatás területén, új felhasználási lehetőségek jelentkeztek: alkalmazhatjuk a kenderrostot mint kompozit erősítő szálát, vagy a kendert (teljes növény) mint „energianövényt” közvetlenül elégetve. A kender nagy biomassza hozama és szárazságtűrése (Struik és mtsi., 2000) a figyelmet a kender energianövényként való felhasználására irányították. Amennyiben energianövénynek termesztjük, a betakarítási időt 1-2 hónappal célszerű kitolni a maximális hektáronkénti szárazanyaghozam elérése érdekében (Keller és

mtsi., 2001). A kendert nagy cellulóztartalma következtében megfelelő előkezelés után második generációs etanolgyártás alapanyagául is felhasználhatjuk.

Garcia-Jaldon és mtsi. (1998) gőzrobbantással kívánták elősegíteni a rostok jobb elválasztását, és lúgos áztatás után 200°C-on 90 sec tartózkodási időt találtak optimálisnak. Nykter és mtsi. (2008) 185°C-on két perces kezeléssel a cellulóz tartalmat 60%-ról 74%-ra, míg pektinázos kezeléssel 78%-ra tudták növelni. Az előkezelt kenderminták enzimes bonthatóságát és a hidrolizátum erjeszthetőségét egyik cikkben sem vizsgálták.

Shin és Shung (2008) elektron surárral kezelve kívánták az enzimes hidrolizálhatóságot javítani, de csak a xilán bonthatósága javult, a cellulózé nem.

3.4.5 Kenderpozdorja

A kender feldolgozása során a klasszikus technológia szerint különválasztjuk a rostot és a közbülső fás maradékot, a kenderpozdorját. Ez utóbbit korábban főként bútortalpak előállítására használták, manapság pedig jó nedvszívó tulajdonsága miatt alomként hasznosítják. Vignon és mtsi. (1995) a kenderpozdorját kénsavas impregnálás után gőzrobbantással kezelték annak érdekében, hogy a szénhidrátok elválasztását és a lignin-mentesítést elősegítsék. A kezelés hatásosságát optikai és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal, valamint nyersanyag analízissel ellenőrizték. 220-230°C-on 3 perces reakcióidővel jól elválasztható szénhidrátfrakciót nyertek 53%-os glükán tartalommal. Az előkezelt pozdorja enzimes bonthatóságát nem vizsgálták. Moxley és mtsi. (2008) 84%-os H₃PO₄-val 50°C-on végzett 60 perces kezeléssel, majd acetonos frakcionálással enzimesen kiválóan bontható rostot nyertek. Zhang (2008) a foszforsavas előkezelést, a szükséges nagy savkoncentráció dacára a jövőbeni biofinomítási technológiák alapjának tekinti, s az alacsony hőmérsékletet, kémiai stabilitást, könnyű recirkulálhatóságot emeli ki pozitívumként az ionos folyadékok használatával történő összevetésben.

3.5 Celluláz fermentáció

A kereskedelmi célú celluláztermelés, amely alapvetően szubmerz fermentációval történik, a 70-es évek elején kezdődött, majd az 1980-as években jelentek meg az első nagy volumenű ipari alkalmazások. A cellulázok felhasználása azóta is töretlenül növekszik, 23 000 tonnás éves termelésükkel és 125 millió USD éves forgalmukkal manapság vezető helyet foglalnak el az ipari enzimek piacán (Bhat és Bhat, 1997). Napjainkban az élelmiszeripar, a sörgyártás, borászat, a takarmány-, a papír- és a textilipar, valamint a kutatás-fejlesztési ágazatok használnak nagy mennyiségben cellulázokat. Ugyanakkor valószínű, hogy az üzemanyagok előállításának lignocellulózból kiinduló technológiai hamarosan átveszik a vezető helyet a celluláz enzimeket legnagyobb mennyiségben alkalmazó eljárások sorában. A másodgenerációs bioetanol versenyképességének egyik gátló tényezője a kereskedelmi enzimek magas ára, mely esetleg csökkenthető a technológiába integrált a helyszínen (on-site) történő enzimelőállítással. A lignocellulóz alapú etilalkohol előállítás egyik fontos lépése a sejtfal polimerek hidrolízise, melyhez a szükséges enzimek előállítása fermentációs úton történik. A legfontosabb enzimek a cellulóz hidrolíziséért felelős cellulázok, melyek termelésére több aerob és anaerob baktérium és gombafaj is képes.

Mivel a gombák extracellulárisan termelik ezen enzimeket, s az enzimkomplex jó arányban tartalmazza a különböző endo- és exoglukanázokat, az ipar gomba eredetű cellulázokat gyárt és forgalmaz. (A legnagyobb enzimgyártó és forgalmazó a Novozymes A/S Dániában). A cellulolitikus enzimtermelés a gombafajok széles spektrumára jellemző, melyek között

kiemelt helyet foglalnak el a *Trichoderma*, *Penicillium* és *Aspergillus* fajok. Galbe és Zacchi (2002) szerint a gomba-cellulázok kutatása területén Mandels és Sternberg úttörő munkát végzett, amikor is 14 000 gombafajt gyűjtöttek össze és jellemztek. A vizsgált mikrobák közül a cellulóz hidrolízisében a *Trichoderma* bizonyultak a leghatékonyabbnak.

3.5.1 *Trichoderma reesei*

A *Trichoderma reesei* egy, a talajban, ill. növényi hulladékon élő mezofil lágy korhadást okozó gomba, mely egyike a legjobb extracelluláris celluláz-termelőknek, ezért széles körben tanulmányozott cellulolitikus szervezet. A II. világháború idején a Solomon szigeteken izolálták először, miután a Csendes óceán déli részének trópusi területein az USA hadserege a pamut ruházatok, sátrak és homokzsákok rongálódását tapasztalta. Ennek okát kutatva izolálták a romlásért felelős *T. reesei* törzset, melyet QM6a-val jelöltek. Eredeti elnevezése *Trichoderma viride* volt, azonban később kimutatták, hogy a QM6a törzs morfológiailag eltér a többi *T. viride* törzstől, így új fajként, *T. reesei* néven azonosították.

A két leggyakrabban alkalmazott *T. reesei* törzs a QM9414 (ATCC 26921) és a Rut C30 (ATCC 56765), mindkettő jó celluláztermelő mutáns. A QM9414-et az 1970-es évek elején Mandels izolálta (Mandels, 1975), fermentorban a QM6a-hoz képest kétszeres enzimaktivitást és produktivitást ért el vele. A törzs bár mutáns, a *T. reesei* cellulázok indukciós és expressziós kísérleteinek kedvelt anyaga. A Rut C30 többlépcsős mutáció eredménye (Montenecourt és Eveleigh, 1979) produktivitása jelentősen meghaladja a QM6a-ét. A *T. reesei* Rut C30-as törzs nem glükóz represszált, mivel a glükóz represszióért felelős *cre1* gén mutáns formáját hordozza (Ilmén és mtsi., 1996). A törzs további jelentősége, hogy a celluláz expresszió háromszor nagyobb, mint a vad törzs esetében.

3.5.2 *T. reesei* eredetű cellulázok és működési mechanizmusuk

Celluláz enzimek azok a hidrolitikus enzimek, melyek a cellulóz hidrolízisét katalizálják. Míg a baktériumok többsége celluláz-komplexekeket, ún. celluloszómákat termel, mely közvetlen szubsztrát kontaktban fejti ki hatását, a gombák individuális celluláz enzimeket termelnek, melyek a hidrolízis során szinergisztikusan együttműködnek, ez érvényes a *T. reesei* cellulázokra is. A *T. reesei* a cellulázok széles spektrumát termeli, ezek közül hét genetikailag különbözött sikertelenül azonosítani (2. táblázat).

A *Trichoderma* cellulázok jellemző szerkezettel rendelkeznek, két régióból állnak. A katalitikus domént a cellulóz kötő domén (CBD) a linker régió köti össze, ami 22-44 aminosavból áll (Levy és mtsi., 2002). A linker régió egyrészt elválasztja egymástól a két domént, ugyanakkor bizonyos mozgékonyaságot is biztosít az enzimnek. Háromdimenziós szerkezetükről tudott, hogy míg a cellobiohidrolázok (CBH) csatorna alakú aktív centrummal rendelkeznek, addig az endoglukanázokra (EG) a hasadék forma jellemző. Ez egyben a működésük megértését is segíti. Az EG-ok a cellulóz láncot lánc közben bárhol, random módon hasítani képes endoenzimek, a CBH-ok pedig a lánc végéről cellobiózt lehasítani képes exoenzimek, utóbbi csatorna alakú aktív centrumába még befér a cellobióz egység, de az oligomer már nem. A β -glükozidázok (BGL), vagy cellobiázok (E.C. 3.2.1.21) szigorúan véve nem tartoznak a cellulázok közé, hiszen a cellulóz nem a szubsztrátjuk, jelenlétük a hidrolízisben azonban elengedhetetlen, ugyanis a cellobiózt hidrolizálják glükózzá.

A cellulázokat jellemzi az „endo-exo” típusú szinergizmus az EG és CBH együttműködése révén, valamint az „exo-exo” szinergizmus a két CBH között, mivel a Cel7A a redukáló vég felől, a Cel6A pedig a nem redukáló cellulóz vég felől kezdi a hidrolízist.

2. táblázat A *Trichoderma reesei* ismert cellulázai

Típus	GH elnevezés	Tradicionális elnevezés	E.C. szám	Mt [kDa]
Cellobiohidrolázok	Cel7A ^{1,2}	CBH I	EC 3.2.1.91	42
	Cel6A ³	CBH II		47
Endoglükanázok	Cel7B ⁴	EG I	EC 3.2.1.4	52
	Cel5A ⁵	EG II		48
	Cel12A ⁶	EG III		25
	Cel61A ⁷	EG IV		23
	Cel45A ⁸	EG V		34

¹Shoemaker és mtsi. (1983); ²Teeri és mtsi. (1983); ³Teeri és mtsi. (1987); ⁴Penttilä és mtsi. (1986); ⁵Saloheimo és mtsi. (1988); ⁶Ward és mtsi. (1993); ⁷Saloheimo és mtsi. (1997); ⁸Saloheimo és mtsi. (1994)

3.5.3 Enzim expresszió szabályozása

Míg a cellulolitikus baktériumokban a celluláz termelés konstitutív, gombákban csak akkor következik be, ha a celluláz termelést indukálják. A legtöbb eddig vizsgált mikroorganizmus esetében azt találták, hogy akkor a legintenzívebb a celluláz termelés, ha az inducer a cellulóz, mely egyben a fermentáció szénforrása is (Bhat és Bhat, 1997). Emellett a cellulázok termelődését több cukor oligomer és dimer, ill. azok származékai is kiváltják. A cello-oligoszacharidok, mint cellobióz, -trióz, -tetraóz, -pentaóz és -hexaóz, valamint a laktóz is inducere a cellulázok termelésének. A leghatékonyabb inducer a szoforóz, a β -1,2-es kötésű glükóz-dimer. A szoforóz 2500-szor nagyobb enzimtermelést okoz, mint a cellobióz (Sternberg és Mandels, 1979), a SF szoforózhoz hasonló mértékben indukálja a celluláz expressziót (Ilmén és mtsi., 1997). Az EG I és a BGL képes transzglikozilációval szoforózt előállítani, de ennek szerepe még nem tisztázott (Ilmén és mtsi., 1997; Fowler és Brown, 1992). A glicerin és a szorbitol nem idézi elő a cellulázok expresszióját, de nem is inhibeálja azt, így un. semleges C-forrásként használhatók (Ilmén és mtsi., 1997).

Az indukció mechanizmusát széles körben vizsgálták, az egyik fő kérdés, hogyan keletkezik a polimer cellulóz szubsztrátból egy oldható indukáló komponens, amely kiváltja a celluláz komplex expresszióját. Több modell is valószínűnek látszik. (i) Valamely celluláz komponens(ek) konstitutív termelődése bármely körülmények között, így glükóz-tartalmú táptalajon is bekövetkezhet. A represszor fehérjének a celluláz promóter célszekvenciájához való kötődése egyensúlyi folyamat lévén, okozhat nagyon alacsony szintű „konstitutív” expressziót (Mach és mtsi., 2003). (ii) A spóra felületén kötött cellulázok hatására végbemenő cellulóz degradáció generál inducert a celluláz gének expressziójához (Suto és Tomita, 2001; Schmoll és Kubicek, 2003).

T. reesei glikozil hidrolázok széles spektrumának termelésére képes, nem csak cellulázokéra. Cellulóz, szoforóz, xilobióz, xilán és L-arabitol szubsztrátokon az összes fontos hemicelluláz gén expressziója indukálható (Margolles-Clark és mtsi., 1997). Mivel a cellulóz és hemicellulázok a természetben többnyire együtt fordulnak elő, így a gomba megfelelő mechanizmussal rendelkezik a kölcsönös/egymást helyettesítő hasznosításukra. Különösen igaz ez a xilánból felszabaduló xilobiózra és a cellooligoszacharidokból transzglikozilációval keletkező szoforózra.

3.5.4 Fermentáció körülményeinek hatása a celluláz termelésre

A fermentáció körülményei jelentősen hatnak a gomba enzintermelésére (Ryu és Mandels, 1980). A *T. reesei* sejtnövekedésének hőmérsékleti optimuma 32-35°C, az enzintermelésé 28°C, így az enzimermentációt általában 28-30°C-on végzik.

Az enzintermelésre a hőmérséklet mellett a fermentáció során alkalmazott pH állítási stratégiának is nagy hatása van (Doppelbauer és mtsi., 1987; Mukhopadhyay és Nandi, 1999; Wayman és Chen, 1992; Merivuori és mtsi., 1990). Ryu és Mandels (1980) úgy találták, hogy tiszta cellulóz szénforrások esetén pH 3,0-4,0, míg lignocellulóz szénforrások esetén pH 5,0-6,0 a kedvező kiindulási érték. Kansoh és mtsi. (1999) cukornád bagasz szénforrás alkalmazásakor ugyancsak pH 5,0-6,0-ot találtak kedvezőnek. Az általánosan alkalmazott Mandels' táptalaj (Mandels és Weber, 1969) a fermentáció kezdeti szakaszában jelentősen savanyodik, mivel a gomba a szükséges nitrogént a táptalajban található ammónium-sókból veszi fel, és a visszamaradó protonok savanyítják a fermentációs közeget. Li és mtsi. (2005) emellett beszámolnak a gomba ecetsav termeléséről is, ami szintén savanyodást okoz. Xia-Bin és mtsi. (1998), valamint Kadam és Keutzer (1995) rázatott lombikos kísérleteikben puffereket alkalmaztak a pH stabilizálására, de sem a pH tartásában, sem az enzintermelésben nem voltak eredményesek.

Fonalas gombák esetén az indukció mértéke, és a termelt enzimkomplex összetétele is függ az alkalmazott szénforrástól (Markov és mtsi., 2005). A szénforrások lehetnek vízzoldhatók és vízben nem oldható szilárd szénforrások, a legtöbbet vizsgált vízzoldható szénforrás a glükóz és a laktóz. Glükózon csak kismérvű konstitutív celluláz szintézis zajlik, így jelentősége tudományos kísérletekben csak a reguláció vizsgálata során van. Ugyanakkor Ike és mtsi. (2010) glükóz szénforráson szaporítva egy *Trichoderma* mutánst, azt állapították meg, hogy ipari enzintermelés szempontjából előny az oldható szénforrás, ugyanis (i) a glükóz több különböző nyersanyagból keletkezhet (melasz, keményítő-, illetve cellulóz), (ii) a fermentált ultraszűrővel is sterilizálható, (iii) batch fermentáció során a szénforrás koncentráció anélkül emelhető, hogy keverési, anyagátviteli problémák jelentkezzenek. A laktóz alkalmazható méretnövelt enzimermentáció szénforrásaként is, Chaudhuri és Sahai (1993) 1,72 FPU/ml, illetve 2,84 FPU/ml szűrőpapír lebontó aktivitásokat értek el 20 illetve 40 g/l laktóz tartalmú táptalajon.

A szénforráskoncentráció emelésével ugyan nő a térfogati aktivitás, a hozam viszont csökken (Tangnu és mtsi., 1981; Sternberg, 1976). A szénforrás koncentrációja, különösen oldhatatlan szénforrások esetén keverési, reológiai, anyagátadási problémák miatt (Marten és mtsi., 1996) nem emelhető korlátozások nélkül. Lignocellulóz szénforrás esetében a szénforrás koncentráció növelésével nőhet a szénhidráttal együtt bevitt inhibitor koncentráció is, így a gomba szaporodása és enzintermelése egyaránt gátlódhat. Jó összefoglalót találunk a *Trichoderma* enzintermeléséről tisztított cellulóz, lignocellulóz, és oldott szénhidrát szénforrásokon Persson és mtsi. (1991) cikkében.

Az előkezelések hatására keletkező folyadék és szilárd frakció mindegyike potenciális szénforrást biztosíthat az enzimermentációhoz (Kovács és mtsi., 2008). Az előkezelés során fermentációs inhibitorok képződhetnek, melyek az enzintermelést befolyásolhatják. Szengyel és Zacchi (2000) *T. reesei* Rut C30 szaporítása során azt figyelték meg, hogy 6,0-os pH-n a fermentációs táptalajba adagolt ecetsav 3 g/l koncentrációig a celluláz termelést nem, a BGL termelést viszont pozitívan befolyásolta. Méréseik szerint a furfurol meghatározott koncentrációban mind a celluláz, mind a BGL termelésére gátlóan hatott, mely gátlást az ecetsav jelenléte csökkentette.

Olsson és mtsi. (2003) szerint valamely lignocellulóz szubsztrát hidrolízisére az azonos szénforráson fermentált enzimkomplex a legalkalmasabb. Sok kutató vizsgálta a *Trichoderma*

reesei Rut C30 enzimtermelését különböző előkezelt lignocellulóz szénforrásokon. Acebal és mtsi. (1985), valamint Maheswari és mtsi. (1993) búzaszalmán, Hayward és mtsi. (1999) nyárfán, Adsul és mtsi. (2004), valamint Kawamori és mtsi. (1986) cukornád bagaszon vizsgálták a celluláztermelést. Emellett SF-ot (Hayward és mtsi., 2000), hulladékpapírt (Chen és Wayman, 1991; Ju és Afolabi, 1999), búzakorpát (Xioa-Bin és mtsi., 1998), búzaszalmát (Maheswari és mtsi., 1993), kukoricaszárát (Tangnu és mtsi., 1981), fát (Shin és mtsi., 2000) és kukoricarostot (Vlaev és mtsi., 1997) is alkalmaztak szénforrásnak. Tiszta cellulózokon, (SF, Avicel, Sigmacel) a lignocellulózoknál általában jobb enzimaktivitás érhető el.

A *T. reesei* Rut C30 nemcsak kiváló celluláz-, de jó hemicelluláztermelő is, ha xilánt (Gamerith és mtsi., 1992; Bailey és mtsi., 1993; Haapala és mtsi., 1996), vagy egyéb hemicellulóz tartalmú szénforrást alkalmazunk (Roche és mtsi., 1995; Zeilinger és mtsi., 1993; Biely és mtsi., 1988).

Tangnu és mtsi. (1981) a nitrogénforrás változtatásának hatását vizsgálták, Lu-Kwang és Afolabi (1999) 1 : 1-es C : N aránynál érték el a legnagyobb celluláz aktivitást, Doppelbauer és mtsi. (1987) 0,5-2 g/l tartományban mutatták ki a pepton adagolás pozitív hatását. Különböző szénforrásokon rázatott lombikokban elért szűrőpapírlebontó aktivitásokat tartalmazza a 3. táblázat.

3. táblázat *T. reesei* Rut C30 törzs rázatott lombikos fermentációja során különböző szénforrásokon elért szűrőpapírlebontó aktivitások

Szénforrás	FPA FPU/ml	Produktivitás FPU/l·h	Hozam FPU/g szénforrás	Referencia
Glükóz, 30 g/l	0,9	9,5	30	Domingues és mtsi., 2001
Laktóz, 15 g/l	1,5	15	100	Domingues és mtsi., 2001
Sigmacell, 10 g/l	1,2	10	120	Esterbauer és mtsi., 1991
SF, 50 g/l	14,4	74	288	Tangnu és mtsi., 1981
SF, 20 g/l	5,6	23	280	Saddler, 1982
SF, 20 g/l	4,2	29	210	Hendy és mtsi., 1984
SF, 50 g/l	8,0	55,0	160	Hendy és mtsi., 1984
SF, 100 g/l	8,0	26,0	80,0	Hendy és mtsi., 1984
SPW, 10 g/l cell.	1,3	7,4	130	Szengyel és Zacchi, 2000
SPOW, 20 g/l	4,25	17,7	212,5	Shin és mtsi., 2000
SPAS, 40 g/l	1,6	6,6	40,0	Khan és Lamb, 1984

Meg kell jegyezni, hogy a SPOW-on elért aktivitás és hozam valószínűtlenül magas értékek. Lignocellulózokra Khan és Lamb (1984) valamint Szengyel és Zacchi (2000) eredményei a realisabbak. A cellulázfermentáció megoldható mind szubmerz, mind szilárdfázisú fermentációval (Szakács és Tengerdy, 1996; Smits és mtsi., 1996; Chahal és mtsi., 1996; Xia és Cen, 1999) ez utóbbinak előnye a kis energiaigénye, hátránya viszont a méretnövelés problémája. Lignocellulóz szubsztrátoknál talán a szubmerz, fed-batch fermentáció a legalkalmasabb módszer (Persson és mtsi., 1991; Hendy és mtsi., 1984).

3.6 Béta-glükózidáz fermentáció

A BGL termelő mikrobák is széles körben elterjedtek a természetben, Spagna és mtsi. (2002) mustból izoláltak BGL termelő élesztőket, a legjobbnak egy *Pichia anomala* törzset találtak. Skory és mtsi. (1996) *Candida wickerhamii* fermentációjával állított elő BGL-t. Desrochers és

mtsi. (1981) meglepően nagy BGL aktivitást (22,2 IU/ml) értek el *Schizopyllum commune* törzs fermentációjával, de mindezen enzimek hőmérséklet optimuma alacsony, mindössze 30°C volt. Gomes és mtsi. (2000) kíváló eredményeket értek el egy *Thermoascus aurantiacus* törzssel, melynek BGL hőmérséklet optimuma 70°C volt. Sternberg és mtsi. (1977) több mint 200 féle gomba és 15 féle baktérium törzs BGL termelését vizsgálták, melyek közül a fekete *Aspergillus*ok enzimtermelését találták a legjobbnak.

Jó celluláz termelő törzsek jó BGL termelőkkel történő kevert fermentációja esetenként kedvező összetételű enzimkomplexet biztosít. Főként *T. reesei* és *Aspergillus* törzsek használatosak az ilyen típusú fermentációhoz (Duff és mtsi., 1987; Friedrich és mtsi., 1987; Gutierrez-Correa és mtsi., 1999). Garcia-Kirchner és mtsi. (2002) egy *Penicillium* és egy *Aspergillus terreus* törzset fermentáltak sikeresen együtt.

A celluláz és BGL előállítása jelenleg szubmerz fermentációval történik, mivel a méretnövelés egyelőre nem megoldott a szilárd fázisú fermentációs technikánál. Fontos lehet azonban ez a technika is, mivel a celluláz és a BGL fermentációjára így olcsó hulladék anyagokat, búzaszalmát (Awafo és mtsi., 2000; Kalogeris és mtsi., 2003), vagy kukoricaszárát (Panagiotou és mtsi., 2003) használhatunk fel, melyek szilárdan állnak rendelkezésünkre. Emellett a fonalas gombák szilárd fázisú tenyészetben termelt enzimeinek aktivitása gyakran meghaladja a szubmerz kultúrában termeltét (Iwashita, 2002). Grajek (1987) termofil gombák szilárdfázisú és szubmerz fermentációját hasonlította össze és a szilárd fázisban nagyobb BGL enzim termelést tapasztalt. Az *Aspergillus* törzsek BGL termelését széles körben tanulmányozták különböző szénforráson (Srivastava és mtsi., 1987), ill. különböző fermentációs technikák alkalmazásával (Kim és mtsi., 1997) (4. táblázat).

4. táblázat *Aspergillus* törzsek β -glükozidáz termelése

Fermentációs körülmények			BGL	Referencia
Törzs	Idő	C-forrás		
Technika	[h]		[U/ml]	
<i>A. niger</i>				
rázott lombik	72	narancshéj	0,9	Martino és mtsi., 1994
kevert reaktor	192	2% rizsszalma	4,0	Kim és mtsi., 1997
fed-batch	192	2% rizsszalma	3,6	Kim és mtsi., 1997
fed-batch szak. rátáplálás	72	2% glükóz	9,2	Kerns és mtsi., 1987
air-lift fermentor	192	2% rizsszalma	4,0	Kim és mtsi., 1997
buborék oszlop	192	2% rizsszalma	3,8	Kim és mtsi., 1997
<i>A. wentii</i>				
rázott lombik	240	glükóz	2,85	Srivastava és mtsi., 1987
rázott lombik	240	cellobióz	1,6	Srivastava és mtsi., 1987
rázott lombik	240	maláta extrakt	3,4	Srivastava és mtsi., 1987
<i>A. fumigatus</i>				
rázott lombik	144	2% búzaszalma	9,69	Shaker és mtsi., 1984
rázott lombik	168	4% búzaszalma	5,88	Wase és mtsi., 1985
<i>A. terreus</i>				
rázott lombik	168	1% búzaszalma	1,02	Pushalkar és mtsi., 1995
rázott lombik	168	1% cukornád	0,83	Pushalkar és mtsi., 1995

A legjobban hasznosítható szénforrásnak a glükóz bizonyult, a gazdaságos enzim előállításához viszont fontos, hogy olcsóbb szénforrásokat, mint például a mezőgazdasági melléktermékeket is alkalmazhassuk, ami az előkezelés, a hidrolízis és a fermentációs technika optimalizálásával érhető el. Shaker és mtsi. (1984) a táptalaj optimalizálásával 9,69 IU/ml BGL aktivitást értek el *A. fumigatus* esetén. Különböző fermentációs technikák vizsgálata során Kim és mtsi. (1997) az air-lift fermentort találták a legalkalmasabbnak BGL előállítására.

A fonalas gombák növekedése a szabadon eloszló, változatos és bonyolult alakzatú, gyakran elágazó hifáktól a pelletes növekedésig igen különböző lehet (Cox és mtsi., 1998). A pellet a hifák összekuszálódott sűrű szövedéke, melynek átmérője néhány száz μm -tól, néhány mm-es nagyságig terjedhet. Egy sűrű hifa szövedékű magból és az ezt körülvevő lazábban szövődött gyűrűből vagy „bolyhos” régióból áll. Belsejében az oxigén- és más anyagtranszportot a diffúzió szabályozza, melynek elégtelensége esetén a közepe autolizál és belül lyukas pelletkeletkeznek (Kerns és mtsi., 1986). Az *Aspergillus* törzseknél gyakori pelletes növekedés jó lehetőséget ad rögzített enzimmészítmény előállítására, amennyiben az enzim a pelleten belül marad és nem választódik ki a fermentlébe.

Linden (1982) foglalkozott mikrobiális pelletke stabilizálásával, amikor is α -galaktozidáz tartalmú pelletkeket stabilizált glutáraldehides keresztkötésekkel. A pelletke működését folyamatos hidrolízissel vizsgálta, 1%-os glutáraldehid alkalmazásával nagymértékű javulást ért el a működési stabilitásban. A kezelt pelletkeben az α -galaktozidáz felezési ideje 19 nap, míg a kezeletlenekben 11 nap volt.

3.7 Lignocellulózok enzimes hidrolízise

A lignocellulózból történő etanol előállítás sebességmeghatározó lépése az enzimes hidrolízis (Lynd, 1996). Miután jelenleg ipari léptékben csak keményítő hidrolizáló üzemek léteznek, kézenfekvő azokhoz hasonlítani a majdani cellulóz hidrolízist. Zhang és Lynd (2004) számításai szerint ipari körülmények között a keményítő hidrolízisének sebessége mintegy százszorosa a tervezett (elvárt) cellulóz enzimes hidrolízisének. Ez a különbség a kevesebb hozzáférhető kötésnek, a kevesebb láncvégnek, valamint annak tudható be, hogy míg a cellulodextrinek $\text{DP} > 6-10$ polimerizációfoknál vízzoldhatatlanok (Miller, 1963), addig a maltooligoszacharidok $\text{DP} = 60$ -ig vízzoldhatóak (John és mtsi., 1982).

A cellulóz enzimes hidrolízisének sebességét befolyásoló faktorok vagy a szubsztráttal kapcsolatosak, úgy mint a (i) fajlagos felület, (ii) a részecskeméret, (iii) a lignintartalom és eloszlás, (iv) a hemicellulóz tartalom, (v) a porozitás, vagy az enzimmel kapcsolatosak, mint (i) az irreverzibilis adszorpció, (ii) a termék-inhibíció, (iii) az inaktíválódás (Mansfield és mtsi., 1999). A cellulóz kristályossága és a polimerizáció foka tisztított cellulózok hidrolízisének vizsgálatakor meghatározó faktorok, de egyedül ezek nem magyarázzák meg elegendően a lignocellulóz szubsztrátok ellenálló viselkedését (Alvira és mtsi., 2010). Általános tapasztalat, hogy a cellulóz heterogén szerkezete következtében jelentős kezdeti hidrolízissebesség csökkenés tapasztalható, még azon felül is, hogy figyelembe vesszük a celluláz inaktíválódást, az enzim inaktív kötődését a ligninen és a termék-inhibíciót. A maradék cellulóz csökkenő reaktivitása (i) a kisebb rendelkezésre álló felület, (ii) a kevesebb rendelkezésre álló láncvég, vagy (iii) az inaktíválódott cellulázok cellulózon történő adszorpciójának lehet a következménye (Zhang és Lynd, 2004).

Az enzimes hidrolízis optimális körülményeit (i) a szárazanyag-tartalom, (ii) a pH, (iii) a hőmérséklet és (iv) a hidrolízis ideje együttesen határozzák meg (Galbe és Zacchi, 2002). Általános szabály, hogy kis szubsztrátkoncentráció ($\text{DM} < 5\%$) esetén jobb hozam érhető el,

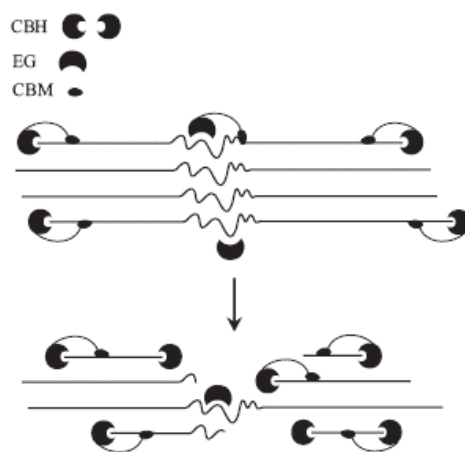
ezzel együtt szakaszos (batch) hidrolízis alkalmazásakor a kezdeti szubsztrátkoncentrációt a lehetséges legnagyobbra kell választani, hogy az elérhető cukorkoncentráció, majd etanolkoncentráció lehetővé tegye a gazdaságos feldolgozást és etanolkinyerést (Zaldivar és mtsi., 2001). A hidrolízisben alkalmazandó optimális pH és hőmérséklet nemcsak az alkalmazott enzim, illetve a nyersanyag függvénye, hanem attól is függ, hogy milyen hosszú a hidrolízis idő. Galbe és Zacchi (2002) $50^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletet és pH 4,0-5,0-öt tart optimálisnak, míg Tengborg és mtsi. (2001) egy napos hidrolízis esetén is csak 38°C -ot.

A hidrolízis során alkalmazott enzimdózis emelésével mind a kezdeti hidrolízissebesség mind az elérhető konverzió növelhető, de az E/S arány korlátlan emelésének a gazdaságosság szab határt. A *Trichoderma* cellulázok általában az optimálisnál kevesebb BGL-t termelnek, így a megfelelő konverzió eléréséhez célszerű a kiegészítő BGL adagolás (Xin és mtsi., 1993). Ha az előkezelés után a szubsztrát jelentős hemicellulóz tartalommal rendelkezik, az enzimes hidrolízis során további "segítő" enzimeket (hemicellulázokat) kell alkalmazni a cellulóz rostokat fedő hemicellulázok hidrolízisének elősegítésére (Berlin és mtsi., 2005). A hidrolízis enzimmérsége jelentősen csökkenthető lenne, ha az enzim újrafelhasználást megoldanánk, de erre a maradék szubsztráton és a szilárd ligninen történő jelentős enzimadszorpció miatt még nincsenek jó megoldások (Sun és Cheng, 2002).

A közelmúltban érdekes felfedezést tettek Harris és mtsi. (2010), bizonyos fehérjék, melyek a GH61 családba tartoznak, s nem rendelkeznek mérhető hidrolitikus hatással, különböző kétértékű fémionok jelenlétében szignifikánsan képesek csökkenteni a hidrolízishez szükséges cellulázok mennyiségét. A GH61 fehérje génjét kereskedelmi celluláztermelő törzsbe ültetve kíváló enzimtermelést értek el.

3.7.1 Cellulóz hidrolizáló enzimek

A cellulóz hidrolízisét endo- és exo-enzimekből álló enzimszisztéma végzi. Az amorf cellulóz részen támadni képes endo-1,4- β -D-glukanázok (EG, EC 3.2.1.4) a cellulózt véletlenszerűen hasítják, hosszabb-rövidebb oligomer láncok létrehozásával. Ezen cello-oligomerek végéről a kristályos cellulóz hasítására is képes cellobiohidrolázok (CBH, EC 3.2.1.91) cellobiózt hasítanak le (7. ábra), melynek további hidrolízisét az 1,4- β -D-glükózidázok (BGL, EC 3.2.1.21), más néven cellobiázok katalizálják.



7. ábra Az endoglukanázok (EG) és cellobiohidrolázok (CBH) közti szinergizmus (Sandgren és mtsi., 2005)

3.7.2 Segítő enzimek - hemicellulázok

A cellulóz rostok hemicellulózokkal borítottak, melyekhez lignin régiók kapcsolódnak, emiatt korlátozott a cellulázok hozzáférése a cellulóz szálakhoz. Ez javítható a biomassa előkezelésével, mivel ekkor a rostok fellazulnak és a hemicellulázok egy része oldatba megy. Ugyanakkor erőteljes előkezelés hatására, amikor jelentős a hemicellulázok oldatba vitele, cukorvesztés léphet fel és inhibitorok képződhetnek (Wyman, 2007), ezért az előkezelést általában olyan körülmények között végezzük, hogy ne lépjen fel jelentős cukorbomlás és inhibitorképződés, ekkor azonban a hemicellulázok eltávolítása sem lesz tökéletes. Ilyenkor az enzimes hidrolízis során a cellulázok mellett ún. segítő enzimeket is használnunk kell. Ide sorolhatók a hemicellulázok (xilanázok, xiloglükánázok, ferulsav-észterázok, acetil-xilán-észterázok, galaktozidázok, arabinofuranozidázok, fukozidázok, mannanázok), és a lignint bontó mangán-peroxidázok, lakkázok (rezet tartalmazó oxidázok) és lignin-peroxidázok (Valanskova és mtsi., 2007), valamint a pektinbontó endo-poligalakturonidázok, exo-poligalakturonidázok és a pektin metil-észterázok is.

A másodlagos sejtfal fő hemicellulózának, a xilánnak a hidrolízisében endo- és exoenzimek együttesen működnek. Az endo-1,4- β -xilanázok (EC 3.2.1.8) az oldhatatlan xilán láncot rövidebb, oldható xilooligomerekké és xilobiózzá hidrolizálják, amit az 1,4- β -D-xilozidázok (EC 3.2.1.37) xilózzá alakítanak. A xilán láncok gyakran szubsztituálva vannak arabinózzal, illetve glükuronsavval, ezek hasítását végzik az α -L-arabinofuranozidázok (EC 3.2.1.55) és α -D-glükuronidázok (EC 3.2.1.1) (Subramaniam és Prema, 2002). További savcsoportok lehetnek a hemicellulóz láncon, ez a növény fajtájától függő sajátosság. A xilóz és ecetsav csoportok között hasítanak az acetil-xilán-észterázok (EC 3.2.1.6), az arabinóz oldalláncok és ferulsav (4-hidroxi-3-metoxi-fahéjsav) között a ferulsav-észterázok (EC 3.1.1.73), az arabinóz oldalláncok és *p*-kumársav között a *p*-kumaril-észterázok (Foreman és mtsi., 2003). Az észterázok szerepe különös jelentőségű, mivel az acetil, feruloil és kumaril csoportok eltávolításával csökken a lignin kötődése a cellulózhoz, ezáltal az jobban hidrolizálhatóvá válik (Tabka és mtsi., 2006).

Az elsődleges sejtfal fő hemicellulóza a xiloglükán, melynek hidrolízisét xiloglükán specifikus endoglükánázok (EC 2.4.1.207/ EC 3.2.1.51), a xiloglükánon aktív β -D-galaktozidázok (EC 3.2.1.23), α -L-fukozidázok (EC 3.2.1.63) és a xiloglükán oligoszacharidokon aktív α -D-xilozidázok (EC 3.2.1.37) végzik (Grishutin és mtsi., 2004).

3.7.3 Cellulázok és hemicellulázok együttműködése lignocellulózok hidrolízisében

A növényi sejtfal cellulóz és hemicellulázok alkotta polimer hálózatában a hemicellulóz elhelyezkedése többféle, vannak a cellulóz rostok felszínéhez szorosan tapadó régiók, valamint a cellulóz szálak között átkötéseket létrehozó, könnyen eltávolítható részek. Emellett a hemicellulóz csapdázódhat a cellulóz rostban, ahonnan csak együttes celluláz és hemicelluláz kezeléssel távolítható el.

A hemicellulóz főláncát hasító enzimek működése következtében a polimerek oligomerekké hidrolizálódnak, melyek részben el is távolodhatnak a cellulóz felszínéről, így az könnyebben hozzáférhetővé válik a cellulázok számára. A cellulázok és főláncot hasító hemicellulázok közti együttműködés javítható, ha a hemicellulázok oldalláncaiban található szubsztituensek hasításáért felelős hemicellulázokat (α -L-arabinofuranozidázok, α -D-glükuronidázok, acetil-xilán-észterázok, ferulsav-észterázok, α -L-fukozidázok, α -D-xilozidázok) is alkalmazunk a hidrolízis során (Berlin és mtsi., 2005). Bizonyos főláncot hasító hemicellulázok működését gátolhatják ugyanis a láncon található csoportok (sztérikus gátlás). Az arabino-xilánok

hidrolízisében a főláncon található arabinóz akadályozza az endo-1,4- β -xilanázok hozzáférését a β -1,4 kötéshez (Sørensen és mtsi., 2007). Vannak olyan celluláz enzimek (pl. *Trichoderma reesei* Rut C30 EG I és EG III enzimek), melyek rendelkeznek hemicelluláz aktivitással is, az EG I képes hasítani a xiloglükán láncot a nem szubsztituált glükóz egységeknél. Az ún. specifikus xiloglükánázok (Cel74A) szubsztituált és szubsztituátlan glükóznál is tudják bontani a főláncot (Vincken és mtsi., 1997).

Selig és mtsi. (2008). előkezelt kukoricaszár hidrolízisében xilanáz és észteráz enzimek adagolásával növelték a cellobiohidrolázok hatékonyságát. A CBH enzimek aktív centruma csatorna alakú, s ahogy a cellulóz roston mozog, a xilán eltávolításával jobban hozzáfér a cellulóz lánchoz. A hidrolízisben elért glükán és xilán konverziók abban az esetben voltak a legnagyobbak, ha xilanázt, ferulsav-észterázt és acetil-xilán észterázt egyaránt tartalmazott az enzimkeverék.

3.7.4 Felületaktív anyagok és polimerek hatása az enzimes hidrolízisre

A cellulázoknál - más hidrolitikus enzimekhez hasonlóan – a katalitikus hatás szempontjából két fontos régió a katalitikus mag és a cellulóz kötő modul CBM). Ez utóbbi a hidrolízis első lépéséért, a szubsztrát adszorpciójáért felelős. Linder és Teeri, (1997) szerint a cellulóz megkötésében főleg aromás oldalláncú aminosavak vesznek részt, s kötődés feltehetően hidrofób kölcsönhatásokra vezethető vissza.

Az adszorpció egyensúlyra vezető folyamat, az egyensúly 30-90 percen belül beáll. A kialakuló egyensúlyok izotermákkal jellemezhetők (Chernoglazov és mtsi., 1988), a legelterjedtebb a Langmuir izotermák használata. Az enzimek adszorbeálódásának mértékét számos tényező befolyásolja. Gerber és mtsi. (1997) *Trichoderma reesei* CBH I és EG II enzimkomponensek alkalmazásával vizsgálták (i) a szubsztrát típusának, (ii) állapotának (szárított-nem szárított), és (iii) a közeg ionerősségének hatását. Méréseik szerint a szubsztrát állapota volt az adszorpcióra a legjelentősebb hatással. A túlevelű és a keményfa szubsztrátok felhasználásakor egyaránt a nem szárított mintákon mértek kétszer-háromszor nagyobb adszorpciót.

A lignocellulózok enzimes hidrolízisét a kezdeti reakciósebesség gyors csökkenése jellemzi. A kezdeti hidrolízis sebesség csökkenés lehetséges okai közül, a nem produktív enzimadszorpció csökkenthető egyes polimerek, valamint felületaktív anyagok adagolásával (Eriksson és mtsi., 2002a). A nemionos felületaktív anyagok vizsgálata a legelterjedtebb (Kaya és mtsi., 1995), bizonyos felületaktív anyagok, illetve polimerek hozzáadásával nemcsak a kezdeti hidrolízis sebesség de a cellulóz végső konverziója is növelhető.

A felületaktív anyagok hatása sokrétű, egyrészt az enzim stabilizálására irányulnak (i) csökkentik a folyadék-gáz határfelületen lévő enzim mennyiségét (Kim és mtsi., 1982) (ii) egyes esetekben növelik az enzim optimális hőmérsékletét (Eriksson és mtsi., 2002b) (iii) stabilizálják az enzim-szubsztrát komplexben lévő enzimet, így ritkábban következik be inaktiválódás a deszorpció előtt (Helle és mtsi., 1993), emellett (iv) megvédi az enzimet a mechanikai hatásra bekövetkező inaktiválódástól (Reese, 1980). Másrészt az enzim adszorpción keresztül fejtik ki hatásukat (i) befolyásolják az enzimek és a vízzoldható cukrok transzportjának energiaigényét (Helle és mtsi., 1993) és (ii) kedvezően hatnak az enzim adszorpció konstansára (Kaar és Holtzapfel, 1998).

A felületaktív anyag adagolásának hatása telítési görbét mutat. Kristensen és mtsi. (2007) szerint a szubsztrátban lévő lignin mennyisége nincs szoros összefüggésben a felületaktív anyag hatásának mértékével, az előkezelés szerepe hangsúlyosabb. A fenti hatásokat feltételezve várható, hogy a felületaktív anyagok adagolása mind a természetes (szárak,

bagasz), mind pedig a modell (hemicellulóztól és lignintől megtisztított cellulóz) szubsztrátok enzim hidrolízisét segíti, de alkalmazásuknak pontos hatásmechanizmusa még nem ismert.

A cellulóz bontására irányuló technológiai fejlesztések egyik fő célja a felhasznált enzim mennyiségének csökkentése a glükán konverziójának megtartása mellett. Az adagolt enzim hatékonysága növelhető a terméket nem eredményező enzim-lignin komplex képződésének visszaszorításával. Börjesson és mtsi. (2007) úgy találták, hogy az adszorpció befolyásolásáért a felületaktív anyag polimer frakciója a felelős. Izolált ligninen PEG 4000 adagolás hatását vizsgálva megállapították, hogy az alkalmazott Cel7B tisztított enzimkomponens mennyisége a polimer adagolás hatására 35,3%-ról 94,5%-ra növekedett a felülúszóban. Az enzim-lignin komplex létrejöttére kísérleti bizonyítékul szolgált, hogy míg a lignint is tartalmazó nyersanyag (SPS) alkalmazásakor a hidrolízis konverziója PEG adagolás hatására 42%-ról 78%-ra javult, addig ligninmentesített szubsztrát (Avicel) alkalmazásakor a konverzió (69%) PEG adagolás hatására nem növekedett. Ezek az eredmények azzal magyarázhatóak, hogy a PEG képes – hidrofób kölcsönhatással - adszorbeálódni a lignin felületén, ezzel mintegy kiszorítja az enzimet a lignin felületéről, meggátolva annak megkötődését és az aktivitás csökkenését.

3.8 Etanol- és hidrogénfermentáció

Sok a vita a bioüzemanyagokkal kapcsolatban, mit kellene gyártani, miből, hogyan, mely energiahordozó előállítása és felhasználása jelentené a legkisebb környezeti terhelést. Sokan a hidrogént (üzemanyagcellában felhasználva) tartják a jövő üzemanyagának, miután elégetésekor nem keletkezik semminemű káros égéstermék. A hidrogén előállításának fenntartható módszeréről megoszlanak a vélemények. Napjainkban a felhasznált hidrogén 96-99%-át fosszilis nyersanyagból (földgázból, kőolajból, ill. szénből), illetve fosszilis eredetű energia felhasználásával vízbontással állítják elő. A jövő alapanyaga, illetve energiaforrása hidrogén üzemanyag előállításakor is a biomassza és a megújuló energiaforrások kell, hogy legyenek.

Az etanol viszont már a jelen üzemanyaga, nagy előnye, hogy 5-10%-ban úgy lehet a benzinhez keverni, hogy sem a járműveken, sem az elosztóhálózaton nem kell változtatni. A jelenleg gyártott ún. első generációs etanollal szemben a legkeményebb vád, hogy miután élelmiszer alapanyagot (cukornád, cukorrépa, búza), illetve takarmányt (kukorica) használ nyersanyagul, hozzájárul az élelmiszer- és takarmányárak emelkedéséhez és ami még rosszabb, az éhínség fokozásához. Ha melléktermékként keletkező lignocellulózatokat, vagy termesztett energianövényeket használunk nyersanyagul, nem érhetnek ezek a vádak.

3.8.1 Hidrogénfermentáció

A hidrogént már az 1970-es években - az energiakrízis idején - a jövő energiahordozójaként emlegették. Ekkor hatalmas erőfeszítéseket tettek lehetséges nyersanyagok és módszerek felkutatására. Az olaj árának csökkenésével egyidejűleg azonban az alternatív üzemanyagok kutatása háttérbe szorult. Az 1990-es években aláírt nemzetközi egyezmények, amelyek az üvegházhatású gázok kibocsátásának csökkentését, és a megújuló energiaforrások használatának növelését célozták meg, új utat nyitottak az alternatív energiahordozónak, így a hidrogénnek is. Ahhoz, hogy a hidrogén általánosan használt üzemanyag lehessen, még számos problémát kell megoldani *i)* a hidrogén előállítási költségének csökkentését, *ii)* a hidrogén tárolását, *iii)* a hidrogén szállítását. A hidrogén csak akkor lehet versenyképes a hagyományos üzemanyagokkal szemben, ha sikerül nagy mennyiségben rendelkezésre álló nyersanyagból olcsón előállítani. Erre egy lehetőség a hulladék szénhidrátok felhasználása.

Hidrogén termelésére számos mikroorganizmus képes, anaerobok, fakultatív anaerobok és aerobok egyaránt (Hallenbeck és Benemann, 2002). Az ún. „sötét fermentációban” számos (hiper)termofil mikroorganizmus képes cukrot hidrogénné, szén-dioxiddá és szerves savakká alakítani (Claassen és mtsi., 1999). Elméletileg 1 mol glükózból 4 mol hidrogén, 2 mol ecetsav és 2 mol CO₂ keletkezik. A *Thermotoga* rend tagjait először aktív vulkánokból izolálták. Egyik legismertebb képviselője a *Thermotoga elfii*, amely termofil, Gram-negatív, szigorúan anaerob, halofil baktérium. Optimális hőmérséklete 66°C, pH optimuma 7,5. A *Thermotoga neapolitana* szintén Gram-negatív, szigorúan anaerob baktérium. Az előzővel szemben ez hipertermofil, még 90°C-on is életképes, hőmérséklet optimuma 80°C, pH optimuma 7. A *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* Gram-pozitív, szigorúan anaerob, hőmérséklet és pH optimuma 70°C és pH 7,0. Monoszacharidok, diszacharidok és poliszacharidok hasznosítására egyaránt képes.

3.8.2 Etanolfermentáció

Vannak olyan mikroorganizmusok, melyek képesek a cellulóz direkt mikrobiológiai átalakítására, azaz a cellulózból közvetlenül etanolt képesek előállítani, de a reakciósebesség és az etanolhozam annyira alacsony, hogy ez a lehetőség (DMC) egyelőre nem érdemel részletes tárgyalást (Lynd, 1996).

Kiemelkedő etanolhozammal bíró mikrobákat találhatunk mind a baktériumok (*Zymomonas mobilis*), mind a gombák körében (*Saccharomyces cerevisiae*). Technológiai szempontból fontos jellemzők, melyek alapján az alkalmazandó mikroorganizmus kiválasztható (i) az etanolhozam [g etanol/g szénforrás] (ii) a térfogati produktivitás [g etanol/(l-óra)], (iii) a metabolizálható szénforrások, (iv) a hőmérséklet és pH optimum, (v) az etanoltolerancia, (vi) a maximálisan alkalmazható szubsztrát mennyiség és egyéb tápanyagszükséglet, valamint (vii) a képződött melléktermékek mennyisége és minősége. A jelenleg ipari léptékben alkalmazott cukor és keményítőhidrolizátum alapú technológiák a péklesztőt (*Saccharomyces cerevisiae*) használják erjesztő mikroorganizmusnak.

A már előkezelt lignocellulózokból történő etanol előállítás alapvetően kétféle technológia szerint történhet (Oloffsson és mtsi., 2008) SHF illetve SSF alkalmazásával. A szeparált hidrolízis és erjesztés (SHF) során külön reaktorban történik a szénhidrátok enzimes hidrolízise és külön fermentorban a cukros lé erjesztése etanollá. A módszer előnye, hogy optimális körülmények biztosíthatók mind az enzimek, mind az élesztő számára. Az egyidejű hidrolízis és erjesztés esetében (SSF) egyetlen reaktorban, - ahol a körülmények az enzimek és az élesztő számára is elfogadhatóak, de nem optimálisak - egyszerre zajlik a hidrolízis és erjesztés. Az utóbbi módszer előnye, hogy a keletkező glükózt az élesztő azonnal etanollá konvertálja, s így a termékátlás megszüntetése következtében a hidrolízis sebessége megnő, emellett az SSF során kialakuló kis cukorkoncentráció és a relatív nagy etanol koncentráció megakadályozza a mikrobiológiai befertőződést. Az SSF gazdasági előnye az SHF-fel szemben, hogy csak egy reaktorra van szükség. Az SSF megoldásnál fellépő probléma, hogy a cellulázok és a fermentáló mikroorganizmusok hőmérséklet optimuma különböző, a jó etanol termelőként ismert *Saccharomyces cerevisiae*-é 30-35°C, a cellulázoké 50°C. A felmerült probléma lehetséges megoldása termotoleráns élesztőtörzsek használata. Galbe és Zacchi (2002) mindemellett az SSF legjelentősebb hátrányának azt tekinti, hogy ily módon az élesztő nem recirkuláltatható a technológiában.

A legtöbb élesztőgomba a 30-35°C-os tartományban növekszik, de találtak olyan *Kluyveromyces* törzset, amely még 40°C-on is termel alkoholt, és melynek a növekedése még 52°C-on sem szűnik meg (Banat és mtsi., 1998).

A metabolizálható szénforrások tekintetében nehézségekbe ütközik olyan törzsek izolálása vagy létrehozása, amelyek a glükóz mellett a xilóz és a cellobióz hasznosítására is képesek a többi paraméter jelentős romlása nélkül (Öhgren, 2006). A xilóz fermentációja azért kívánatos, mert a xilán a növényi biomasza szárazanyagtartalmának 25-30%-át is elérheti. A cellobióz felvétele a fermentálóból az SSF technológiák esetében különösen lényeges, ugyanis a cellobióz erős inhibeáló hatást fejt ki a cellulázok működésére. Egyes *Kluyveromyces* törzsek képesek a D-xilózt és a cellobiózt is erjesztetni, igaz, viszonylag alacsony, 25-30°C-os hőmérsékleten. Morikawa és mtsi. (1985) *Kluyveromyces cellobiovorus* KY5199 törzzsel az egyenként 8%-os tiszta glükózból, xilózból és cellobiózból álló oldatot erjesztve 32, 22 illetve 19 g/l etanol koncentrációkat értek el. Növényi nyersanyagokból nyert hidrolizátum alkalmazásakor a glükóz konverziójának hatásfoka jelentősen alulmaradt a fenti eredményhez képest.

Fermentációs inhibitorok -melyek többnyire az előkezelések során kerülnek a fermentáléba - hatása csökkenthető az élesztő törzsek adaptációjával (Alkasrawi és mtsi., 2006), vagy a fermentálé előzetes detoxifikálásával (Palmqvist és Hahn-Hägerdahl, 2000a).

A fermentáléban viszonylag kis koncentrációban keletkező etanol kidesztillálása az egyik legköltségesebb folyamat. A gazdaságos kitermelés alsó határa 5% (V/V) etanoltartalom (Zaldivar és mtsi., 2001). Az etanol kinyerés költsége csökkenthető az etanol koncentrációjának növelésével, melynek azonban a maximálisan alkalmazható szubsztrátkoncentráció szab határt. A rátáplálásos technológia, melynek során a szénhidrátok koncentrációja mindig a kívánt tartományban van jó megoldás lehet a megfelelő etanolkoncentráció előállításához. A technológia további előnye, hogy lehetővé teszi a szilárd-folyadék arány növelését, amely más esetben, különösen lignocellulóz szubsztrátok esetében keverési, anyagátadási problémákat okozhat.

A térfogati produktivitás növelésére több lehetőség áll rendelkezésre. A reaktorban lévő sejtömeg növelése megvalósítható sejtviisszatartásos vagy rögzített sejtes technológiákkal, amikor is a produktivitás 2,24-szoros növekedését tapasztalták a szabad sejtes fermentációhoz képest. Yu és mtsi. (2007) 200 g/l koncentrációjú cukoroldatból kiindulva ennek közel 100%-os átalakulását tapasztalta 16 óra alatt. A rögzített sejtek aktivitása 30 nap elteltével is 95%-ban megmaradt. A további fejlesztések a xilóz és glükóz egyidejű hasznosítása és az immobilizált sejteket alkalmazó technológiák területén várhatóak (Lin és Tanaka, 2006).

A második generációs üzemanyagetanol előállításának valamennyi olyan lépésével kell foglalkozni, mely különbözik az ipari méretekben is alkalmazott cukor, vagy keményítő alapú technológiától. Ez az etanolkinyerés és koncentrálás kivételével az összes technológiai lépést jelenti. Miután az egyes lépések összefüggenek, azaz az előkezelés jóságát nem lehet enzimes hidrolízis és/vagy etanolfermentáció nélkül meghatározni, kézenfekvő volt, hogy csoportommal valamennyi technológiai lépéssel foglalkozzunk. *Ennek megfelelően nem törekedhettünk teljességre, vannak mélyebben és kevésbé mélyen kidolgozott területek, de reményeim szerint így is hozzájárultunk a lignocellulóz alapú etanolelőállítás jobb megértéséhez és a mielőbb bevezetendő technológia kialakításához.* Miután meggyőződésemm, hogy a második generációs etanolgyárak nem lesznek üzemeltethetők egyetlen nyersanyaggal, egyrészt a nyersanyagszükséglet egész éves biztosításának, másrészt a beszállítási távolság növekedésének problémája miatt, ezért fontosnak éreztem, hogy munkánk során minél többféle potenciális nyersanyag felhasználhatóságát vizsgáljuk.

Célkitűzéseimet az alábbiakban foglalom össze:

1. Megfelelő előkezelési módszerek kidolgozása, optimalizálása különböző lignocellulóz alapú fő és melléktermékekre (kender, kenderpozdorja, kukoricaszár, cukorcirokbagasz, nád, energiafű, kukoricarost). A lignocellulózok előkezelését és enzim hidrolízisét felhasználva egyes nyersanyagok „biofinomítás” jellegű feldolgozása.
2. Celluláz enzimkomplex előállítás *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 -glükózidáz enzimkomponenssel kapcsolatos kutatások folytatása, enzimfermentáció és az „in situ” immobilizált pelletek stabilitásának javítása területén.
4. Az enzim 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) alkalmazása TPS bioműanyag egyes tulajdonságainak javítására.

Az 1991-ben benyújtott kandidátusi értekezésemben a lignocellulózok biotechnológiai hasznosításának lehetőségeit és problémáit vizsgáltam. Dolgozatomban celluláz és β -glükózidáz enzimek előállításával, jellemzésével és alkalmazásával foglalkoztam. Doktori munkámban is a lignocellulózokkal foglalkozom, egy sor új terület mellett helyt kapnak benne a kandidátusi dolgozatomban felvetett, a β -glükózidázzal kapcsolatos kutatások folytatásával elért eredmények is.

Célkitűzéseim megvalósítását nagyban segítették az általam létrehozott és a témavezetésemmel működő „Non Food” csoport doktoránsai, diplomázói és azok a kutatócsoportok, akikkel tudományos munkásságom alatt kiváló kapcsolatot sikerült kialakítani. Svédországban a Lundi Egyetem Kémiai Központja, Finnországban a VTT, Dániában a RISØ kutatóintézet, Hollandiában az ATO Wageningen és a Royal Nedalco, Ausztiában a Bécsi Műegyetem és Spanyolországban a CIEMAT kutatóintézet mind olyan helyek, ahol kutatásaink meghatározó részét végeztük a csak ott meglévő infrastruktúra és szakmai tudás felhasználásával.

Köszönettel tartozom mindazoknak, akik segítettek munkámat, s azoknak is, akik bíztak bennem és bátorítottak! Nélkülük ez a dolgozat nem született volna meg.

4 Felhasznált anyagok és alkalmazott módszerek

4.1 Nyersanyagok, szubsztrátok, szénforrások

4.1.1 Az előkezelések során alkalmazott nyersanyagok

Kukoricaszár: A kukoricaszárat, mely a leveleket is tartalmazta, a gyökérzet és csutkák nélkül közvetlenül a betakarítást követően gyűjtöttük, szobahőmérsékleten légszárazra szárítottuk, majd 2-3 mm szemcseátmérőjűre aprítottuk (sz.a.: 95%). Fő komponensei 36-42% glükán, 20-23% xilán és 17-26% lignin, az összetétel jelentősen változott a fajtától és a termőhelytől függően. Az általunk alkalmazott kukoricaszár minták glükán tartalma 40 és 43,8% között változott.

Kukoricarost (kukoricamaghéj): A kukoricaszem nedves őrléses feldolgozása során keletkező rostfrakció, melyet szobahőfokon szárítva, légszáraz állapotban, további aprítás nélkül tároltunk és használtunk fel. A kukoricarost a maradék keményítőn kívül jelentős mennyiségű hemicellulózt (főként xilánt) és cellulózt, valamint kisebb mennyiségben lignint, olajat, fehérjét és szervesetlen hamualkotókat is tartalmaz. Valamennyi kísérletünket amilolitikus enzimekkel keményítőmentesített 8-10 mm szemcseméretű rosttal (DCF) végeztük, mely 14-19% glükánt, 22-26% xilánt és 11-15% arabinánt tartalmazott.

Cukorcirok bagasz: A cukorcirokban a cukornádhoz hasonlóan a növény szára tartalmazza a közvetlenül erjeszthető 12-15%-os cukoroldatot, mely szacharózt, glükózt és fruktózt tartalmaz, s mely a szárból préseléssel nyerhető ki. A visszamaradó lignocellulózt présmaradékot bagasznak nevezzük, mely átlagosan 36-38% cellulózt, 24-28% hemicellulózt és 18-20% lignint tartalmaz. Kísérleteinkben légszáraz „Berény” jelű cukorcirok bagasz 3-15 mm szemcseméretű őrleményét használtunk fel, mely 36,3% glükán tartalom mellett 27,6% hemicellulózt és 18,6% lignint tartalmazott.

Kender, kenderpozdorja: Munkánk során, mind az energetikai céllal termesztett teljes növényt (kórót), mind a cellulóz rost mechanikai elválasztása után visszamaradó fás részt, a pozdorját vizsgáltuk. Kísérleteinkben légszáraz, 2-3 cm-re aprított kendert (összetétele: 43,6% cellulóz, 10,5% xilán és 14,9% lignin), valamint sílózott kendert (2-3 cm-re aprított, kerek bálákban adalékok nélkül 8 hónapig sílózva, összetétele: 45,2% cellulóz, 10,1% xilán és 18,7% lignin) használtunk fel. A kenderpozdorját a technológia során keletkezett állapotában (1-2 cm hosszú, kb. 0,5 cm széles és 0,3 cm vastag apríték) használtuk fel, összetétele: 40,1% cellulóz, 19,3% hemicellulózt és 21,7% lignin.

Balatoni nád: 2005-ben a befagyott Balatonról betakarított nádat légszárazon 2 mm szemcseméretűre darálva használtuk fel, a nád 33% cellulózt, 20% hemicellulózt és 25% lignint tartalmazott.

Energiafű: 2002 nyarán Szarvason aratták, az aprított légszáraz anyagot laboratóriumi darálóban tovább aprítottuk, s 2-3 mm-es méretben használtuk fel.

4.1.2 Az enzimfermentáció során alkalmazott szénforrások

Solka Flocc (SF): ligninmentesített, csökkentett hemicellulózt tartalmú fehérített lucfenyő cellulóz, (International Fiber, New York, NY) átlagosan 75% glükán és 18% xilán tartalommal, általában kontrollként alkalmaztuk.

Gőzrobbantott fűzfa (SPW): 205°C-on, szakaszos reaktorban (Lundi Egyetem, Svédország) savkatalízis mellett (2% SO₂) 6 perc reakcióidővel előkezelt fűzfa, 57,7% cellulóz és 40,6% lignin tartalommal. SPW csökkentett, illetve megnövelt lignintartalommal: a szénforrás összetételi adatait a 30. táblázat tartalmazza.

Gőzrobbantott lucfenyő (SPS): a 2-10 mm szemcseméretű lucfenyő aprítékot szakaszos reaktorban (Lundi Egyetem, Svédország) 2,5-3% SO₂ impregnálás után 210-215°C-on, 5 perc reakcióidővel kezeltük (Stenberg és mtsi., 1998), a mosott rost 41-42% glükánt és 55-56% lignint tartalmazott.

Gőzrobbantott kukoricaszár (SPCS)

SPCS I: 190°C-on folytonos reaktorban (ENEA, Olaszország) katalizátor nélkül előkezelt kukoricaszár (sz.a.: 38,7%), glükán tartalom: 36-37%, xilán tartalom 15-16%. Fagyasztva tároltuk, felolvasztás után szárítás nélkül került felhasználásra.

SPCS II: 210°C-on, szakaszos reaktorban (Lundi Egyetem, Svédország) savkatalízis mellett előkezelt kukoricaszár (sz.a.: 59,5%), glükán tartalom: 32-33%, xilán tartalom 2,5-3,0%. Fagyasztva tároltuk, felolvasztás után szárítás nélkül került felhasználásra.

Különböző előkezelések során nyert pentózfrakciók (F, cF, HH)

SPW elválasztott hemicellulóz frakciója közvetlenül (F), illetve besűrítés után (cF) került felhasználásra.

SPS elválasztott hemicellulóz frakciója (HH).

Nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár (Alk-185-5, Alk-195-15, Ac-195-5) elválasztott hemicellulóz frakciója (HH) úgy került felhasználásra, hogy a tápoldatban a vizet 75%-ban HH helyettesítette.

Hulladékpapír (OCC): vegyes csomagolási hulladékpapír, csapvizet áztatás után diszpergálva (konyhai turmix) használtuk.

Papíriszap: Cellulózt, lignint és hamualkotó szervesetlen anyagokat tartalmazó papírgyártási hulladék (*Dunapack* Papír- és Csomagolóanyag Zrt.), mintánkénti összetételét a 35. táblázat tartalmazza, fermentációs kísérleteinkben felhasznált iszap 45% glükánt, 13% lignint és 22% hamut tartalmazott.

Laktóz: a tejsavó cukorkomponense, *T. reesei* Rut C30-nál alkalmazott szénforrás.

Előhidrolizált Solka Flocc (PSF): 20 g/l SF-ot 50°C-on pH 4,8-on csapvízben hidrolizáltunk 8 ml/l Celluclast 1.5L enzimmészítménnyel 20 órán keresztül (150 rpm), a BGL termelés szénforrása.

Glükóz: enzimindukciós kísérletekben *T. reesei* Rut C30-nál, valamint a BGL termelés során alkalmazott szénforrás.

4.1.3 Az enzimes hidrolízis és SSF során alkalmazott szubsztrátok

Az enzimes hidrolízisek során szubsztrátként alkalmaztuk valamennyi általunk előkezelt nyersanyagot, mivel az előkezelés hatékonyságának egyik mérőszáma az enzimes bonthatóság. Emellett hidrolízis kísérleteinkben számos előkezelt lignocellulózt és modell szubsztrátot is vizsgáltunk.

Avicel: mikrokristályos, a kereskedelemben kapható cellulóz, SERVA, Heidelberg, Németország.

PASC: foszforsavban duzzasztott, amorf cellulózsármazék, könnyen hozzáférhető endoglukanázok számára, Avicelből Walseth (1952) módszerével készítettük.

Tiszta enzimkomponensek vizsgálata emellett a 43. táblázatban megadott szubsztrátokon (SPW, SPCS, SPS, SPWS, gőzrobbantott árpaszalma, gőzrobbantott pántlikafű, nedvesen oxidált kukoricaszár és SF) történt.

Saját fermentleveket SF, SPCS II, Avicel és SPS szubsztrátokon teszteltük.

PEG hatását részletesen SPS-on, az enzimadszorpciót gyakorlatilag az összes rendelkezésünkre álló gőzrobbantott nyersanyagon (SPSSB, SPCS, SPH, SPW és SPWS) vizsgáltuk.

SPS: lsd: 4.1.2.

SPSSB: 2% SO₂-os impregnálás után gőzrobbantás 205°C-on, 5 perces tartózkodási idő mellett.

SPCS I: lsd: 4.1.2.

SPH: 2% SO₂-os impregnálás után gőzrobbantás:190°C-on, 10 perc.

SPW: 190°C-on, 2% SO₂, 12 perc reakcióidővel előkezelt fűzfa (Sassner és mtsi., 2005).

SPWS: 0,2% H₂SO₄-as impregnálás után gőzrobbantás:190°C-on, 10 perc (Linde és mtsi., 2008).

Alk-195-15, Ac-195-15: Kukoricaszár nedves oxidációs előkezelésével (195°C, 15 perc, 12 bar O₂), mind lúg, mint sav katalízis mellett nyert termékeket SSF kísérletekben vizsgáltuk.

PWM: A 2,5 mm szemcseméretű búzadara 72,5% keményítőt, 4-4,5% cellulózt és mintegy 6% hemicellulózt tartalmazott. Előhidrolízise amilolitikus enzimekkel ipari tapasztalatok alapján történt (Destexhe és mtsi., 2004). Az első és második generációs etanol fermentáció összekapcsolásakor SPWS-val együtt alkalmaztuk.

4.1.4 Szekunder rost az enzimes kezelésekhez

Dunakraft 90R jelű, a Dunapack Rt. által gyártott zsákpapírt használtunk enzimes kezeléseink során, mely 8% tiszta (technikai) cellulóz, 25% egyszer felhasznált kraft feltárással előállított cellulóz és 67% hulladék hullám-csomagolóanyag felhasználásával készült.

4.2 Alkalmazott mikroorganizmusok

- *Trichoderma reesei* Rut C30: aerob fonalas gomba hipercellulolitikus (katabolit derepresszált), az ATTC törzsgyűjteményből (ATCC 56765), a mikrobát malátás, vagy PDA ferde agaron tartottuk fenn.
- A *T. reesei* RF6026: a Rut C30 genetikai módosításával előállított mutáns, mely *Thermoascus aurantiacus* cbh1/cel7A génjét tartalmazza *T. reesei* cbh1/cel7A promótere alatt. (Az RF6026 törzsben a natív *T. reesei* cbh1/cel7A gén törlésre került.) Ennek a törzsnek a kifejlesztését a finnországi ROAL Oy-ban végezték, ők bocsátották rendelkezésünkre. A cég tervei között szerepel a *T. reesei* Rut C30 további cellulolitikus génjeinek termoaktívra történő cseréje is, ezáltal magas hőmérsékleten aktív enzimkomplex termelésére alkalmas törzs kifejlesztése. A törzs fenntartása PDA-n történt.
- *T. reesei* QM9414 genetikailag módosított törzseivel (Collén, 2001) történt a *T. reesei* Cel7B-t (EG I), ill. Cel7B core-t (EG I katalitikus doménje) tartalmazó fermentlé előállítása glükóz-tartalmú táptalajon. A szelektív expressziót a Cel7B promóterét

helyettesítő konstitutív promóter tette lehetővé. Míg a két *T. reesei* rekombinánsban az endogén celluláz termelését a nagy glükóz-koncentráció represszálta, addig a célkomponens az *Aspergillus nidulans* gliceraldehid-foszfát-dehidrogenáz (GPD) gén (*gpdA*) promóterének szabályzása alatt termelődött.

- A BGL előállítására alkalmazott törzsek egy kivétellel - *Aspergillus phoenicis* QM 329 (Lundi Egyetemről) - a BME Mezőgazdasági Kémiai Technológia tanszék törzsgyűjteményéből (Dr. Szakács György) származtak: *Aspergillus niger* BKM F-1305, *Aspergillus foetidus* Biogal 39, *Aspergillus phoenicis* ATCC 1315B, *Penicillium ochro-chloron* WFPI 175A. A törzseket PDA ferdeagaron tartottuk fenn.
- *Thermotoga elfi* DSM 9442: Deutsche Sammlung von Microorganismen und Cellculturen törzsgyűjteményből hidrogénfermentációra tesztelve.
- *Thermotoga neapolitana* DSM 4359: Deutsche Sammlung von Microorganismen und Cellculturen törzsgyűjteményből hidrogénfermentációra tesztelve.
- *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903: Deutsche Sammlung von Microorganismen und Cellculturen törzsgyűjteményből hidrogénfermentációra tesztelve.
- *Kluyveromyces marxianus* Y 01070: Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
- *Kluyveromyces marxianus* Y 00243: Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
- *Kluyveromyces marxianus* Y 00242: Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
- *Kluyveromyces thermotolerans* Y 00775: Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
- *Kluyveromyces thermotolerans* Y 00798: Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
- *Saccharomyces cerevisiae* kereskedelmi pékélesztő
- *Saccharomyces cerevisiae* ATTC 26602, Royal Nedalco
- *Saccharomyces cerevisiae* DER-CIEMAT, Culture Collection Nr.1701.

4.3 Felhasznált enzimek

4.3.1 Alkalmazott ipari enzimek

A keményítő hidrolíziséhez illetve az előkezelések hatékonyságának meghatározásához ipari enzimmészítményeket használtunk, melyek a Novozymes A/S (2880, Bagsvaerd, Denmark), illetve a Genencor (Danisco A/S) cég termékei voltak.

- Celluclast 1,5L, Cellubrix, NS50013 (Novozymes): *Trichoderma* eredetű, celluláz enzimkomplex tartalmú sűrítmények.
- Novozym 188, NS50010 (Novozymes): *Aspergillus terreus* eredetű, BGL aktivitású fermentlé sűrítmények.

- Pergalase A40 (Genencor): *Trichoderma* eredetű, celluláz és hemicelluláz komponenseket tartalmazó enzimsűrítmény.
- IndiAge Super L (Genencor): genetikailag módosított mikroorganizmus által termelt, *T. reesei* Cel12A endoglükánázt tartalmazó enzimsűrítmény.
- Termamyl LC, Termamyl SC (Novozymes): *Bacillus licheniformis* eredetű, α -amiláz aktivitású fermentlé sűrítmények.
- BAN 480 (Novozymes): *Bacillus subtilis* eredetű, α -amiláz aktivitású fermentlé sűrítmény.
- AMG 300 L, Spirizyme Fuel (Novozymes): *Aspergillus niger* eredetű, amiloglükozidáz aktivitású fermentlé sűrítmények.

4.3.2 Celluláz aktivitású fermentlevek

T. reesei Rut C30 fonalas gomba által három különböző szénforráson (SF, laktóz és SPCS I) termelt enzimet (fermentlevet) vizsgáltuk aktivitásprofil és hidrolitikus hatékonyság szempontjából. A 46.táblázatban a 10 FPU/g szénhidrát enzimadagolásnak megfelelő FPA, HEC, BGL, AXE és BX aktivitásokat foglaltuk össze.

Szekunder papír rostok kezeléséhez genetikailag módosított *T. reesei* QM9414 törzsekkel állítottunk elő *T. reesei* EG-t, ill. annak katalitikus alegységét tartalmazó fermentlevet glükóz-tartalmú táptalajon.

4.3.3 Tisztított (egyedi) enzimkomponensek

Két olyan *Melanocarpus albomyces*ből származó termotabil cellulázt vizsgáltunk, melyeket rekombináns *Trichoderma reesei*vel heterológ módon állítottunk elő. A gének kifejeztetésére kétféle formában került sor: (i) az eredeti genetikai szekvencia szerint, illetve (ii) módosított formában, egy idegen, *T. reesei* eredetű cellulóz-kötő modul (cellulose binding modul, CBM) hozzácsatolásával az eredeti kódoló szekvenciához. A fermentlé szűrése és az enzimfehérjék tisztítása után (részletes adatok: Szijártó és mtsi., 2008) került sor az enzimek vizsgálatára. Az elválasztott komponensek tisztaságáról SDS PAGE gélelektroforézissel győződünk meg. Az 50 kDa-os (Cel7A) endoglükánázt, valamint az 50 kDa-os cellobiohidrolázt (Cel7B) hidrolízis kísérleteinkben tisztított formában pH 6,0-on 50°C-on alkalmaztuk.

Tisztított CBH I, CBH II és EG II komponenseket *Trichoderma reesei* fermentlevéből Suurnäkki és mtsi. (2000) módszerével, a tisztított xiloglükánázt ugyancsak *Trichoderma reesei* fermentlevéből Benkő és mtsi. (2008) által közölt módszerrel nyertük ki. BGL adagolás *Aspergillus* eredetű kereskedelmi enzimmal történt (Novozym 188).

4.4 Enzimaktivitás mérési módszerek

Többfajta mérési módszert alkalmaztunk, melyekkel mérhető a teljes celluláz komplex (FPA), illetve az egyes celluláz, hemicelluláz, BGL komponensek aktivitása. Az enzimaktivitás kifejezésére használt enzimegység (IU) 1 perc reakcióidő alatt keletkezett μ mol-nyi reakcióterméket jelent.

Szűrőpapír lebontó aktivitás (FPA)

A teljes celluláz komplex hidrolitikus aktivitásának jellemzésére használt módszerhez a várható aktivitástól függően maximum 1,0 ml mintát 50 mg Whatman No.1.

szűrőpapírcsíkkal 50°C-on 1 órán át termosztálunk, a mintatérfogatot minden esetben 1,5 ml-re egészítjük ki 0,05 M-os pH 4,8 citrát (acetát) pufferrel. A termosztálási idő leteltével a minták cukortartalmát redukáló cukorméréssel (4.9.4) mérjük (Mandels és mtsi, 1976).

β-glükózidáz aktivitás (BGL)

Az aktivitásmérés mesterséges szubsztátja a *p*-nitrofenil-β-D-glükopiranozid (pNPG), melyből a BGL *p*-nitrofenolt szabadít fel, melynek színe lúgos közegben sárga. A színreakció spektrofotométerrel jól követhető. 0,1 ml megfelelően hígított enzimoldatot 1 ml 5 mM-os pNPG oldattal 10 percig 50°C-on termosztálunk, majd az enzimreakciót 2 ml 1 M-os Na₂CO₃ oldattal állítjuk le, és 10 ml desztillált vízzel hígítjuk. A minták abszorbanciáját 400 nm-en (desztillált vízzel készült vakkal szemben) fotometráljuk, a kalibrációhoz 1 mM-os *p*-nitrofenol oldatot használunk (Berghem és Pettersson 1974).

CBH I és EG I aktivitás egymás mellett

CBH I és EG I hidrolizálja a 4-metilumbelliferil-β-D-laktozid (SIGMA M-2405) mesterséges szubsztátot, és 4-metilumbelliferont (7-hidroxi-4-metilkumarin) szabadít fel termékként, melynek koncentrációja 370 nm-en lúgos közegben (reakciót 1 M-os Na₂CO₃ oldattal állítjuk le) adszorbancia méréssel meghatározható. A kalibrációhoz 20 mM-os 7-hidroxi-4-metilkumarint használunk. A BGL aktivitást a reakcióelegyhez adagolt glükóz (100 mM) inhibeálja. Mivel a reakció nem specifikus EG I-re, egy másik aktivitásmérésben 5 mM cellobiózzal inhibeáljuk a CBH I-et, így kapjuk meg az EGI aktivitást. Az CBH I aktivitást a két mért érték különbségeként definiáltuk (Bailey és Tähtiharju, 2003).

Endoglükánáz aktivitást számos szubsztáttal lehet mérni. A pNPC-ből cellobióz lehasítása után 400 nm-en mérhető a lúgos közegben sárga színű nitrofenol, HEC (IUPAC, 1987) és CMC szubsztárból (Bailey és Nevalainen, 1981) a felszabaduló redukáló cukor mennyiségét mérjük DNS reagenssel.

A hemicellulóz frakció lebontásában szerepet játszó enzimek aktivitásának meghatározása:

Xilanáz aktivitás (XIL) Nyírfából származó xilán (SIGMA) 1%-os oldatának (0,05 M-os citrátpuffer, pH 5,3) 0,5 ml-éhez 0,4 ml citrátpuffert és 0,1 ml mintát pipetázunk, majd 10 perces 50°C-os termosztálás után a reakciót 1,5 ml DNS oldat hozzáadásával állítjuk le (4.9.4). Az aktivitást xilóz kalibráció segítségével számoljuk (Bailey és mtsi., 1992).

Xiloglükánáz aktivitás (XG) 1,8 ml szubsztátot (1%-os *Tamarind* xilogükán, Amyloid, Megazyme) 0,2 ml megfelelően hígított mintával 50°C-on 10 percig inkubálunk, az enzimreakciót 3 ml DNS reagenssel állítjuk le, a minták cukortartalmát redukáló cukorméréssel (4.9.4) mérjük az enzimaktivitást glükóz kalibráció segítségével számoljuk (Benkő és mtsi., 2008).

Mannanáz aktivitás (MAN) 0,5%-os mannán (locus bean gum) szubsztáttal Stålbrand és mtsi. (1993) szerint.

Acetilxilán észteráz aktivitás (AXE) acetilált xilo-oligomer szubsztárból (Jürgen Puls, Hamburg, Németország) felszabadított ecetsav mérésével Poutanen és mtsi. (1990) szerint.

α-arabinozidáz aktivitás (α-ARA) 2 mM-os 4-nitrofenil-α-D-arabinofuranozid szubsztáttal Poutanen és mtsi. (1987) szerint.

β-xilozidáz aktivitás (BX) 5 mM-os 4-nitrofenil-β-D-xilopiranozid szubsztáttal Poutanen és Puls (1988) szerint.

α-galaktózidáz aktivitás (α-GAL) 1 mM-os 4-nitrofenil-α-D-galaktopiranozid szubsztáttal Bailey és Linko (1990) szerint.

Az **aktivitás-festés** két azonos gél egyidejű futtatásával történt. Ezek közül az egyiket megfestettük a fehérjék detektálásához, a másikat pufferben (pH 7,5 RmCel12A esetén, pH 4,8 TrCel7B esetén) előinkubáltuk, majd szubsztrátként karboximetil-cellulózt (CMC) tartalmazó agar géllal fedtük be. Az 50°C-on, 1 órán át tartó inkubálás után a termék meghatározása érdekében a szubsztrát-gélt kongó-vörös oldatban festettük (0,1%, 10 perc RmCel12A esetén, ill. 0,2%, 4 óra TrCel7B esetén), majd a felesleges festék eltávolítására 1 M NaCl oldattal mostuk.

A fermentáléban található fehérjék elválasztása molekulaméretük (SDS-PAGE), ill. izoelektromos pontjuk (pI) alapján (izoelektromos fókuszálás, IEF) történt. A molekulaméret ill. izoelektromos pont meghatározására Mt ill. pI markereket használtunk.

4.5 *Lignocellulózok előkezelése*

4.5.1 Kémiai előkezelések

Híg kénsavas előkezelést nyers, aprított kukoricaszár, keményítőmentesített kukorica rost és kukoricacsíra dara esetében alkalmaztunk. A légszáraz mintához annyi és olyan töménységű kénsav oldatot mértünk, hogy az elegyben a szárazanyag koncentráció 8-10%, a kénsav koncentrációja pedig – a kísérleti tervtől függően – 0,5-5% legyen. A reakcióelegyet zárható üvegedényekben 2 órán át 120°C-on hőkezeltük. A lúgos kezeléseket a híg savashoz hasonlóan NaOH, NaOH+H₂O₂, (CaOH)₂, KOH katalízissel végeztük, a szárazanyagtartalom a kukoricarost lúgos kezelésekor 4,53% volt.

A kémiai kezeléseket kender, kenderpozdorja, cukorcirok bagasz és energiafű esetében is a fentiek szerint végeztük. A kukoricaszár kétlépcsős lúgos és savas előkezelésekor 1 napos NaOH-os áztatást (szobahőfokon) szűrés és mosás után savas előkezelés követett (120°C, autoklávban, 1 óra).

Az előkezelt anyagot a felülúszótól történő elválasztás után desztillált vízzel mostuk, majd meghatároztuk a mosott rost mennyiségét, a rost főbb komponenseinek mennyiségét (4.9.1 és 4.9.2) és enzimes bonthatóságát (4.6.1). A kukoricaszár előkezelésénél, valamint a kukoricarost savas előkezelésénél megadott glükán és pentozán adatok mindenütt 100 g kiindulási száraz nyersanyagra (100% sz.a.) vonatkoznak.

4.5.2 Előkezelések gőzrobbantással, illetve nedves oxidációval

A minimális vegyszerigényű fizikai-kémiai előkezelések közül két módszert, a gőzrobbantást (Galbe és Zacchi, 2007) és a nedves oxidációt (Schmidt és Thomsen, 1998) alkalmaztuk. Mindkét eljárás nagy hőmérsékleten (jellemzően 200±10°C) és nyomáson történő előkezelést jelent. A köztük lévő fő különbség, hogy nedves oxidációnál 10-12 bar nyomásig tiszta oxigént adunk a speciálisan kialakított hurokreaktorba és az előkezelés végeztével a túlnyomást fokozatosan engedjük le, míg gőzrobbantásnál a túlnyomást okozó gőzt hirtelen expandáltatjuk (5. ábra). Mindkét módszernél elsősorban a hemicellulóz frakció kezd el bomlani, amiből szerves savak is keletkeznek és a kialakult savas közegben autohidrolízis indul meg. A két eljárás között különbséget jelentett még, hogy általában a nedves oxidáció reakcióideje hosszabb volt, 5-15 perc, szemben a gőzrobbantás 2-10 percével, illetve az, hogy a nedves oxidációnál savat (0,5 ml 96% H₂SO₄/l) és lúgot (2 g Na₂CO₃/l) egyaránt alkalmaztunk, gőzrobbantásnál viszont csak savat (0,5-2% H₂SO₄, ill. SO₂).

A gőzrobbantásos előkezeléseket egy kivétellel a Lundi Egyetem Vegyipari Műveletek Tanszékén végeztük egy 10 liter hasznos térfogatú szakaszos reaktorban. A nyersanyagokat

előkezelés előtt műanyag zsákokban 20-30 percig kén-dioxiddal, vagy jól zárható műanyag edényekben H_2SO_4 oldattal impregnáltuk. Az előkezelés során a kívánt hőmérsékletet telített gőz befűvatással állítottuk be, majd a kívánt tartózkodási idő lejárta után a nyomást egy szelepen keresztül hirtelen atmoszfériusra csökkentettük és a keletkező anyagot egy ciklonban gyűjtöttük össze.

Kenderpozdorja gőzrobbantásos előkezelését a CIEMAT (Madrid, Spanyolország) Biomassza kutatócsoportjában végeztük két különböző méretű reaktorban katalizátor alkalmazása nélkül 10 perc reakcióidővel, 200-230°C-on.

Nedves oxidációt Dániában a RISØ National Laboratory-ban kukoricaszár és a balatoni nád előkezelésére alkalmaztuk.

Az előkezelések pontos paraméterei az eredményeknél találhatók.

4.5.3 Előkezelés mikrohullámú reaktorban

Keményítőmentesített kukoricamaghéjat (DCF) (5%) 6 órán keresztül impregnáltuk desztillált vízzel, esetenként kénsav illetve nátrium-hidroxid 0,025 illetve 0,5%-os oldatával, majd a nedvesített nyersanyagot jól záródó teflon edényben mikrohullámú készülékben (Milestone MLS-1200 Mega Microwave Workstation, Sorisole, Olaszország) kezeltük, a felfűtési idő 2, a tartási idő 5 perc volt. A vizsgált hőmérsékleti tartomány: 100-210°C. A kezelt nyersanyag rost frakciójától vákuumszűréssel választottuk el a vízzeloldható hemicellulózokat tartalmazó folyadék fázist.

4.6 Enzimes hidrolízis

4.6.1 Az előkezelések hatékonyságának meghatározására

Az előkezelt minták enzimes bonthatóságát többnyire az elválasztott, mosott szilárd frakcióból végeztük, egyes esetekben a teljes előkezelt zagyból. A lignocellulóz minták enzimes hidrolízisét jellemzően 50°C-on, (esetenként 40-45°C) pH 4,8-on, 0,05-0,1 M-os acetát, vagy citrát pufferben keveréssel, vagy rázatással hajtottuk végre. A szubsztrát koncentráció (S) 2 és 5% között változott, az alkalmazott enzimdózis (E/S) 5 és 50 FPU/g sz.a. mellett, míg a BGL kiegészítés általában úgy történt, hogy az FPA : BGL aktivitás arány 1:1 legyen.

Egyes esetekben nem sz.a.-ra, hanem cellulóz (glükán) tartalomra vonatkoztatott enzimdózist adtunk meg. Az enzimes hidrolízis 24, 48, esetenként 72 órás volt. A hidrolízis alatti mintavétel vagy a párhuzamosan indított mágneses keverővel kevert kémcsőreaktorokban (V: 5 ml) végrehajtott reakciók teljes elegyének feldolgozásával, vagy nagyobb méretű (500-1000 ml) reaktorokból történő mintavétellel történt. A hidrolízis során képződő termékek koncentrációját többnyire HPLC-vel, egyes esetekben DNS reagenssel határoztuk meg. Az eredményeket mint glükánkonverziót, illetve esetenként szénhidrátkonverziót adtuk meg, a hidrolízis szempontjából lényeges paramétereket az 5.3. fejezet tartalmazza.

4.6.2 Enzimes hidrolízis egyedi enzimkomponensekkel

Melanocarpus enzimekkel: Az 50 kDa-os (Cel7A) endoglukanázt, valamint az 50 kDa-os cellobiohidrolázt (Cel7B) hidrolízis kísérleteinkben tisztított formában pH 6,0-on 50°C-on alkalmaztuk. A vizsgált enzimek hidrolitikus hatását kristályos Avicel-en és az ebből foszforsavas duzzasztással előállított amorf cellulózon az ún. Walseth cellulózon (PASC)

vizsgáltuk 10 g/l szubsztrát koncentráció mellett, Eppendorf csövekben, mágneses keveréssel. Enzimadagolás 5, 10, 20 mg/g volt Avicel és 0,5, 1, 2, 5 mg/g PASC szubsztráton. A reakció leállítása a reakcióelegy felforralásával történt, a felülúszóból DNS cukorreagenssel és HPLC-vel (Dionex) határoztuk meg a termék összetételét és koncentrációját.

Trichoderma enzimekkel: Hidrolízis kísérleteink során különböző módon előkezelt lignocellulózok (árpaszalma, búzaszalma, kukoricaszár, fűzfa, lucfenyő, zöld pántlikafű) hidrolízisét tisztított celluláz (CBH I és II, EG II, β -glükozidáz), és hemicelluláz (xilanáz és xiloglukanáz) enzimek alkalmazásával vizsgáltuk (pH: 5,0, T: 45°C, S: 10 g/l glükán, V: 2,5 ml). Az alkalmazott enzim dózis 10 FPU/g glükánnak megfelelően mg fehérje/g glükánban megadva: CBH I: 14,5, CBH II: 3,6, EG II: 3,6, BGL: 1,37. Ezt az enzimkeveréket egészítettük ki 1,0 mg/g XG, vagy 1,0 mg/g XL, illetve 1,0 mg/g XG+1,0 mg/g XL enzimekkel. A termékmeghatározás DNS cukorreagenssel és Dionex HPLC rendszerrel történt.

4.6.3 Enzimes hidrolízis saját fermentlevekkel

Hidrolízis kísérleteinkben többféle szénforráson (SF, laktóz, SPCS I) előállított saját fermentálású *T. reesei* enzimek hidrolitikus potenciálját vizsgáltuk egy kereskedelmi forgalomból beszerzett (Celluclast 1.5L) enzimkészítménnyel összehasonlítva. Hidrolízis körülmények: 45°C, pH: 5,0, S: 10 g szénhidrát/l, E/S: 10 FPU/g szénhidrát, 5 ml térfogatban, mágneses keverővel kevertetve (400 rpm), t: 48 h. Az enzimes reakció leállítása és a folyadékfázis elválasztása után a felülúszók analízise redukáló cukortartalom méréssel és HPLC-vel (Dionex) történt.

4.6.4 PEG hatásának vizsgálata az enzimes hidrolízisben

Hidrolízis kísérleteinket 100 ml-es csavaros tetejű üvegekben, (50°C, pH 4,8), 300 rpm kevertetéssel (mágneses keverő), 50 g reakcióelegyben hajtottuk végre, S: 2% sz.a., E/S: 20 FPU/g sz.a.+ 20 (40) IU(BGL)/g sz.a. mellett, a kísérletekben 2,5 g/l PEG (átl. Mt: 4000 g/mol) adagolás hatását vizsgáltuk, t: 72 óra. Minden mintavételnél három reaktor került feldolgozásra. A felülúszóból a termék szénhidrátok meghatározása mellett meghatároztuk a maradék enzimaktivitásokat is (FPA, BGL).

4.7 Fermentáció

4.7.1 Enzimfermentáció

Inokulum: 150/750, illetve 200/1000 ml-es rázatott lombikokban, 30°C-on SF, glükóz, vagy laktóz szénforráson, Mandels' táptalajon (Mandels és Weber, 1969), illetve az alábbi módosított Mandels' táptalajon 15-30 napos malátás ferde agarról oltva készült. Az oltóanyagot jellemzően 4 napig (*Aspergillus*okat 1 napig) szaporítottuk, az indulási pH: 5,5-5,8, a feldolgozási: 2,8-3,5 volt. Fermentációs kísérleteinket 10% (V/V) inokulummal oltottuk. A módosított Mandels' táptalaj literenként a 10 g szénhidrát mellett a következő komponenseket tartalmazta: 0,4 g karbamid, 1,87 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,67 g KH_2PO_4 , 0,53 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,81 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,33 g élesztőextrakt, 1,0 g pepton, valamint az 1%-os nyomelemoldatokból 0,66 ml FeSO_4 , 0,21 ml $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,19 ml $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ és 2,67 ml CoCl_2 .

Ráztatott lombikos kísérletek: Az inokulum készítéssel azonos körülmények között, de 10% 4 napos tenyésztéssel oltva, különböző szénforrásokon és indulási pH értékeken, naponkénti pH állítással (10%-os steril NaOH) esetenként 0,05-0,1 M-os trisz-maleát puffer alkalmazásával történtek a kísérletek. A szaporítások jellemzően 7, esetenként 14 napig tartottak 300-350 rpm ráztatással.

A Mandels' táptalaj mellett egy „ipari jellegű” táptalajt is alkalmaztunk, mely a szénforráson (10 g/l) kívül mindössze szeszgyári törkölyt (5 g/l), KH_2PO_4 -ot (0,83 g/l) és $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot (0,83 g/l) tartalmazott (Harkki és mtsi., 1991).

Ráztatott lombikos kísérletek II: A *T. reesei* QM9414 rekombinánsok fermentációja ráztatott lombikban, módosított *Trichoderma* minimál táptalajon, 30°C-on, 8 napon át történt (Collén és mtsi., 2001). Az alkalmazott táptalaj összetétele: 30 g/l KH_2PO_4 ; 8 g/l K_2HPO_4 ; 2 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,005 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0016 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,0014 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0037 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 40 g/l glükóz; 0,6 g/l MgSO_4 ; 0,6 g/l CaCl_2 . A glükóz koncentráció a teljes fermentáció során legalább 10 mg/ml volt, naponta 30-40 mg/ml-re állítva koncentrált, csak glükózt és $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot tartalmazó tápoldattal, ezúton biztosítva az endogén cellulázok represszióját.

Fermentoros kísérletek

A laborfermentoros kísérleteket egyrészt Mandels' táptalajon (Mandels és Weber, 1969) OCC szénforráson (10 g/l szénhidrát), másrészt Harkki és mtsi. (1991) által leírt szesztörkölyös medium módosításával és koncentráálásával kialakított táptalajon (SF, laktóz, SPCS szénforráson) végeztük (28°C, 5 nap) 31 liter (20 liter hasznos) térfogatú, duplafalú, rozsdamentes acél laboratóriumi fermentorban (Biostat CDCU-3, B. Braun Biotech, Németország). A pH-t az automata szabályozás 10%-os foszforsav, illetve ammónium-hidroxid segítségével tartotta a kívánt értéken. Az oldott oxigén (DO) szintet a fermentorban a telítési szint 30%-án kaszkád szabályozás tartotta, mely először a levegő beáramlási sebességét változtatta 1-12 l/perc, majd a keverési sebességet 300-650 rpm között az oxigén szint megtartásához. A fehérjék okozta habzást szilikon olaj alapú habzágátló használatával csökkentettük. A napi háromszori mintavételezéssel kapott mintákat 5 percig 9000 rpm-en centrifugáltuk és a felülúszókat elemeztük.

Kimenő gáz összetételének meghatározására alkalmas gázanalizátorral, pH és oxigén mérésre és szabályozásra alkalmas műszerekkel ellátott 3 literes (2 l hasznos tf.) fermentorban (Biostat A DCU-300, B. Braun Biotech, Németország) folytattuk le azokat a kísérleteket, melyekben azt kívántuk megvizsgálni, hogy az eredetileg glükóz szénforráson felszaporított *Trichoderma* hogyan viselkedik impulzusszerű cellulóz adagolására.

4.7.2 Hidrogénfermentáció

100 ml-es zárt üvegekben végzett kísérleteink során *Thermotoga elfii*, *Thermotoga neapolitana* és *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* hidrogén termelését teszteltük papíriszap hidrolizátumon. Pozitív kontrollként glükózt használtunk, és három komponens – élesztő extrakt, nyomelemek és a sók – hatását vizsgáltuk (részletes adatok: Kádár és mtsi., 2003).

C. saccharolyticus hidrogén termelését vizsgáltuk analitikai tisztaságú cukrok (glükóz és xilóz), és az ezen cukrokat tartalmazó papíriszap hidrolizátumon. Kísérleteinket 2 literes bioreaktorokban végeztük szigorúan anaerob körülmények között 70°C-on pH 6,4-en 350 fordulat/perc keverés mellett. A fermentációt 10% inokulummal oltottuk, s a képződő H_2 eltávolítása érdekében 7 l/h áramlási sebességgel nitrogént buborékolattunk át rajta. A

fermentációs idő függvényében mértük a cukor fogyást, valamint a hidrogén, acetát és laktát képződést.

4.7.3 Etanolfermentáció

Valamennyi SSF kísérletben a reakcióelegy tartalmazta az élesztő számára szükséges anyagokat: 0,5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,025 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l élesztő extrakt, esetenként NH_4Cl -ot (2 g/l) és peptont (5 g/l) is.

SSF kísérletek az előkezelések tesztelésére

A lúgosan előkezelt **kukoricarostot**: S: 5%, 25 FPU/g glükán + 25 IU BGL/g glükán enzimdózissal, 2 órás 50°C-on történő előhidrolízis után SSF-ben (37°C, 48 h) vizsgáltuk, a keletkezett etanolt HPLC-vel határoztuk meg.

A gőzrobbantott **kender és kendersizlász** etanol-potenciálját, nagy szubsztrátkoncentrációt (7,5% WIS) alkalmazva 2 literes laboratóriumi fermentorokban SSF kísérletekben határoztuk meg: 37°C, pH 5,0, 72 h, 20 FPU/g glükán + 23 IU BGL/g glükán (Celluclast 1,5L és Novozym 188). Az erjesztéshez kereskedelmi forgalomban kapható, a gőzrobbantott zagy folyadékfázisán adaptált 5 g/l pékélesztőt használtunk, a keletkezett etanolt HPLC-vel határoztuk meg.

Az előkezelt **kenderpozdorja** mosott szilárd frakciójának nem steril szimultán cukrosítását és fermentációját (SSF) 50 ml térfogatban, rázatott lombikban, 10% WIS koncentráció mellett, 32°C-on, NS50013 és NS50010 enzimekkel (25 FPU/g glükán + 23 IU BGL/g glükán) és hexóz fermentáló pékélesztővel végeztük, a képződő etanolt GC-vel határoztuk meg.

Balatoni nád: 5% w/V, pH 4,8, 32°C, 25 FPU/g sz.a. + 25 IU BGL/g sz.a., *S. cerevisiae* 2 g/l, 72 óra, a csoportunkban kifejlesztett, CO_2 mérésen alapuló „köttyogó” berendezésben vizsgáltuk, a végső etanol koncentrációt HPLC-vel határoztuk meg.

Fermentációs kísérletek az etanolkoncentráció növelése érdekében

SPS szubsztráton: Az SSF kísérleteket 1 literes bioreaktorokban 37°C-on, 96 órán keresztül folytattuk (pH 4,9-5,0). A szubsztrát (SPS) koncentrációt 2-10% között változtattuk, a hidrolízishez ipari enzimeket használtunk 5-32 FPU/g glükán tartományban (Celluclast 1.5L). A BGL aktivitást minden esetben 28 IU BGL/glükán értékre állítottuk Novozym 188 adagolással. Az erjesztés *S. cerevisiae* kereskedelmi pékélesztővel (5 g/l) történt.

Savas pH-n (4,0): Egy inhibitor toleráns élesztőtörzset (*Saccharomyces cerevisiae* ATTC 26602) pH 4,0-en vizsgáltunk különböző eredetű hemicellulóz hidrolizátumokon (SPS, SPW, SPW(+ SO_2), SPCS I) úgy, hogy az eredeti cellulózrostnak megfelelő glükózt (100% glükán konverziót feltételezve) adagoltuk a táptalajokba.

Kluyveromycesekkel: Az élesztőtörzsek inhibitor tűrését először fermentációs teszttel vizsgáltuk 42°C-on, 25 ml-es lombikokban a gőzrobbantással előkezelt lucfenyő (SPS) folyadék frakcióján (HH) illetve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -dal méregtelenített (DHH) szűrleten (glükózzal 30 g/l fermentálható cukortartalomra kiegészítve), hogy kiválasszuk az inhibitorokat és a nagy hőmérsékletet leginkább toleráló élesztőtörzset.

Az SSF kísérleteket 1 literes bioreaktorokban hajtottuk végre (42°C, pH 5,0) úgy, hogy a gőzrobbantással előkezelt lucfenyő (SPS) zagyot 5%-osra hígítottuk, s az enzimes hidrolízishez ipari enzimeket (Novozymes) 37 FPU/g glükán illetve 38 IU BGL/g glükán

dózisban, az erjesztéshez 5 g/l élesztő sz.a.-ot alkalmaztunk (1 napos inokulum). A kísérlet 96 óráig tartott.

OCC és papíriszap szubsztrátok felhasználása: 750 ml-es Erlenmeyer lombikokban, 6% SF, OCC, vagy papíriszap, 15 FPU/g sz.a. + 15 IU BGL/g sz.a., indulási élesztőszám: 2×10^9 sejt/ml, 40°C, 96 h, rázatás 300/perc fordulatszámon. A NSSF kísérletekben 24 órás 50°C-os előhidrolízis előzte meg az SSF-et.

Nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár: a hidrolízist 8% sz.a. koncentrációval kezdtük, majd további részletekben (5 óránként adagolva) emeltük a koncentrációt először 12, majd 20% sz.a.-ra. A szétválasztott, mosott rostot HH segítségével hígítottuk a kívánt koncentrációra. Nem-izotermál SSF kísérletet hajtottunk végre, ami azt jelenti, hogy a szükséges enzimdózszt két részben adagoltuk, először egy résszel 50°C-on 24 órán keresztül előhidrolizáltuk a zagyot (5-10 FPU/g sz.a.), majd 30°C-on adagoltuk az enzim koktél második részét (5-20 FPU/g sz.a.) az élesztő inokulummal (1 g sz.a./l) együtt. Az enzimes hidrolízishez ipari enzimeket (Novozymes) alkalmaztunk külön BGL adagolással (1:1 arányban).

Első és második generációs etanolfermentáció összekapcsolása: az α -amilázzal előcukrosított búzadara (2 h), az előkezelt búzaszalma és ezen anyagok különböző arányú keverékeinek SSF konfigurációjú erjesztését 2 l-es laboratóriumi fermentorban végeztük 5% WIS koncentráció mellett. A 15 FPU/g glükán és 17 IU BGL/g glükán enzimdózszt Celluclast 1.5L és Novozym 188 enzimekkel biztosítottuk. A képződött etanolt HPLC-vel határoztuk meg.

4.8 Cellulázok és lignocellulóz komponensek felhasználása egyéb iparokban

4.8.1 Szekunder rostok kezelése

A szekunder rostok (4.1.4. fejezet) enzimes kezelésének körülményei az ipari feldolgozás paramétereikhez igazodtak. A 3,5%-os rostsuszpenzió enzimes kezelése 35°C-on (kivéve a termotabil endoglukanázzal végzett kísérleteket) 1,0 ill. 1,5 órás reakcióidővel történt. A megfelelő pH-t az ipari folyamatban retenciós- és flokkulálószerként alkalmazott, annak megfelelő mennyiségű (3%) alumínium-szulfát adagolással biztosítottuk.

A szekunder rostok víztelenedésének jellemzése Schopper-Riegler őrlésfok méréssel történt, az EN ISO 5267-1 szabvány szerint. Az őrlésfok a papíriparban a köztitermék, a rostsuszpenzió víztelenedésének jellemzésére használt mérőszám.

Az enzimes kezelések fizikai és mechanikai tulajdonságokra gyakorolt hatásának megállapítása a rostsuszpenzióból szabványos körülmények között készült próbalapokon, meghatározott paraméterű légtérben klimatizált mintákon való mérésekkel történt.

A próbalapok Rapid-Köthen lapképző berendezésen, az ISO 5269-2 szabvány szerint készültek. A próbalapok légáteresztését Gurley denzométeren, az MSZ 5470 szabvány szerint mértük, majd az adott felületen ($4,32 \text{ cm}^2$) adott mennyiségű (100 ml) levegő áteresztéséhez szükséges idő értéket ml/s értékre számoltuk át. A próbalapok mechanikai tulajdonságainak, azaz repesztő-, szakító- és tépőszilárdságának mérése az MSZ 5361, az MSZ ISO 1924-1 és az MSZ ISO 1974 szabvány szerint történt.

4.8.2 Takarmányok enzimes kezelése

A celluláz-hemicelluláz aktivitású készítményt a *T reesei* Rut C30 fermentációjával állítottuk elő hullámpapír hulladék szénforráson, amelyet betöményítés után permetezéssel (1 liter koncentrált fermentlé/100 kg takarmány) juttattunk a kereskedelmi nyúltáp (nyersfehérje 18,0%, nyerszsír 4,4%, nyersrost 14,4%) felületére. A rápermetezett mennyiség 7040 FPU celluláz aktivitással rendelkezett. A nyulak a kezelt, illetve az ugyanazon összetételű, de enzimkiegészítés nélküli kontroll tápot, valamint szopókás önitatóból az ivóvizet tetszés szerint fogyaszthatták. Kísérletünk célja volt, hogy korai elválasztás (23. nap) mellett összehasonlítsuk a celluláz enzimmel kiegészített és a kezelés nélküli takarmányt fogyasztó nyulak jellemzőit.

4.8.3 Lignocellulóz komponensek felhasználása bioműanyagok tulajdonságának javításában

TPS készítése adalékokkal: száraz keményítő, glicerín és adalék (cellulóz, hemicellulóz, zein) meghatározott tömegarányú mennyiségeit (70 g + 30 g + 10 g) erőteljes összekeverés után a BME Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszékén belső keverővel plasztikáltuk. A homogén megömlesztett keveréket lapokká préseltük, majd próbatesteket vágunk ki, ezeket használtuk a mechanikai tulajdonságok, a vízadszorpció és az enzimes bonthatóság meghatározásához.

Vízadszorpció vizsgálata: a különböző páratartalmú légtereket telített sóoldatokkal illetve desztillált vízzel exsikkátorokban állítottuk elő. 3-3 g TPS minta tömegnövekedését határoztuk meg az egyensúly beállta után (ált. 12-14 nap).

Biodegradáció vizsgálata amilolitikus enzimekkel (BAN 480 és AMG 300L, Novozymes) 250/perc rázatású légfürdős rázógépen (pH 4,8, 50°C, 3 nap) úgy történt, hogy a TPS próbalapokat aprítottuk, s az így nyert zaggal 5 g/80 ml reakcióelegyen végeztük a hidrolízist. A mintákból meghatározott redukáló cukor tartalom a keményítő degradációt jelezte.

4.9 Analitika

4.9.1 Nyersanyagok makrokomponenseinek meghatározása

A biomassza, valamint az előkezelt biomassza lignin és szénhidrát komponenseinek meghatározása kétlépéses kénsavas hidrolízissel történt Hägglund módszere szerint (Hägglund, 1951, Sluiter és mtsi., 2008). A kénsavas hidrolízis első lépésében 72%-os kénsavval roncsoljuk a nyersanyagot, majd ezt követi a híg savas lépés (4%-os H₂SO₄) 1 órán át 121°C-on. A hidrolízis felülúszóját HPLC-vel (4.9.2) elemezve megkapható a szénhidrátok, ecetsav, furfurool, HMF koncentrációja. A szilárd maradék (desztillált vizes mosás és szárítás után) a savoldhatatlan lignin mennyiségét adja, melyet a hamutartalmával korrigálunk. Amennyiben a biomassza keményítőt is tartalmaz, azt a kénsavas hidrolízis előtt, HCl-val, vagy amilolitikus enzimekkel el kell hidrolizálni, s a monomereket HPLC-vel (4.9.2) meghatározni.

A folyadékfrakció (HH, F) analízise közvetlenül és 8%-os kénsavval történő (121°C) hidrolízis után (a dextrineket monomerekké hidrolizálva) történt.

A kukoricaszár nedves oxidációs és gőzrobbantásos kezeléseirehhez felhasznált mintákat, valamint az előkezelés szilárd, mosott maradékát Goering és van Soest (1970) módszerével elemeztük. A módszer lényege, hogy semleges detergenssel mossuk ki a vízóldható ásványi

anyagokat, szabad cukrot, lipideket és fehérjéket, majd savas detergenssel a hemicellulóz frakciót. A lignint kálium-permanganáttal oxidáljuk, s a hamutartalommal korrigált maradék adja a cellulózt. A cellulóz és hemicellulóz meghatározás jó egyezést adott az általánosan használt (Hägglund, 1951) módszerrel.

4.9.2 HPLC analízis

A nyersanyagelemzés során kapott felülúszók monoszacharid elemzését HPLC mérésel végeztük. A mérendő mintát 0,45 μ m pórus átmérőjű regenerált cellulóz szűrőn (ProFill) szűrtük, a komponensek elválasztása Aminex HPX-87H+ kationcserélő kolonnán (300x7,8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 65°C-on, a detektálás törésmutató mérésével (Shimadzu RID-10A, Japán) történt. Az analitikai kolonna előtt Cation-H (Bio-Rad) előtét-kolonnát alkalmaztunk. A mozgó fázis 5 mM-os H₂SO₄, az áramlási sebesség 0,5 ml/perc volt. A módszer a monoszacharidok mellett alkalmas etanol, furfurool, HMF, ecetsav és cellobióz mérésére is (monomerek átszámolásához alkalmazott faktorok: glükán: 0,9, pentozán: 0,88).

Az extrahált hemicellulózok cukorösszetételét, valamint egyes kísérletekben a cellulodextrineket nagyhatékonyságú anion-cserés folyadékkromatográffal (HPLC–PAD, Dionex, USA) mértük. A rendszer ED40 elektrokémiai detektorból, GP40 gradiens pumpából, AS50 automata mintaadagolóból és Carbopac PA-10 analitikai kolonnából állt. A mozgófázis Millipore víz volt, 1,0 ml/perc térfogat áramlási sebességgel. A monoszacharid összetételt közvetlenül az extrakció után illetve savas hidrolízist (a mintával azonos mennyiségű 0,4 M kénsavval, 121°C-on, 60 percig) követően is mértük, a kettő különbsége megadja az oligomer, illetve polimer formában kinyert szénhidrátok mennyiségét.

4.9.3 Méretkizárásos kromatográfia (SEC)

Az extrahált hemicellulózok molekulatömegét méretkizárásos kromatográfia segítségével határoztuk meg, mely Superdex 75 és 200 kolonnák FPLC rendszerben (GE Healthcare, Svédország) történő összekapcsolásából állt. A minta 0,5 ml-ét vittük fel az oszlopra, majd 0,5 ml/perc áramlási sebességű Millipore vízzel eluáltattuk. A detektálás törésmutató mérésével (RI detektor, Erma-Inc, Japán) történt. A molekulatömeg meghatározásához dextrán (Fluka Chemie AG, Svájc) kalibrációs sort használtunk.

4.9.4 Redukálócukor tartalom meghatározása

Elsősorban az enzimés hidrolízisek, valamint az etanolfermentáció során felmerül az azonnali cukormeghatározás szükségessége, ezt Miller (1959) dinitroszalicilsavas (DNS) redukálócukor tartalom meghatározási módszerével végeztük, amikor is meghatározott térfogati arányokkal 5 percig forraltuk a reakcióelegyet a DNS reagenssel, majd hűtés és hígítás után kolorimetriásan határoztuk meg a cukorkoncentrációt. Standardként glükózt, esetenként xilózt alkalmaztunk.

4.9.5 Fehérjetartalom meghatározás

Fermentlevek oldott fehérjetartalmának meghatározása Coomassie Brilliant Blue G250 (Bradford, 1976), illetve Folin reagenssel (Lowry és mtsi., 1951) történt, bovin szérum albumint (BSA) standard alkalmazásával.

Szilárd minták nyersfehérje tartalmát Dumas módszerrel (Watson és Galliher, 2001) határoztuk meg.

4.9.6 Glükóz, ammónia meghatározás enzim kittel

Glükózt is és ammóniát is bizonyos fermentációs kísérletekben szelektív enzim kettekkel határoztunk meg (Boehringer, Ingelheim, Germany).

4.10 Számítások, a módszerek pontossága

Az enzimesen kezelt szekunder rostokból készült próbalapok tulajdonságainak vizsgálatánál megadtuk a statisztikai adatokat, a többi kísérletnél nem (eltekintve egyes oszlopdiagramokon bejelölt szórásoktól), ennek az az oka, hogy a fermentációs kísérleteket, az enzimes hidrolíziseket, enzimaktivitásméréseket, nyersanyagelemzéseket rutinszerűen végeztük, csaknem minden alkalommal három párhuzamos méréssel, kis szórással, s így a közölt átlagértékek jól tükrözik az elért eredményeinket.

A dolgozatban rendszeresen szereplő módszerek pontossága, megbízhatósága:

DNS redukáló cukor meghatározás, HPLC analízis, enzimaktivitások (oldható szubsztrátokkal): a tapasztalati szórás valamennyi esetben jellemzően 1% alatt volt.

Az enzimes hidrolízis, szilárd szubsztrátos aktivitásmérések, enzimadszorpció és nyersanyagelemzés esetén a tapasztalati szórás valamennyi esetben 5% alatt volt.

Enzimfermentáció, valamint etanolfermentáció esetén csak az azonos inokulummal, egyidejűleg folytatott kísérletekre mondható el, hogy a tapasztalati szórás 5% alatt volt.

5 Eredmények és következtetések

5.1 Lignocellulózok előkezelése, frakcionálása

A komplex lignocellulóz struktúra megbontására különféle nyersanyagoknál (kukoricaszár, kukoricarost, cukorcirok bagasz, kender és kenderpozdorja) más és más módszert vizsgáltunk. Célunk olyan előkezelési eljárások kidolgozása/ kiválasztása volt, amelyek jelentősen javítják a lignocellulóz szubsztátok enzimés bonthatóságát. Kísérleti munkánkban kémiai és a fizikai-kémiai előkezeléseket alkalmaztunk. Az előkezelésekkel szemben felállított kívánalmaink a következők voltak:

- az előkezelés hatására jelentősen növekedjen a szénhidrát frakció enzimés bonthatósága,
- az előkezelés hatására az egyes frakciókat (cellulóz, hemicellulóz, lignin) el lehessen egymástól különíteni, lehetőséget teremtve a szeparált hasznosításra,
- minimális legyen a hemicellulóz és a cellulóz frakció bomlása/vesztesége az előkezelés alatt,
- ne keletkezzenek olyan melléktermékek, amelyek a későbbi enzimés és mikrobiológiai folyamatokat gátolják,
- az előkezelési technológia legyen környezetbarát, lehetőleg kis energia és/vagy vegyszer felhasználással,
- az előkezelés lehetőleg egyszerű legyen, alkalmasint beilleszthető egy „farm szintű” etanol technológiába.

5.1.1 Kukoricaszár előkezelése

Előkezeléseink a kémiai előkezeléseken kívül, melyeknek feltétlen előnye, hogy nincs speciális eszközigénye, kiterjedtek a fizikokémiai kezelésekre, melyeket részben Dániában (nedves oxidáció), részben Svédországban (gőzrobbantás) nemzetközi együttműködésben hajtottunk végre, melyet a szakmai ismeretségen kívül egy, az Európai Unió 5. keretprogramjában elnyert pályázatunk tett lehetővé (TIME ENK6-CT-2002-00604).

5.1.1.1 Kémiai előkezelések

(1., 2. cikk)

Az előkezelést 0,5-5% közötti H_2SO_4 koncentráció alkalmazásával 120°C-on, 60-120 perc kezelési idővel S: 10% hajtottuk végre. Az előkezelési paramétereket és az előkezelés során nyert szilárd frakciók mennyiségét és összetételét az 5. táblázat tartalmazza.

A kukoricaszár szárazanyagtartalmának 9-11%-a már a vizes kezelés hatására kioldódott. A savkoncentráció emelésével a pentozántartalom folyamatosan csökkent, a glükán tartalom még 5%-os kénsav koncentrációnál is 38,6% volt (1 órás kezelési idő), ami azt jelenti, hogy a cellulóz még itt is érintetlen maradt. A 3,0-3,5% glükán tartalom csökkenés a hemicellulóz glükán komponensének hidrolízise miatt következhetett be. A reakcióidő hatása jelentős, 2%-os kénsavas kezelésnél a két órás reakcióidő 24% glükán csökkenést okozott. A 6. táblázat az előkezelések során kioldódott glükán és pentozán mennyiségeket tartalmazza, melyeket monomerként határoztunk meg a felülúszókból.

5. táblázat Szilárd maradék össztömege és főbb komponensei kukoricaszár híg kénsavas előkezelése után

Előkezelési körülmények			Előkezelések után kapott szilárd maradékok		
C _{sav} [%]	t _r [perc]	sarzs	Száraz tömege [g/100g sz.a.]	Glükán [g/100g sz.a.]	Pentozán [g/100g sz.a.]
Kiindulási anyag (1. sarzs)			100	42,5	19,6
Kiindulási anyag (2. sarzs)			100	43,8	22,6
0,5	60	2	85,2	38,6	13,6
0,5	90	2	81,5	38,0	12,8
0,5	120	2	81,6	37,8	12,7
2	60	1	64,7	38,4	4,8
2	90	1	61,5	37,8	2,0
2	120	2	63,5	33,4	2,1
5	60	1	62,2	38,6	0,3
5	90	1	56,5	31,6	1,0
5	120	2	53,0	28,3	1,4

6. táblázat Az előkezelési felülúszók glükán és pentozán tartalma a híg kénsavas előkezelések után

Előkezelési körülmények			Előkezelések után kapott vizes fázis	
C _{sav} [%]	t _r [perc]	sarzs	Glükán [g/100g sz.a.]	Pentozán [g/100g sz.a.]
0,5	60	2	2,1	6,1
0,5	90	2	2,0	5,9
0,5	120	2	2,4	6,2
2	60	1	1,7	12,4
2	90	1	2,7	18,4
2	120	2	3,8	20,8
5	60	1	2,4	14,8
5	90	1	3,8	20,7
5	120	2	4,5	21,9

A hemicellulóz kioldódásban a H₂SO₄ koncentráció 0,5%-ról 2%-ra történő növelése minőségi változást okozott, az alkalmazott 120°C-os kezelésnél 2% H₂SO₄ katalizátor mellett 90 perc kezelési idő elegendő volt a hemicellulóz frakció 94%-os kioldására, ugyanakkor a szilárd maradék glükántartalma mindössze 11%-kal csökkent. A módszer tehát alkalmasnak mutatkozott a cellulóz és hemicellulóz frakció kiváló elválasztására.

Az előkezelések hatékonyságának vizsgálataként a kezelt minták enzimes bonthatóságát (S: 3%, E/S: 15FPU/g sz.a., 50°C, pH 4,8) is meghatároztunk. A 48 órás hidrolízis eredményeit a 7. táblázat mutatja be.

7. táblázat Előkezelt kukoricaszár enzimes hidrolízisének eredményei

Előkezelési körülmények			Enzimes hidrolízis felülűszó	
C _{sav} [%]	t _r [perc]	sarzs	Glükán [g/100 g sz.a.]	Pentozán [g/100 g sz.a.]
0 (kontroll)			8,5	1,8
0,5	60	2	10,6	2,7
0,5	90	2	13,0	2,9
0,5	120	2	13,0	3,0
2	60	1	17,7	2,8
2	90	1	17,2	1,2
2	120	2	18,7	1,8
5	60	1	19,6	2,8
5	90	1	19,9	0,1
5	120	2	19,2	0,7

Az előkezeléssel nyert rostot (90 perc, 2%-os kénsav) 48 órás hidrolízissel 45,5%-os konverzióval sikerült lebontani. Az előkezelő savkoncentráció, illetve a reakcióidő emelésével az enzimes hidrolízis konverziója javítható (62-67%), de ekkor már jelentős a cellulóz veszteség. Megállapítottuk, hogy a híg kénsavas előkezelést a hemicellulóz frakció elválasztására célszerű alkalmazni, s a hemicellulóz frakció elválasztása után egy második előkezelési lépcsővel célszerű a cellulóz enzimes bonthatóságát tovább javítani. Ily módon egyrészt lehetőség nyílik a hemicellulóz frakció külön felhasználására, másrészt megakadályozzuk a cellulóz előkezeléséhez szükséges erőteljesebb körülmények között fellépő hemicellulóz degradációt.

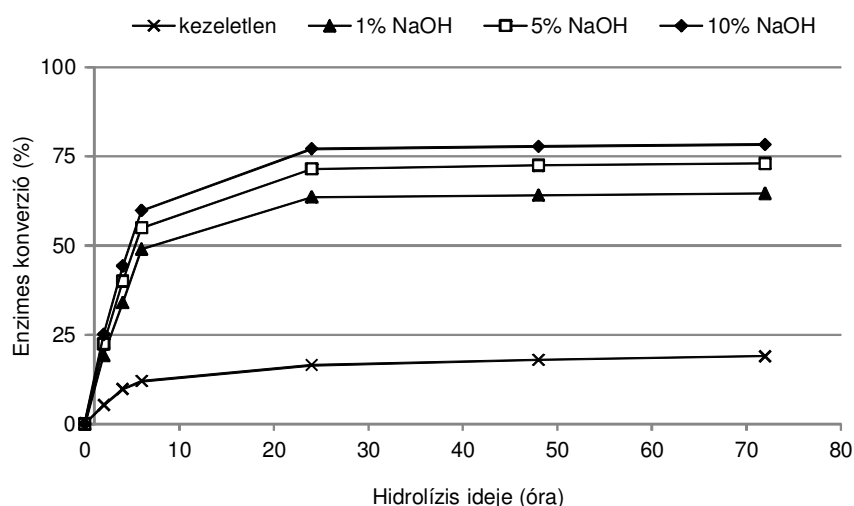
Lúgos kezelés hatására a lignocellulózok két komponense, a hemicellulóz és a lignin részlegesen oldatba megy, a cellulóz pedig duzzad, ezáltal a cellulóz hidrolizálhatósága javul. A 8. táblázat az előkezelések anyagmérlegét mutatja be.

A vegyes és a Ca(OH)₂-os kezelésnél 91-97%-ban, a NaOH-os kezeléseknél 80-89%-ban sikerült mind a cellulózt, mind a hemicellulózt meghatározni a szilárd és folyadék fázisban, de a fázisok szétválasztása nem jelentette a makrokomponensek szétválását. A cellulóz 33-50%-ban, a hemicellulóz 33-82%-ban került a folyadékfázisba a különböző előkezelések során. A vizsgált lúgos és vegyes előkezelési módszerek tehát nem alkalmasak a polimerek szétválasztására.

8. táblázat Fő komponensek az előkezelés után nyert folyadék és szilárd frakcióban (100 g sz.a. kukoricaszárból nyert szilárd és folyadék frakciók)

Előkezelési körülmények		Előkezelt mosott kukorica-szár [g]	Előkezelt mosott rost frakció [g]			Folyadékfrakció [g]	
Konc. [%]	Vegyszer		Lignin	Cellulóz	Hemi-cellulóz	Cellulóz	Hemi-cellulóz
Kezeletlen		100	22,1	41,3	27,9	-	-
1	NaOH	43,8	1,9	28,6	9,5	8,3	14,5
5	NaOH	37,7	1,4	24,0	5,8	10,7	17,9
10	NaOH	32,7	0,9	19,3	3,3	13,6	20,2
2	Ca(OH) ₂	84,5	15,3	37,7	20,7	1,3	4,8
Vegyes:1% NaOH+1% H ₂ SO ₄		34,5	9,2	19,3	4,2	20,7	22,9

A lúgosan előkezelt minták enzimes hidrolízise során keletkező glükózból számított glükán konverzió alakulását mutatja be a 8. ábra.



8. ábra Kezeletlen és lúgosan előkezelt kukoricaszár minták enzimes bonthatósága (50°C, 25 FPU/g sz.a.)

A mosott minták enzimes bonthatósága mintegy négyszeresére növekedett a kezeletlen kukoricaszár minta bonthatóságához képest. Az elért nagy (79%) konverzió ellenére az erős lúggal végzett előkezelés a szilárd fázisban bekövetkezett nagy cellulózveszteség miatt nem javasolható.

A 9. táblázat a kukoricaszárból az előkezelés és az enzimes hidrolízis során keletkező cukor (glükóz+cellobióz+xilóz+arabinóz) mennyiségeket foglalja össze.

9. táblázat 100 g sz.a. kukoricaszárból keletkező cukor mennyisége az előkezelés és az enzimes hidrolízis során (S: 5%, 50°C, 48 óra, pH 4,8, 25 FPU/g sz.a.)

Előkezelési körülmények		Enzimes hidrolízis során keletkezett cukor [g]	Előkezelés során oldatba ment szénhidrát [g]	Előkezelés és enzimes hidrolízis során keletkező szénhidrát [g]
Konc. [%]	Vegyszer			
Kezeletlen		13,4	-	13,4
1	NaOH	27,5	29,5	57,0
5	NaOH	23,8	37,1	60,9
10	NaOH	19,7	44,0	63,7
2	Ca(OH) ₂	14,3	7,1	21,9
Vegyes: 1% NaOH+1% H ₂ SO ₄		24,7	43,6	68,3

A kezelések közül a NaOH-os áztatást követő kénsavas kezeléssel az elméleti konverzió 95,7%-át sikerült elérnünk, ami igen kiváló, ezzel együtt a többszöri elválasztás és mosás jelentősen megnöveli a veszteségeket, s emellett a felülúszók hasznosítása sem megoldott. Célszerű a vegyszerek sorrendjét felcserélni, először alkalmazni a híg savas kezelést, majd a lúgosat, így a savas felülúszóból a xilóz, a lúgos felülúszóból a lignin hidrolízis termékei hasznosíthatók. Előkísérleteink igazolják ennek a feltevésnek a helyességét.

Az előkezelési idő emelésével (60-ról 90 percre) a lúgkoncentrációt úgy sikerült csökkenteni (0,5% NaOH), hogy az előkezelt rost bonthatósága nem romlott jelentősen (10. táblázat).

10. táblázat Kukoricaszár 0,5%-os NaOH-dal végzett előkezelését (100 ill. 120°C-on) követő enzimes hidrolízis konverzió értékei (50°C, 25 FPU/g sz.a., 48 óra)

T [C°]	Előkezelési idő (0,5% NaOH)		
	30 perc	60 perc	90 perc
	Enzimes konverzió [%]		
100 °C	46,3	62,5	67,0
120 °C	50,5	65,8	80,1

5.1.1.2 Előkezelés nedves oxidációval és gőzrobbantással (3., 4. cikk)

A 11. táblázat a nedves oxidációnál alkalmazott kísérleti körülményeket tartalmazza, a lúgos kezeléseknél (A és D) 2 g Na₂CO₃-ot, a savas kezeléseknél (C és F) 1,9 ml 36,5%-os kénsavat alkalmaztunk katalizátorként.

11. táblázat Előkezelési körülmények

	A	B	C	D	E	F
Hőmérséklet (°C)	185	185	185	195	195	195
Idő (perc)	5	15	5	15	5	15
pH előkezelés előtt	9,2	7,3	3,5	9,2	7,3	3,5
pH előkezelés után	5,7	3,5	3,4	3,9	4,0	2,7

A 12. táblázat tartalmazza a kukoricaszárból nedves oxidációs előkezeléssel nyert cellulóz és hemicellulóz mennyiségeket a szilárd és folyadék frakciókban.

12. táblázat Fő komponensek megoszlása a folyadék és szilárd frakcióban (100 g sz.a. kukoricaszárból nyert szilárd és folyadék frakciók)

Előkezelési körülmények	Előkezelt mosott kukorica-szár [g]	Előkezelt mosott rost frakció [g]		Folyadékfrakció [g]	
Konc. [%]		Cellulóz	Hemicellulóz	Glükán	Pentozán
Kezeletlen	100	41,0	33,7	-	-
A (Alk-185-5)	76,4	38,7	21,6	1,4	3,9
B	53,3	37,8	3,3	2,5	17,2
C	65,1	39,8	9,2	1,0	13,7
D (Alk-195-15)	48,6	34,9	2,6	3,1	17,2
E	60,0	39,2	6,9	1,4	13,8
F (Ac-195-15)	53,7	36,2	0,9	2,1	17,9

A cellulóz igen jó kihozattal a szilárd fázisban maradt (92-97%) ez alól csak a 15 perces, katalizátort is alkalmazó beállítások (D és F) a kivételek (85, 88%). A hemicellulóz frakció egyetlen kivételtől (A) eltekintve nagymértékben (72,7-99,7%) kioldódott a szilárd frakcióból. A 13. táblázat az előkezelések cellulóz és hemicellulóz visszanyerését tartalmazza.

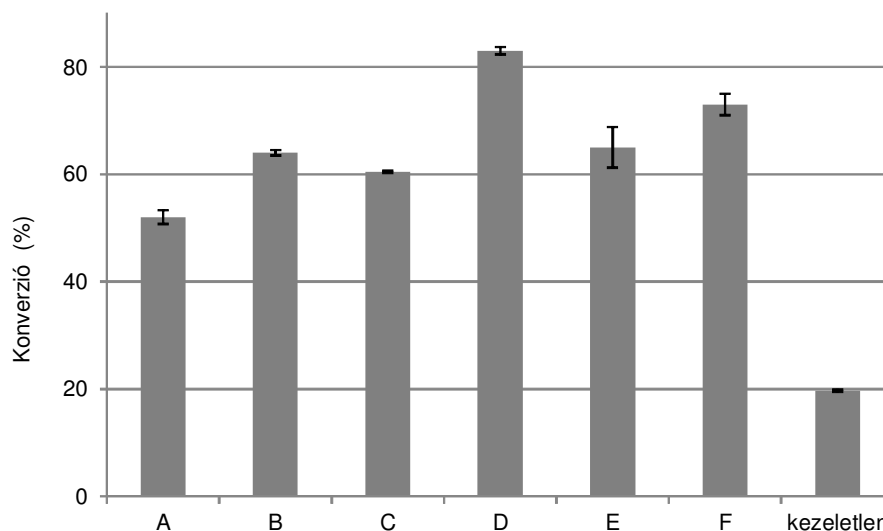
13. táblázat Az egyes komponensek visszanyerése (%) a nedves oxidációs előkezelések után

Komponensek	Komponensek visszanyerése az egyes (A-F) előkezeléseknél [%]					
	A	B	C	D	E	F
Hemicellulóz	76,0	60,3	69,5	60,1	64,9	57,2
Cellulóz	98,0	98,7	99,6	92,6	98,3	93,4

A cellulóz visszanyerés 98-99,6%-os volt, kivéve a 15 perces 195°C-os sav- ill. lúgkatalízissal lefolytatott kezeléseket (D és F), ahol 92,6 ill. 93,4%-os visszanyerést tapasztaltunk; a hiányzó 6,6-7,4% a bomlás miatti veszteség. A hemicellulóz anyagmérleget

kevésbé sikerült zárni, itt 42,8-24% közötti a veszteség; a legnagyobb a 15 perces 195°C-os savkatalízissel végzett előkezelésnél (F).

Az nedves oxidációs előkezeléssel nyert mosott szilárd frakciók enzimes bonthatóságának (glükánkonverzió) eredményeit a 9. ábra tartalmazza összehasonlítva az eredeti, kezeletlen kukoricaszárral.



9. ábra Glükánkonverzió a kukoricaszár nedves oxidációs előkezelésével nyert mosott rost enzimes hidrolízisében (S 2%, E/S 25FPU/g sz.a., pH 4,8, 50°C, 24 óra)

A legjobbnak (D) bizonyuló nedves oxidációs előkezelés (60 g/l kukoricaszár, 195°C, 15 perc reakcióidő, 12 bar O₂, 2 g/l Na₂CO₃) hatására az enzimes bonthatóság négyszeresére növekedett a kezeletlen kukoricaszárhoz képest. Ennél az előkezelésnél a hemicellulóz frakció 60%-a oldatba ment, de csak 36-45%-a volt mono-, vagy oligiszacharidként visszamérhető a szűrletben. A cellulózfrakció 85%-a a szilárd frakcióban maradt a lignin 70%-ával együtt. Az ugyancsak 195°C, 15 perc reakcióidő mellett 0,5 ml 96% H₂SO₄ katalízissel lefolytatott (F) előkezelésnél a glükánkonverzió 11%-kal kisebb, de a cellulóznak itt 88%-a megmaradt a szilárd frakcióban. A 14. táblázat mind a HPLC analízis alapján meghatározott glükán konverziókat, mind a DNS redukáló cukor tartalom mérés alapján meghatározott cukrosítás értékeket tartalmazza.

14. táblázat A szilárd maradék cellulóztartalmának konverziója (HPLC analízis alapján), illetve az elcukrosítás mértéke (DNS összecukor mérés alapján) 24 h enzimes hidrolízis után (50°C, 25 FPU/g sz.a.) az összes cellulóz, illetve összes cellulóz és hemicellulóz %-ában

	Kezeletlen kukoricaszár	A	B	C	D	E	F
Glükán konverzió	18,1	52,0	62,0	61,7	83,1	63,0	73,7
Cukrosítás	18,9	52,2	73,9	70,3	93,0	68,3	78,7

24 órás hidrolízis során 25 FPU/g biomassa enzim adagolásnál a leghatékonyabb előkezeléssel nyert mintán 50°C-on 83,1%-os glükánkonverziót értünk el. Az enzimes

hidrolízis hőmérsékletét 40°C-ra csökkentve a reakcióidő megháromszorozásával sikerült a szükséges enzimdózszt jelentősen lecsökkentenünk, 5 FPU/g biomassa enzimadagolás mellett az elért glükán konverzió 71% lett (részletes adatok: Varga és mtsi., 2003).

Gőzrobbantással 190-210°C között 13 különböző beállításnál végeztünk előkezeléseket, az előkezelésekkel nyert mosott szilárd frakció összetételi adatait a 15. táblázat tartalmazza.

15. táblázat A gőzrobbantásos előkezelések után meghatározott cellulóz- és hemicellulóztartalom a szilárd frakcióban (100 g sz.a. kukoricaszárból nyert szilárd frakciók)

Előkezelési körülmények			Komponensek a szilárd fázisban [g]		
T	C _{sav}	t	sz.a.	Cellulóz	Hemicellulóz
[°C]	[%]	[min]			
kezeletlen kukoricaszár			100,0	41,6	31,3
190	0,5	2	69,4	33,3	15,3
		5	62,5	29,6	12,2
	2	2	48,4	25,3	3,9
		5	49,1	24,2	1,4
200	0,5	2	67,7	32,9	9,4
		5	65,3	32,6	8,5
	2	2	50,1	24,1	4,6
		5	41,1	20,0	1,1
210	0,5	2	61,4	30,7	6,4
		5	58,2	30,2	5,8
	2	2	41,2	17,4	2,3
		5	36,9	13,9	0,7
210	-	5	85,4	38,6	24,3

A kénsavkatalízis mellett végzett előkezeléseknél a savkoncentráció, reakcióidő és az alkalmazott hőmérséklet függvényében a cellulóz 33%-a (2%, 5 perc, 210°C), illetve a legenyhébb körülmények között (0,5%, 2 perc, 190°C), 80%-a maradt a szilárd fázisban. A hemicellulózra vonatkozó értékek ugyanezen körülmények között: 3%, illetve 49%. Amennyiben nem alkalmaztunk savkatalízist, 210°C-on 5 perc kezelési idő esetén a cellulóz 92,7%-a, a hemicellulóz 77,6%-a maradt a szilárd fázisban. A folyadékfázisból a további hasznosíthatóságra kívántunk információt nyerni azáltal, hogy a szénhidrátok mellett az ecetsav, a HMF és a furfurol koncentrációját is meghatároztuk, mérési eredményeinket a 16. táblázat tartalmazza. A 17. táblázat az előkezelés során meghatározott cellulóz és hemicellulóz visszanyerést mutatja be.

16. táblázat A gőzrobbantásos előkezelések során nyert folyadék frakciók anyagösszetétele (100 g sz.a. kukoricaszárból nyert folyadék frakciók) és inhibitor tartalma

Előkezelési körülmények			Komponensek a folyadék fázisban				
T	C _{sav}	t	Glükán	Pentozán	Ecetsav	HMF	Furfurol
[°C]	[%]	[min]	[g]	[g]	[g/l]	[g/l]	[g/l]
190	0,5	2	3,3	9,6	0,7	0,1	0,4
		5	6,1	12,7	1,0	0,1	0,7
	2	2	10,1	17,4	2,4	0,2	2,7
		5	12,0	18,7	1,8	0,1	1,5
200	0,5	2	4,0	12,0	1,1	0,1	0,9
		5	2,6	10,8	1,5	0,1	0,8
	2	2	7,1	14,2	1,6	0,2	1,5
		5	11,9	16,7	2,1	0,3	2,6
210	0,5	2	3,5	12,7	1,2	0,1	1,0
		5	4,4	14,0	1,7	0,2	1,7
	2	2	11,8	14,0	2,2	0,3	2,6
		5	14,9	14,8	3,4	0,5	4,6
210	-	5	1,2	5,8	0,7	0,1	0,2

A HMF koncentráció valamennyi előkezelésnél kis értéken maradt, az ecetsavé 0,7 és 3,4 g/l között, a furfurolé 0,4 és 4,6 g/l között változott. A *S. cerevisiae* kis koncentrációban a furfurolt és a HMF-t is képes metabolizálni, a gyenge savak inhibíciós hatása a közeg pH-jától függ, protonált formában jelentős lehet a gátlásuk, mert így képesek átdiffundálni a plazmamembránon (Palmqvist és Hahn-Hägerdal, 2000b). Larsson és mtsi. (1999) ugyanakkor a gyenge savak kis koncentrációknál fellépő etanol képződést stimuláló hatásáról számolnak be.

A cellulózvisszanyerés, azaz a folyadék és szilárdfázisból meghatározott cellulóz mennyisége 80% feletti valamennyi 0,5% savkatalízissal végzett előkezelésnél. A hemicellulóz visszanyerések 10-15%-kal gyengébbek. Kiemelkedően jó a savkatalízis nélküli 210°C-os előkezelés, ahol cellulózra 95,9%-os, hemicellulózra 93,8%-os visszanyerést határoztunk meg. A 18. táblázat a különböző kísérleti körülmények között gőzrobbantással előkezelt kukoricaszár enzimes hidrolízisének eredményeit tartalmazza.

A katalizátor nélküli előkezelésnél a maradék szilárdanyag konverziója csak 14%-kal jobb, mint a kezeletlen mintáé, hiába remek a cellulóz és hemicellulóz visszanyerés, ez az előkezelés nem alkalmas sem a fázisok szétválasztására, sem az enzimes bonthatóság javítására.

17. táblázat Cellulóz és hemicellulóz anyagmérlege kukoricaszár gőzrobbantásos előkezelésekor

Előkezelési körülmények			Visszanyerés [%]	
T	C _{sav}	t	Cellulóz	Hemicellulóz
[°C]	[%]	[min]		
190	0,5	2	88,0	79,6
		5	85,8	79,6
	2	2	85,0	68,1
		5	87,2	64,2
200	0,5	2	89,7	68,4
		5	84,6	61,7
	2	2	75,0	60,0
		5	76,7	56,9
210	0,5	2	82,2	61,0
		5	83,2	63,3
	2	2	70,2	52,1
		5	69,2	49,5
210	-	5	95,9	93,8

A glükán konverziót 200°C, 5 perc, 2% H₂SO₄ alkalmazásakor háromszorosra sikerült növelni az eredeti kukoricaszár enzimes bonthatóságához képest. Ekkor azonban már nemcsak a hemicellulóz frakció 43%-a, hanem a cellulóz frakció 23%-a is elbomlott, s a cellulóz 48%-a, a hemicellulóz 4,4%-a maradt csak a szilárd frakcióban. A 100 g kiindulási kukoricaszárra vonatkoztatott maximális cukorhozamot, 56,1 g-ot, ami az elméleti maximum érték 77,5%-a, 190°C-on 5 perc reakcióidővel 2%-os H₂SO₄-val történő előáztatással sikerült elérni, ekkor a cellulóz 87,2%-a, a hemicellulóz 64,2%-a volt visszanyerhető. Miután a vizsgált előkezelési körülmények között a szénhidrátok megoszlanak a szilárd és folyadékfázis között, nem célszerű a fázisokat szétválasztani, hanem az előkezelt zagyot SSF kísérletben célszerű továbbhasznosítani. Az enzimes hidrolizátumok fermentációs tesztje jó eredményt hozott, az előkezelés körülményeitől függetlenül a hidrolízis során képződött glükózt 84-90%-os hatásfokkal sikerült etanollá alakítani.

18. táblázat A szilárd maradék (mosott rost) cellulóztartalmának konverziója 48 óra enzimikus hidrolízis után (S 5%, E/S 25 FPU/g sz.a.+25 IU BGL/g sz.a., pH 4,8, 50°C), illetve a 100 g (sz.a.) kiindulási kukoricaszárból keletkező cukrok mennyisége a hidrolízis, illetve az előkezelés és az azt követő hidrolízis után

Előkezelési körülmények			Hidrolízis			Előkezelés & Hidrolízis	
T	C _{sav}	t	Konverzió	Glükóz	Xilóz	Glükóz	Összcukor
[°C]	[%]	[min]	[%]	[g]	[g]	[g]	[g]
Kezeletlen kukoricaszár			27,3	12,5	0,2	12,5	12,7
190	0,5	2	47,4	17,4	0,3	20,7	31,9
		5	52,2	17,0	0,2	23,2	35,8
	2	2	71,8	19,2	0,2	29,1	49,1
		5	81,1	21,6	0,5	34,3	56,1
200	0,5	2	58,4	21,1	0,5	25,0	39,2
		5	65,7	23,6	0,5	26,0	38,8
	2	2	65,8	17,4	0,5	24,9	41,4
		5	83,6	18,4	0,3	31,3	50,5
210	0,5	2	67,2	22,7	0,3	26,3	41,0
		5	74,8	24,8	0,4	29,3	45,6
	2	2	74,0	14,2	0,3	27,0	43,3
		5	78,8	12,0	0,3	28,3	45,3
210	-	5	31,1	13,2	0,4	14,2	21,2

A kukoricaszár előkezelése mind kémiai előkezelésekkel, mind gőzrobbantással és nedves oxidációval is megoldható. Ez utóbbiak alkalmazásával az enzimikus bonthatóságot három-, ill. négyszeresre sikerült növelniünk. A híg kénsavas előkezeléseknél a hemicellulóz és cellulóz frakció elválasztása kiváló, így az eljárás lehetőséget teremt a xilán frakció szeparált hasznosítására. Az előkezelt maradék enzimikus hidrolízise nem kielégítő, ezt további előkezeléssel (gőzrobbantás, híg lúgos kezelés) vagy az enzimikus hidrolízisnél az enzimdózis növelésével, segítő enzimek, elsősorban hemicellulázok alkalmazásával lehet javítani. Torget és mtsi. (1991) 91%-os glükánkonverziót értek el a hígsavas előkezelés után, de az ő kísérleteikben a cellulózvesztés nagy, 25%-os volt. A szakirodalomban kukoricaszár előkezelésére kíválónak talált AFEX módszert (Teymourí és mtsi., 2005) nem állt módunkban alkalmazni, a kukoricaszár frakcionálás nélküli hasznosítására valószínűleg ma ez a legjobb módszer, de csak akkor, ha rendelkezésre áll egy, a pentóz és hexóz cukrokat egyaránt jól erjeszteni képes mikroorganizmus. Jó konverzió és a kis cellulózvesztés alapján nedves oxidációs előkezeléseink voltak a legsikeresebbek. A kezelések tovább javíthatók, ha a hemicellulóz frakció vesztésének minimalizálása érdekében mind a gőzrobbantást, mind a nedves oxidációs kezelést egy előzetes híg savas előkezeléssel kombináljuk. 120°C-on 2% H₂SO₄ katalizátor mellett 90 perc alatt a hemicellulóz frakció 94%-a kioldódik, mely külön hasznosítható.

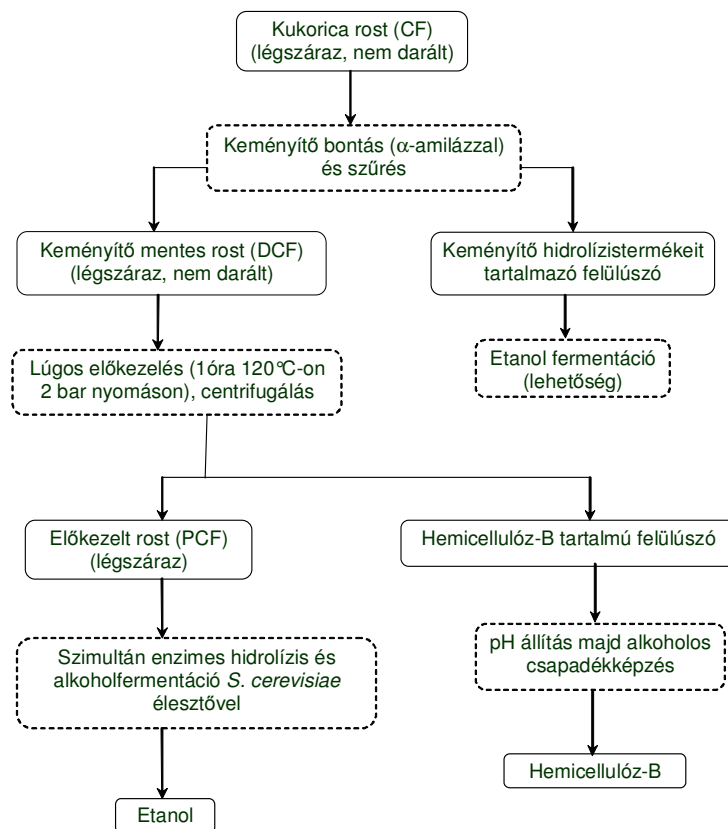
5.1.2 Kukoricarost frakcionálása

A kukoricakeményítő gyártási technológia során mintegy 10%-nyi rost keletkezik (6. ábra), melyet jelenleg állati takarmánként (CGF takarmány), illetve tüzipelletként hasznosítanak az áztatóvíz, a fehérje frakció és a besűrített desztillációs maradék együttes felhasználásával. Egy Széchenyi pályázat keretében (NKFP-OM-00231/2001) alternatív felhasználási módokat kerestünk a napi 300 t rost hasznosítására. A kukoricarost a maradék keményítőn kívül jelentős mennyiségű hemicellulózt (főként xilánt) és cellulózt, valamint kisebb mennyiségben lignint, olajat, fehérjét és szervesetlen hamualkotókat is tartalmaz. Frakcionálási célunk az volt, hogy úgy tegyük a cellulóz frakciót az enzimes hidrolízisre, illetve fermentációs szénforrásnak alkalmassá, hogy közben értékes termékeket nyerjünk. A kukoricarost frakcionálását (előkezelését) vizsgáltuk savas, lúgos, valamint mikrohullámú kezeléssel (semleges körülmények között). Valamennyi kísérletünket amilolitikus enzimekkel keményítő mentesített darálatlan rosttal végeztük (8-10 mm).

5.1.2.1 Kukoricarost előkezelése, lúgos és mikrohullámú frakcionálása

(5., 6., 7., 8. cikk)

A natív kukoricaroston végzett kísérletek a 10. ábrán láthatók.



10. ábra A kukoricarost frakcionálásának lépései

A kezelt és kezeletlen kukoricarost minták szénhidrát összetételét a 19. táblázat tartalmazza.

19. táblázat CF, DCF, illetve lúgosan előkezelt kukoricarost minták szénhidrát összetétele (a sz.a. %-ában)

Előkezelések / minták	Glükán [%]	Xilán [%]	Arabinán [%]
Kukoricarost (CF)	30,3	21,3	11,7
Keményítőmentes rost (DCF)	18,8	26,4	15,0
1% KOH	44,7	23,3	11,3
2% KOH	45,3	23,5	11,5
1% NaOH	46,4	23,3	11,2
2% NaOH	45,2	20,9	10,0

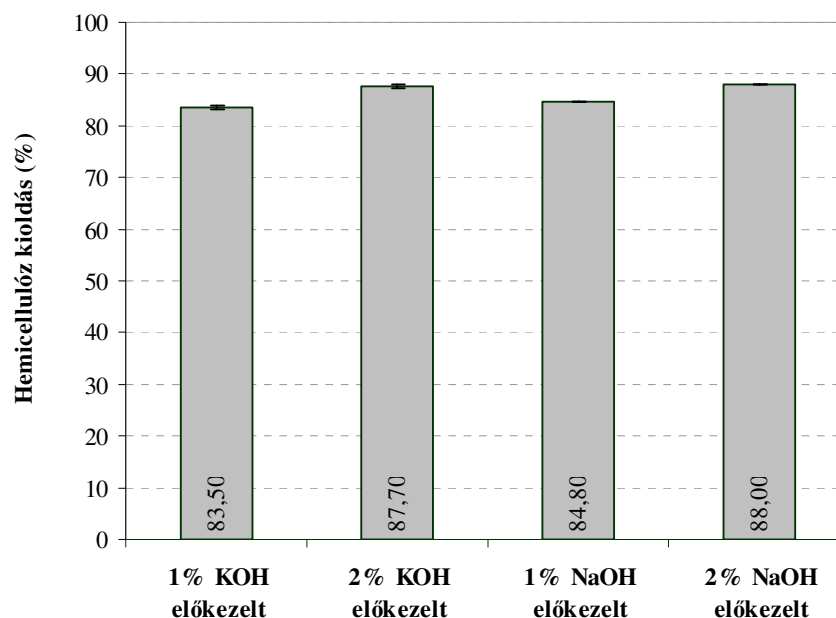
A keményítő eltávolításával a kukoricarost glükán tartalma 30,3%-ról 18,8%-ra csökkent, utóbbi érték a DCF cellulóz tartalmának tulajdonítható. Mivel a többi komponens nem oldódott ki a rostból, így ezek relatív mennyisége a DCF mintában nőtt. A lúgos kezelések hatására a hemicellulóz és lignin részben kioldódott, s ezzel egyidejűleg a glükán tartalom jelentősen emelkedett (46,4%).

Az előkezelt rostokat SSF kísérletekben (S 5%, 25 FPU/g cellulóz, 37°C, 48 h) vizsgáltuk, eredményeinket a 20. táblázat tartalmazza.

20. táblázat Etanolfermentáció előkezelt kukoricarost és SF kontroll szubsztráton

	Etanol [g/l]	Y _{ethanol} [%]
SF	7,4	53,6
DCF	1,3	24,1
1% KOH kezelt rost	12,5	96,9
2% KOH kezelt rost	11,6	89,9
1% NaOH kezelt rost	12,3	91,8
2% NaOH kezelt rost	12,0	94,5

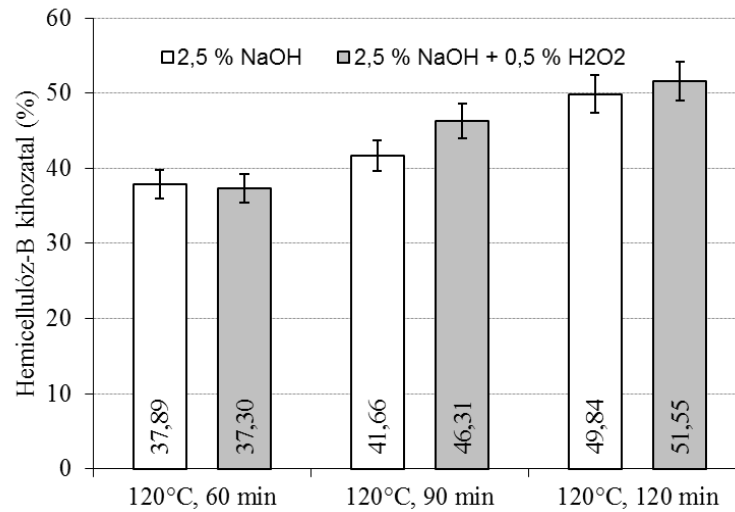
Valamennyi előkezelés kiválóan bizonyult, a glükán koncentrációra számított elméleti etanolhozam 90-97%-át érték el, a DCF 24,1 és a SF 53,6%-ával szemben. A lúgos kezelések hatására oldatba ment hemicellulóz mennyiségek a 11. ábrán láthatók.



11. ábra Az előkezelések során a kukoricarostból a felülúszóba kioldódott hemicellulóz mennyisége

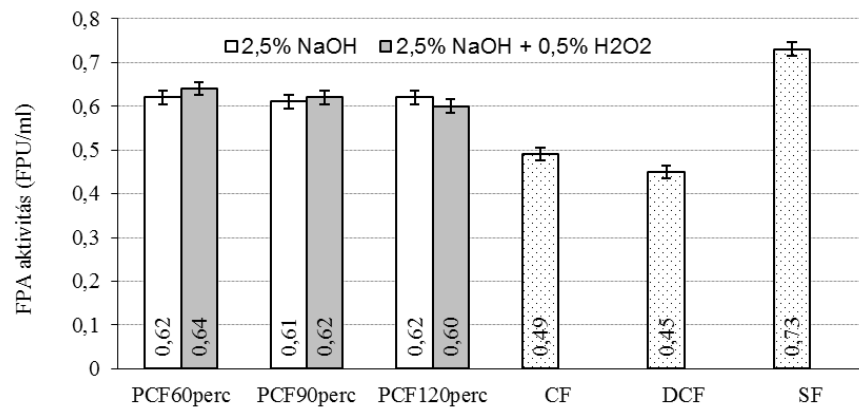
Miután a kukoricarost hemicellulóz tartalmának 83-88%-a oldatba ment, az előkezelés nemcsak a cellulóz szerkezet fellazítására, de a két poliszacharid frakció meglehetősen jó elválasztására is alkalmas. Erre alapoztuk a hemicellulóz izolálására vonatkozó kísérleteinket, amikor a keményítőmentes kukoricarostot 2,5%-os NaOH-dal illetve 2,5%-os NaOH + 0,6%-os H₂O₂-dal kezeltük hat különböző kísérleti beállítás mellett, hogy ilymódon polimer formában izoláljuk a hemicellulózt. 120 perces kezeléssel 80-85%-os kinyerést értünk el. A peroxidos NaOH valamennyi esetben néhány %-kal javította a kihozatait. A fázisok analízise szerint a glükán 53-60%-a, a hemicellulóz 7-15%-a maradt a szilárd fázisban.

A legjobb kihozatait (83,5%) a legerélyesebb körülmények között végrehajtott kezeléssel értük el (2,5%-os NaOH + 0,6%-os H₂O₂, 120°C, 120 perc). A polimer frakciót (CFG) etanolos kicsapással (pH 4,5, 2-szeres tf. etanol) 51,3%-os hatásfokkal nyertük ki a kukoricarost eredeti hemicellulóz tartalmára vonatkoztatva (12. ábra).



12. ábra Az alkoholos kicsapással nyert hemicellulóz-B kihozatalok

A szilárd maradékot, mely a szénhidrátok mellett kevés lignint, rostolajat és fehérjét is tartalmazott, mind enzim hidrolízis szubsztrátjaként (90% feletti glükán konverzió, részletes adatok: Gáspár és mtsi., 2005), mind celluláz enzimermentáció szénforrásaként (13. ábra) sikeresen használtuk fel (5 g/l szénhidrát+ Mandels' sók, *T.reesei* Rut C30, 5 nap).



13. ábra Előkezelt (PCF) mintán, kukoricaroston (CF), keményítő mentes roston (DCF) és SF-on elért szűrőpapír bontó aktivitások (FPA) 5 napos fermentáció után

A 21. táblázat néhány korábbi eredményünkkel hasonlítja össze a PCF és SF szénforrásokon elért FPA és BGL hozamokat.

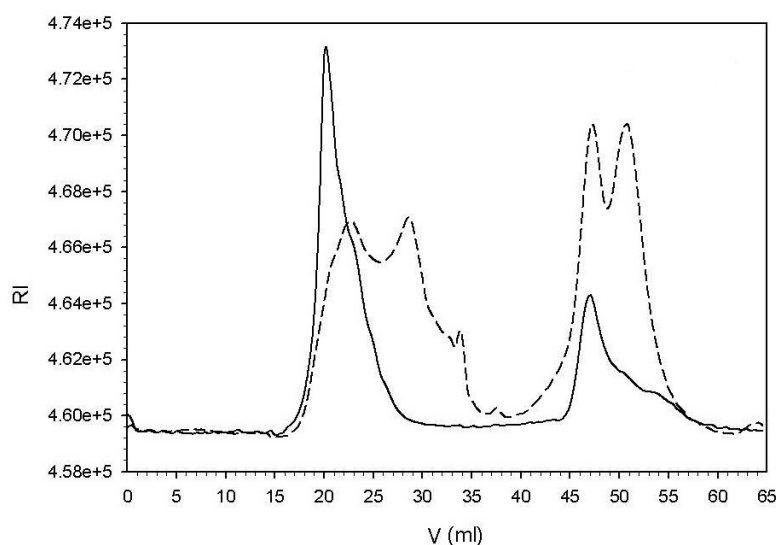
21. táblázat Az előkezelt kukorica roston (PCF) és SF-on elért eredmények összehasonlítása más lignocellulózokon elért enzimhozamokkal

Szénforrás	FPA hozam	BGL hozam
	[FPU/g szénforrás]	[IU/g szénforrás]
PCF	122	56
Solka Floc (SF)	146	102
Papírszap ¹	75	30
Gőzrobbantott fenyő ¹	64	30
Gőzrobbantott fűzfa ¹	139	51

¹Bollók és mtsi. (2000)

A kinyert CFG mintákat termoplasztikus keményítő (TPS) tulajdonságainak javítására használtuk fel cellulózzal és a kukoricából izolált zein fehérjefrakcióval együtt, ezeket az eredményeket az 5.5.3 fejezet tartalmazza.

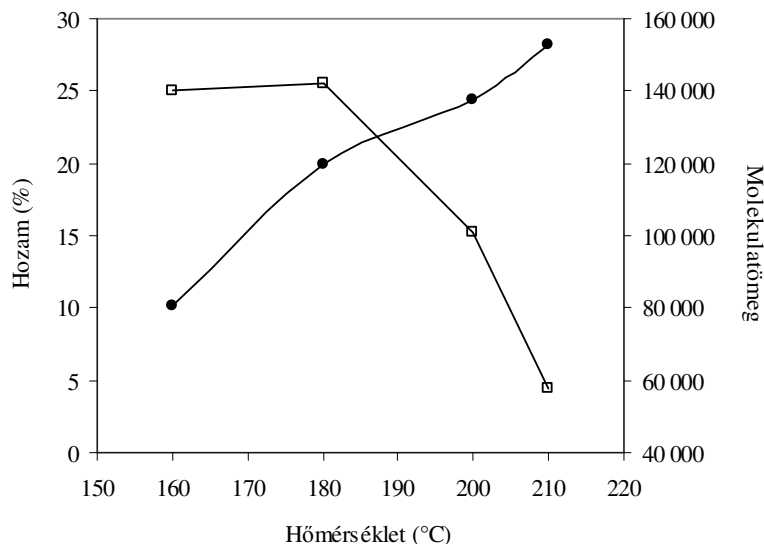
Keményítő-mentesített kukoricarostból katalizátor nélkül, semleges pH-n végrehajtott mikrohullámú kezeléssel is sikerült hemicellulózt izoláltunk. A kezelési hőmérséklet függvényében vizsgáltuk a hemicellulóz kinyerés hatásfokát és az izolált poliszacharid molekulatömegét. A 14. ábrán a 180 és 210°C-on mikrohullámmal extrahált hemicellulóz minták méretkizárásos (SEC) RI kromatogramjai láthatók.



14. ábra 180 (—) és 210°C-on (---) mikrohullámmal extrahált hemicellulóz minták méretkizárásos RI kromatogramjai

Az izolátumok méretkizárásos kromatogramjain látszik, hogy 180°C-on két jól definiálható csúcs van. Ezek közül az első a nagy molekulatömegű frakciót jelzi, a második a kisebb

fragmentumokét. Előbbi területe lényegesen nagyobb, mint a második csúcsé. Ezzel szemben a 210°C-on izolált frakció négy csúcsot mutat, a csúcsok a kisebb molekulaméret irányába vannak eltolódva, és szélesebb, elmosódottabb a haranggörbe, ez jelzi a kisebb, sokféle méretű oligomer fragmentumok jelenlétét. A hemicellulóz kihozatalát növelni tudtuk a reakció hőmérséklet emelésével (15. ábra), de ez az izolált hemicellulóz molekulatömegének jelentős csökkenésével járt együtt. 160°C-on a nyersanyagban levő xilánnak 10%-át sikerült izolálnunk, melynek átlagos molekulatömege $1,37 \times 10^5$ g/mol volt. A reakció hőmérsékletét 210°C-ra növelve a hemicellulóz 30%-át nyertük ki a rostból, de a molekulatömege $5,82 \times 10^4$ g/mol-ra csökkent.



15. ábra Hőmérséklet hatása a mikrohullámmal extrahált hemicellulóz hozamára (●) és molekula tömegére (□)

5.1.2.2 Kukoricarost és kukoricacsíra dara hígsvavas frakcionálása

(9., 10., 11. cikk)

A keményítő-mentesített kukoricarostot híg kénsavas hidrolízisnek is alávetettük azzal a céllal, hogy a hemicellulóz frakciót hidrolizált formában (monomerként) nyerjük ki és válasszuk el a rost többi komponensétől.

A 22. táblázat az előkezelő kénsav koncentrációjának függvényében mutatja be a főbb komponensek tömegének alakulását az előkezelt rostban.

0,9%-os kénsavas kezeléssel (120°C-on, 2 órás reakcióidővel) a kukoricarost hemicellulóz frakciójának 99%-át sikerült oldatba vinnünk. Ezalatt a cellulóz 85%-a a fehérje egy részével, a ligninnel és a rostolajjal együtt a szilárd frakcióban maradt. A hemicellulóz eltávolítása kíváló előkezelést eredményezett, mert a maradék rostanyagot a szokásosnál jelentősen kisebb enzimdózis alkalmazásával (5 FPU/g sz.a.+5 IU BGL/g sz.a.) 91%-os konverzióval sikerült hidrolizálni (50°C, pH 4,8, 48 órás reakcióidő). Az enzimes hidrolízis után visszamaradó szilárd fázis két frakcióra volt elválasztható, a finom rost (10,8 g) tartalmazta a maradék fehérjét (4,1 g) és az olajat (4,6 g), a durva rost (1,9 g) a maradék cellulózt (0,7 g).

22. táblázat Keményítőmentesített kukoricarost (DCF) híg kénsavas kezelése során nyert szilárd maradékok tömege (100 g sz.a. CF-ből) és főbb komponensei a savkoncentráció (%) függvényében

Sav [%]	Száraz tömeg [g]	Cellulóz	Xilán	Arabinán	Fehérje	Lignin	Olaj
DCF/-	73,0	14,4	21,8	11,2	9,6	6,7	2,2
0,5%	27,5	13,8	0,8	0,1	4,2	10,3	2,1
0,7%	27,1	12,5	0,6	0,1	4,4	10,6	3,3
0,9%	24,6	12,2	0,3	0,0	3,8	9,2	3,7
1,1%	23,8	11,6	0,4	0,0	3,2	8,7	2,1
1,3%	23,4	11,4	0,3	0,1	3,0	9,1	2,6
1,5%	25,0	12,9	0,3	0,1	3,0	9,3	3,3

A híg kénsavas előkezelés és enzimes hidrolízis után olyan maradékanyagot kaptunk (finom rost), melyben a maghéjban eredetileg csak 2-3%-ban jelenlevő, s így onnan gazdaságosan nem kinyerhető magháj olaj 45,5%-ra dúsult. Ezáltal megteremtettük annak a lehetőségét, hogy ezt az értékes olajat a kukoricamaghejéből kinyerjük. Emellett a frakcionálás során a következő érdekes jelenségre is figyelmesek lettünk: a magháj eredeti analízisekor meghatározott 2 g extrahálható olaj helyett a keményítő, a hemicellulóz és a cellulóz eltávolítása után visszamaradó ún. finom rost frakcióban 4,6 g extrahálható olajat tudtunk meghatározni a kukoricarost (CF) eredeti 100 g-jára vonatkoztatva. Ez a látszólagos rostolaj mennyiség növekedés valószínűleg a pericarp rétegben eredetileg kötött állapotban, a lipopoliszacharidokban és a lipoproteinekben lévő lipidek felszabadulásának tudható be. A kötött állapotban lévő lipidek felszabadulásával párhuzamosan olyan szterinek és szterinészterek is extrahálhatóvá váltak, amelyek a magháj közvetlen extrahálásával nem voltak kinyerhetőek. A frakcionálás végén kinyert olaj szterin összetétele szignifikánsan különbözött a kukorica csíraolajétól. A frakcionálás végén kinyert olajból a további felhasználásra, pl. funkcionális élelmiszerek előállítására céljából a szterineket, szterinésztereket tisztán ki lehet nyerni.

A kukoricacsíra olaj (mely a kukoricakeményítő gyártás ikerterméke) préselési maradéka a kukoricacsíra dara, melyet jelenleg takarmánykészítésnél használnak fel. Frakcionálásával, a kukoricarostnál kidolgozott biofinomítási koncepció alapján, értékes, egyéb célokra alkalmas anyagokat kívántunk nyerni, de a kukoricarosttól eltérően, nem értünk el éles szétválasztást az egyes komponensek között. A kezelés ezzel együtt hasznos volt, mert a szilárd maradékban meghatározott 15% olajtartalom a kezelésekre hatására 46%-ra emelkedett, mely lehetővé teszi, hogy a kukoricacsíra olaj maradékot egy második préselési lépéssel (és ne oldószeres extrakcióval) nyerhessük ki a darából. A kezelés során elválasztott folyadékfázis glükóz, xilóz illetve arabinóz tartalma fermentációs, vagy kémiai módszerekkel tovább alakítható (részletes eredmények: Kálmán és Réczey, 2008).

A kukoricarost frakcionálását mind lúgos, mind savas előkezelés segítségével sikeresen oldottuk meg. A lúgos kezelésnél a hemicellulózt polimer formában (CFG) kinyerve TPS egyes tulajdonságainak javítására használtuk fel, míg a maradék rostot (PCF) enzimfermentáció szénforrásaként és etanolfermentáció szubsztrátjaként hasznosítottuk. A kukoricarost híg kénsavas előkezelésével a hemicellulóz frakciót 99%-ban sikerült elválasztanunk a szilárd maradéktól, úgy, hogy a cellulóz 87%-a a szilárd maradékban

maradt. A pentóz cukrok hasznosítása különböző eljárásokban lehetséges, fermentációban xilitté (Rao és mtsi., 2006), vagy etanollá (Grohman és Bothast, 1997), esetleg astaxanthinná (Nghiem és mtsi., 2009) alakítható. A savasan előkezelt szilárd rostot egészen kis enzimdózissal (5 FPU/g sz.a.) 91%-os konverzióval hidrolizáltuk, s a maradékból sikeresen nyertük ki a kukoricarost olajat (4,6 g/100 g eredeti rost), mely élettani hatását tekintve még a kukoricacsíra olajnál is kedvezőbb. A savas előkezelést és a szétválasztott frakciók hasznosítását a kisebb savkoncentrációk irányában érdemes tovább vizsgálni, a savkoncentráció csökkentésével (0,5%) ugyanis a szilárd fázisban maradó cellulóz mennyisége akár 96%-ra is emelhető, úgy hogy a hemicellulóz 97%-a továbbra is kioldható marad.

5.1.3 Cukorcirok bagasz előkezelése

A cukorcirok feldolgozásakor visszamaradó lignocellulóz présmaradék, melyet bagasznak nevezzük, átlagosan 36-38% cellulózt, 24-28% hemicellulózt és 18-20% lignint tartalmaz. Amennyiben a cukorcirok felhasználásával gazdaságos etanol fermentációt szeretnénk elérni, feltétlenül foglalkozni kell a bagasz hasznosításával is. A cukorcirok „teljes növény” etanol célú felhasználásának vizsgálatával csoportunk egy „Jedlik” pályázat keretében (NKFP 3/006/2005) foglalkozott.

5.1.3.1 Cukorcirok bagasz előkezelése kémiai módszerekkel (12. cikk)

A *Monori édes* cukorcirokból nyert bagaszt (S 10%) többféle lúgos előkezelésnek vetettük alá, amikor a hőmérséklet és reakcióidő, az alkalmazott lúg fajtája és koncentrációja voltak a változó paraméterek. A szilárd fázis szénhidrátösszetételét és az enzimes hidrolízis konverzióját (S 2%, E/S 20 FPU/g sz.a. + 40 IU BGL/g sz.a., pH 4,8, 50°C, 48 óra) vizsgáltuk a kezelések függvényében (23. táblázat).

23. táblázat Előkezelt bagasz összetétele és enzimes konverziója (48 óra hidrolízis után)

Előkezelési körülmények		Összetétel [%]		Konverzió[%]
T/t	C/lúg	Glükán	Xilán	Össz szénhidrát tartalomra DNS alapján
25 °C/	1% NaOH	48,2	25,2	68,4
3 nap	2% NaOH	50,0	23,3	86,8
	1% KOH	44,6	24,3	33,1
	2% KOH	48,6	24,4	83,2
121 °C/	1% NaOH	49,6	25,8	90,5
1 óra	2% NaOH	66,9	28,8	94,6
	1% KOH	45,8	24,6	57,6
	2% KOH	64,9	29,4	89,2
Kezeletlen kontroll		36,3	25,6	20,4

Az előkezeléseket követő enzimes hidrolízis során a legjobb konverzió értékek elérték a 91-95%-ot (1 és 2%-os NaOH, 121 °C, 1 óra), szemben a kezeletlen nyersanyag 20%-ával. Az

előkezelések gyenge pontja a viszonylag nagy cellulóz veszteség és a gyenge erjeszthetőség (58, ill. 51%) volt. Szobahőfokon történő előkezelés (1 és 2%-os NaOH-dal) 68 és 87%-os szénhidrát konverziót és jó erjeszthetőséget eredményezett (részletes adatok: Gyalai-Korpos és mtsi., 2008).

5.1.3.2 Cukorcirok bagasz előkezelése gőzrobbantással

(13. cikk)

Gőzrobbantásos előkezeléseinket a svédországi Lundi Egyetem Kémiai Központjában hajtottuk végre. A cukornád bagasz előkezeléséről talált irodalmi adatok alapján (Sendelius, 2005) előzetes SO₂-os impregnálás után 180, 190 és 200°C-on, 5 és 10 perces reakcióidőkkel végeztük a *Berény* cukorcirok bagasz előkezelését. A mosott rostfrakció összetétele a 24. táblázatban, a folyadékfázis összetétele a 25. táblázatban található.

24. táblázat Kezeletlen és előkezelt cukorcirok bagasz mosott rostfrakciójának összetétele

Előkezelési körülmények		Szénhidrát tartalom [%]			Lignin [%]
T [°C]	Idő [perc]	Glükán	Xilán	Arabinán	
Kezeletlen		36,3	25,6	2,04	18,6
180	10	50,7	20,6	2,11	22,9
190	5	51,7	18,2/	2,12	22,5
190	10	58,3	12,8	2,07	24,6
200	5	55,7	13,2	1,93	25,2

A savkatalízissal végzett előkezelés hatására a minták hemicellulóz tartalma hidrolízis és bomlás következtében jelentősen csökkent, s ennek megfelelően az egyéb komponensek (cellulóz, lignin) koncentrációja nőtt. A főbb komponensek visszanyerése a 16. ábrán látható.

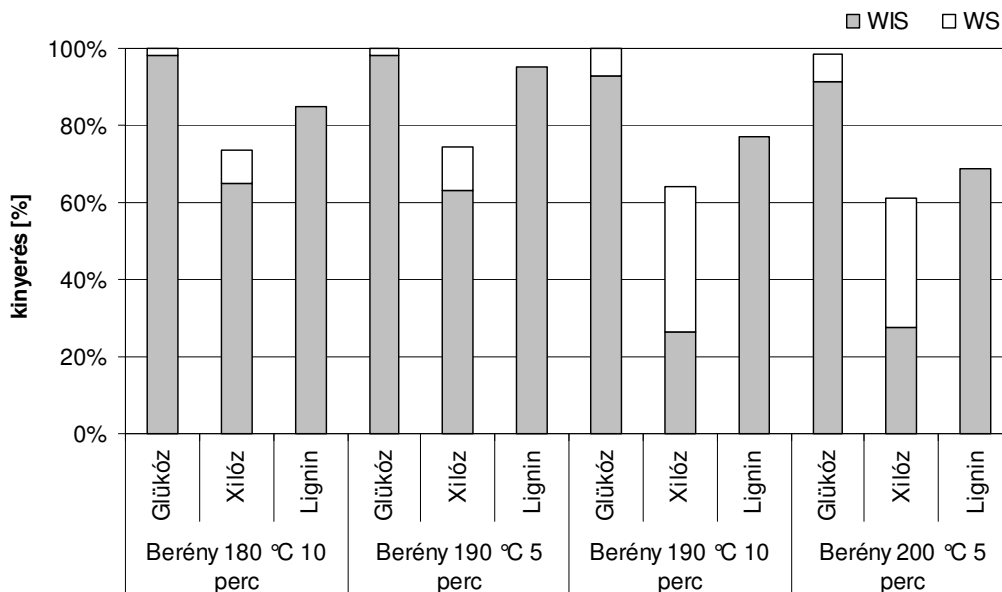
25. táblázat Előkezelt cukorcirok bagasz folyadékfrakciójának szénhidrát összetétele és inhibitor tartalma

Előkezelési körülmények		Koncentráció [g/l]						
T [°C]	t [perc]	Glükán	Xilán	Arabinán	Ecetsav	HMF	Furfurol	Hangyasav
180	10	13,0	20,6	3,03	1,66	0,12	0,23	3,30
190	5	16,6	33,2	4,76	2,76	0,18	0,41	1,16
190	10	14,8	36,4	4,67	4,95	0,36	1,00	3,56
200	5	18,0	44,1	5,53	5,39	0,39	0,86	4,51

A glükán ill. xilán koncentrációk az előkezelési felülűszökből meghatározott monomer és oligomer cukrok összegét jelentik, 180°C-on főként oligomer található, 200°C-on a monomerek és oligomerek aránya 1:1.

A folyadékfrakcióban a potenciális inhibitorok közül az ecetsav, HMF, furfurol és hangyasav koncentrációját határoztuk meg. A HMF és furfurol koncentrációja az enzim hidrolízist és az etanolfermentációt gátló koncentráció alatti (Palmqvist és Hahn-Hägerdahl, 2000b). A

hangyasav a furfurol és HMF bomlásából keletkezik (Ramos, 2003), az ecetsav az erőteljesebb előkezelések alatt nagyobb mennyiségben keletkezik a hemicellulóz acetil csoportjainak a lehasadásából. Az ecetsav bizonyos esetekben stimulál, de savas pH tartományban, különösen furfurollal együtt, erőteljesen gátló hatású is lehet fonalgombák fermentációjában (Szengyel és Zacchi, 2000).

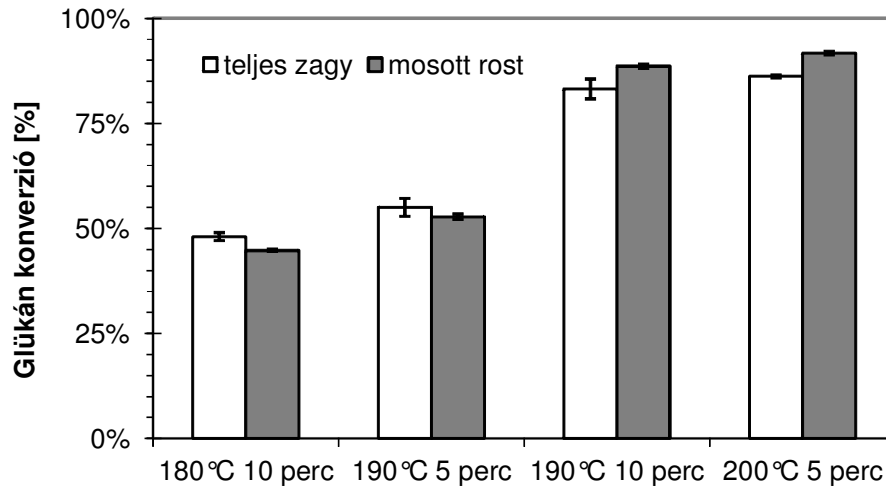


16. ábra Vízoldhatatlan (WIS) és vízoldható (WS) komponensek megoszlása cukorcirok bagasz előkezelt mintáiban

A glükán visszanyerés mind a négy előkezelésnél közel 100%-os volt (16. ábra), az erőteljesebb előkezelések hatására a glükán kb. 8%-a hidrolizált, s így a folyadékfázisba került. A xilán a két legerőteljesebb előkezelés során 35-40%-ban a folyadék fázisba került és emellett jelentős volt a xilán bomlásából eredő veszteség is (~40%).

Az előkezelések közül a 200°C 5 perc és a 190°C 10 perces kezelés eredményezte a legjobban hidrolizálható bagaszt, amikor is 89-92%-os glükán konverziót értünk el (17. ábra), miközben az előkezelés nélküli bagasz enzim hidrolizálhatósága nem érte el a 20%-ot.

Az inhibitorokat is tartalmazó pentóz frakció elválasztásával a rostfrakció enzimes bonthatósága mintegy 7%-kal emelkedett a teljes zagy hidrolízisével elért értékhez képest. Az enyhébb körülmények között végrehajtott előkezeléseknél nem tapasztaltunk ilyen hatást.



17. ábra A folyadékfrakció elválasztásának hatása a hidrolízis hatékonyságára (2% sz.a. szubsztrát, 48 óra hidrolízis idő)

A cukorcirok bagasz kémiai előkezelésének konverziós eredményei alapján feltétlenül érdemes lenne a kukoricaszárnál ajánlott kétlépcsős előkezelés alkalmazása, mely lehetővé tenné a főként xilózt tartalmazó híg savas előkezelési felülúlszó szeparált hasznosítását. A Monori édes cukorcirok lével és bagasszal végzett erjesztési kísérleteink szerint a hektáronkénti etanolhozamot, mely 3500-3700 l/ha a bagasz felhasználásával meg lehetne duplázni. Miután az enzimes bonthatóságot kiválóan javító gőzrobbantásnál a xilán veszteség jelentős, célszerű lenne híg savas hidrolízissel kioldani és külön hasznosítani azt a gőzrobbantás előtt.

5.1.4 Kender és kenderpozdorja előkezelése

A kender bioüzemanyagkénti felhasználásának vizsgálatával egy „Jedlik” pályázat (NKFP 3/006/2005) keretében csoportunk kezdett először foglalkozni Európában, majd miután a rendelkezésünkre álló eszközök nem bizonyultak elegendőnek, kísérleteinket Svédországban a Lundi Egyetemen és egy TÉT pályázat (ESP-7/2006) keretében Spanyolországban a CIEMAT kutatóintézetben folytattuk. Munkánk során, mind az energetikai céllal termesztett teljes növényt (kórót), mind a cellulóz rost mechanikai elválasztása után visszamaradó fás maradékot, a pozdorját vizsgáltuk. A növényben a rost: pozdorja arány 30% : 70%. A kender és a kenderpozdorja kémiai összetétele eltérő, a kenderkóró 44-49% cellulózt, 15-19% hemicellulózt és 14-17% lignint, míg a kender pozdorja 41% cellulózt, 19% hemicellulózt és 21% lignint tartalmaz átlagosan.

5.1.4.1 Kender és kenderpozdorja előkezelése kémiai módszerekkel (14. cikk)

A kender és kenderpozdorja híg savas előkezelése sem a nyersanyag összetételben nem eredményezett változást, sem az enzimes bonthatóságot nem javította számottevően. Lúgos előkezelés körülményeit alkohol fermentáció céljából optimalizáltuk egy részfaktoros 2^{4-1} kísérleti terv segítségével, ahol négy faktor hatását vizsgáltuk. A kenderkóró legerőteljesebb körülmények között (2% NaOH, 150°C, 2 óra) végrehajtott előkezelésével 62%-os etanol hozamot értünk el az előkezelte minta glükán tartalmára vonatkoztatva. Miután az előkezelés veszteségei jelentősek voltak, a lúgos kezelést sem tekintettük alkalmasnak a kender feltárására.

5.1.4.2 Kender és kender szilázs előkezelése gőzrobbantással

(15. cikk)

Miután nincs mindig lehetőség arra, hogy a koraősszel betakarított kender a földeken megszáradjon, esetenként szükség lehet, főként Európa északi részén, a kender silózással történő tartósítására. Munkánk során száraz kenderkóró és kender szilázs bioetanol előállítás céljából történő gőzrobbantásos előkezelését optimalizáltuk.

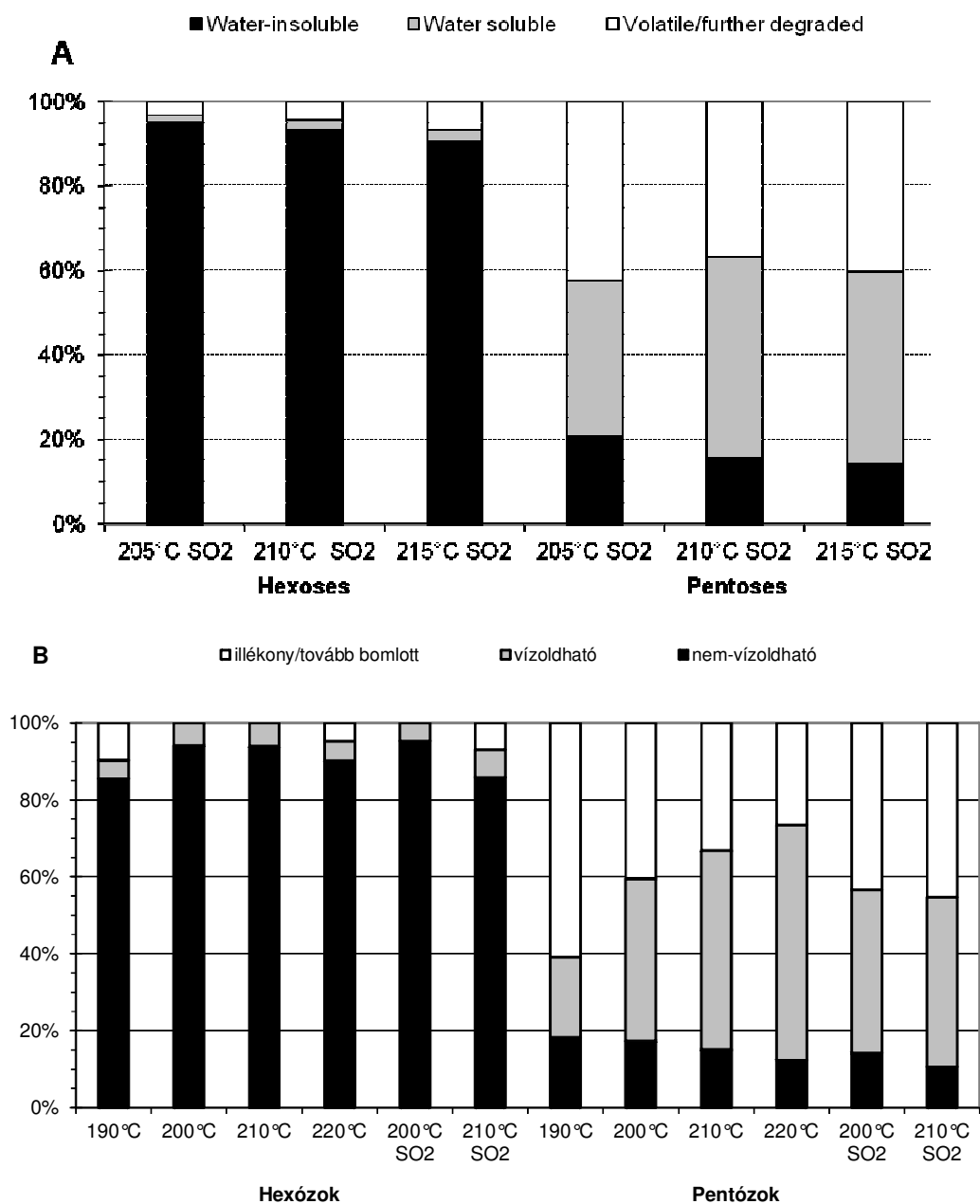
A kenderkóró előkezelését korábbi tapasztalataink alapján 2% kéndioxidos előimpregnálást követően 205, 210 és 215°C-on hajtottuk végre 5 perces reakcióidővel. Kender szilázs esetében azt feltételeztük, hogy a silózás során keletkező szerves savak (tejsav, ecetsav) katalízise elegendő lesz a hatásos előkezeléshez, így kéndioxidos impregnálás nélkül széles hőmérséklet tartományban (190, 200, 210 és 220°C-on) hajtottuk végre az 5 perces kezeléseket. Csak miután ezek az előkezelések nem bizonyultak elég hatékonyak, alkalmaztuk kender szilázs esetében is a kéndioxidos előimpregnálást. Az előkezeléssel nyert mosott szilárd frakció glükán és xilán tartalmát és a kihozatalokat tartalmazza a 26. táblázat.

26. táblázat Glükán és xilán kihozatal az előkezelt kender szilárd frakciójában

Előkezelési körülmények			Glükán [%]	Xilán [%]	Lignin [%]
	T [°C]	SO ₂			
Kender		-	43,6 (100%)	10,5 (100%)	14,9
Kender szilázs		-	45,2 (100%)	10,1 (100%)	18,7
Előkezelt kender	205°C	+	66,8 (95,2%)	3,8 (20,5%)	19,3
	210°C	+	66,8 (93,4%)	3,0 (15,6%)	21,2
	215°C	+	64,7 (90,5%)	2,7 (14,2%)	25,9
Előkezelt szilázs	190°C	-	57,9 (85,5%)	8,4 (18,2%)	19,4
	200°C	-	62,4 (94,2%)	7,5 (17,3%)	19,1
	210°C	-	67,1 (96,7%)	1,3 (15,0%)	23,4
	220°C	-	60,7 (90,1%)	0,6 (12,3%)	26,0
	200°C	+	68,7 (96,3%)	1,3 (14,2%)	21,0
	210°C	+	66,0 (85,8%)	0,4 (10,6%)	24,7

Az előkezelések hatására a glükántartalom az eredeti 44-45%-ról 58-68%-ra növekedett az előkezelt SPH és SPHS mintákban. A lignintartalom a jelentős hemicellulóz kioldódás következtében 42-27%-kal nőtt, az eredeti 10,5% pentozán tartalom a legintenzívebb kezelések hatására 0,4-0,6%-ra csökkent. Egyidejűleg jelentős szénhidrát mennyiség került a folyadék frakcióba, illetve bomlott tovább (18. ábra).

Míg a glükánnak csak néhány százaléka távozott a szilárd frakcióból (kender esetében maximum 10%), a xilán 40-45%-a a folyadékfázisba jutott és 38-42%-nak adódott a veszteség. Kender szilázsnál ugyanaz az előkezelés erélyesebb hatást váltott ki (több anyag oldódott ki, illetve bomlott el).



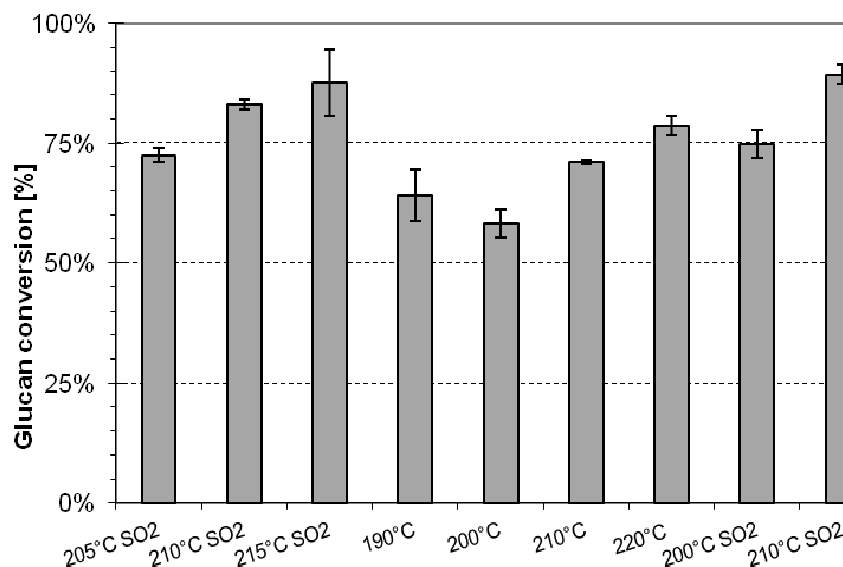
18. ábra Hexóz és pentóz cukrok visszanyerése gőzrobbantás után kender (A) és kender szilázs (B) nyersanyagokból az elméleti értékek százalékában

A későbbi felhasználás szempontjából lényeges a folyadékfázis összetétele (27. táblázat).

27. táblázat Cukrok és szerves savak a kender előkezelésének folyadék frakciójában (g/l)

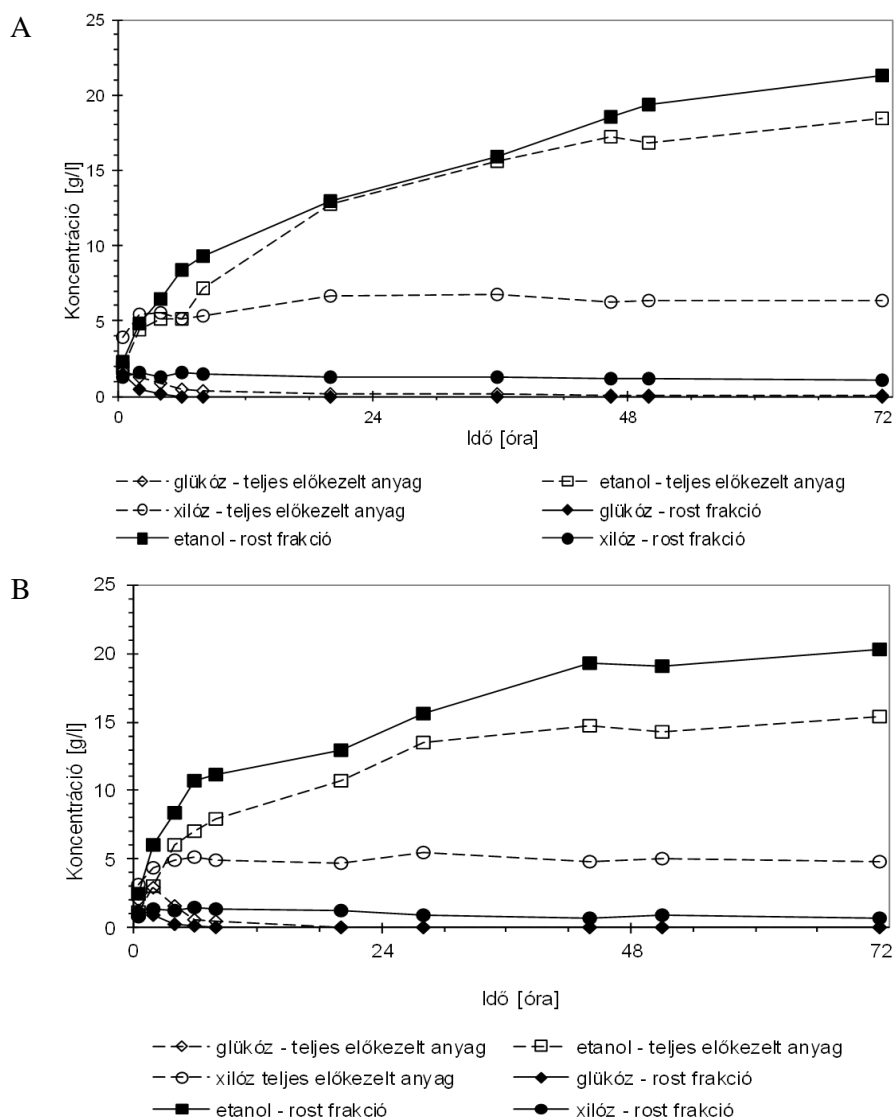
Előkezelési körülmények		Glükóz		Xilóz		Tejsav	Ecetsav
T [°C]	SO ₂	monomer	össz.	monomer	össz.		
Előkezelt kender							
205 °C	+	0,03	1,21	0,53	6,95	0,21	1,27
210 °C	+	0,13	1,49	1,32	7,06	0,31	1,93
215 °C	+	0,31	1,64	2,10	5,95	0,57	3,15
Előkezelt kenderszilázs							
190 °C	-	0,02	0,56	0,02	1,99	17,60	7,60
200 °C	-	0,01	0,86	0,06	4,93	4,86	2,20
210 °C	-	0,01	0,95	0,16	6,13	5,90	3,21
220 °C	-	0,02	0,94	0,26	8,77	6,10	4,02
200 °C	+	0,02	0,86	0,39	5,74	5,47	5,00
210 °C	+	0,06	1,07	1,05	4,39	6,85	3,88
monomer	monomer formában						
össz.	monomer és oligomer formában (híg savas hidrolízis után mérve)						

Az elválasztott folyadékfázisban mind kender, mind kender szilázs esetében a xilooligomerek domináltak, a furfurol, és a hidroximetil-furfurol (HMF) koncentrációja nem érte el a gátló koncentrációt (Palmquist és Hahn-Hägerdal, 2000b). A szerves savak koncentrációja szilázs nyersanyag esetében jelentősen meghaladta a kendernél mért értékeket, ecetsav esetében a mért 4,02 g/l kétszeresét, tejsav esetében a kendernél meghatározott 6,1 g/l húszszorosát találtuk. A 19. ábra SPH (első három oszlop) és SPHS enzimes hidrolízisekor elért glükán konverziókat mutatja be a különböző előkezelések után.



19. ábra Glükán konverziók előkezelt kender (SPH) /első három oszlop/ és kender szilázs (SPHS) enzimes hidrolízisekor (2% szubsztrát, 96 óra)

Az előkezelés után meghatározott enzim bonthatóság a leghatékonyabb előkezelés után (210°C, 5 perc, 2% kéndioxid előimpregnálás) kenderkóró esetében 83,1%, a kender szilázs esetében 7,5%-kal nagyobb, 89,3% volt. A kiindulási anyag 100 g-jára vonatkoztatott glükóz hozam viszont mindkét anyagnál azonos (37 g glükóz/100 g kiindulási minta). Az optimális körülmények között előkezelt anyagok bioetanol potenciálját szimultán cukrosítással és erjesztéssel teszteltük (20. ábra). Kísérleteink során azt is vizsgáltuk, hogy az előkezelt zagy szétválasztása szilárd és folyadék fázisra, hogyan befolyásolja az etanol hozamot. Ez a technológiai lépés kedvező lenne a biofinomító koncepció bevezetésére, mivel a folyadékfázis többnyire olyan alacsony polimerizációs fokú xilooligomereket tartalmaz, melyek az etanol előállítás szempontjából érdektelenek.



20. ábra Glükóz-, xilóz-, és etanol koncentrációk gőzrobbantott (210°C, 5 perc, 2% kéndioxid előimpregnálás) kender (A) és kenderszilázs (B) egyidejű cukrosítása és fermentációja (SSF) során

Az előkezelt zagy szétválasztása javította az erjesztés hatékonyságát, különösen a gőzrobbantott kendersizilázs esetében (33%-kal), mely a nagy koncentrációban jelenlevő gyenge savak elválasztásának köszönhető. Ez jó egyezést mutat Palmqvist és Hahn-Hägerdal (2000b) eredményeivel, akik kimutatták a gyenge savak gátló hatását. Az elválasztott szilárd frakcióval végzett kísérletekben kendernél 21,3 g/l, kendersizilázsánál 20,3 g/l etanol koncentrációt és 17,1 g/100 g kenderkóró és 16,3 g/100 g kendersizilázs etanol hozamokat értünk el, melyek 190-220 l/t etanol hozamnak felelnek meg.

A mezőgazdasági melléktermékeknek (kukoricaszár, kukoricarost) sikeresen alkalmazott kémiai kezelések nem voltak eredményesek, valószínűleg a kender zártabb szerkezete következtében. Megfelelő előkezelést csak gőzrobbantással értünk el. Az előkezelések során fellépő anyagvesztéseket és az előkezelésekkel nyert anyagok enzimes bonthatóságát figyelembe véve mindkét nyersanyagnál a 2% kéndioxid előimpregnálást követő 210°C-on 5 perc tartózkodási idő mellett végzett előkezelést találtuk a legalkalmasabbnak. Kenderkóró előkezelésekor a glükánfrakció 93,4%-a, a xilán frakció 15,6%-a maradt a szilárd frakcióban, kendersizilázs előkezelésekor ezek az értékek: 85,8 és 10,6%. Az enzimes hidrolízisben 83,1 ill. 89,3%-os glükán konverziót értünk el, mely mind a SPH, mind a SPHS esetében 37 g glükózt jelent 100 g kiindulási nyersanyagra vonatkoztatva, az elért etanolhozamok: 17,1 g/100 g kenderkóró és 16,3 g/100 g kendersizilázs. A kiindulási kenderre és kendersizilázsra vonatkoztatva az elméletileg maximális etanolhozamnak 70, illetve 64%-át értük el.

5.1.4.3 Kenderpozdorja előkezelése gőzrobbantással

(16. cikk)

A kenderpozdorját úgy használtuk fel, ahogy a technológia során keletkezik (1-2 cm hosszú, kb. 0,5 cm széles és 0,3 m vastag apríték). Az előkezeléseket 200 és 230°C közötti hőmérsékleteken végeztük, katalizátor nélkül, két különböző reaktorban, a reakcióidő minden esetben 10 perc volt. Az előkezelések során nyert mosott szilárd frakciók összetételét a 28. táblázat tartalmazza.

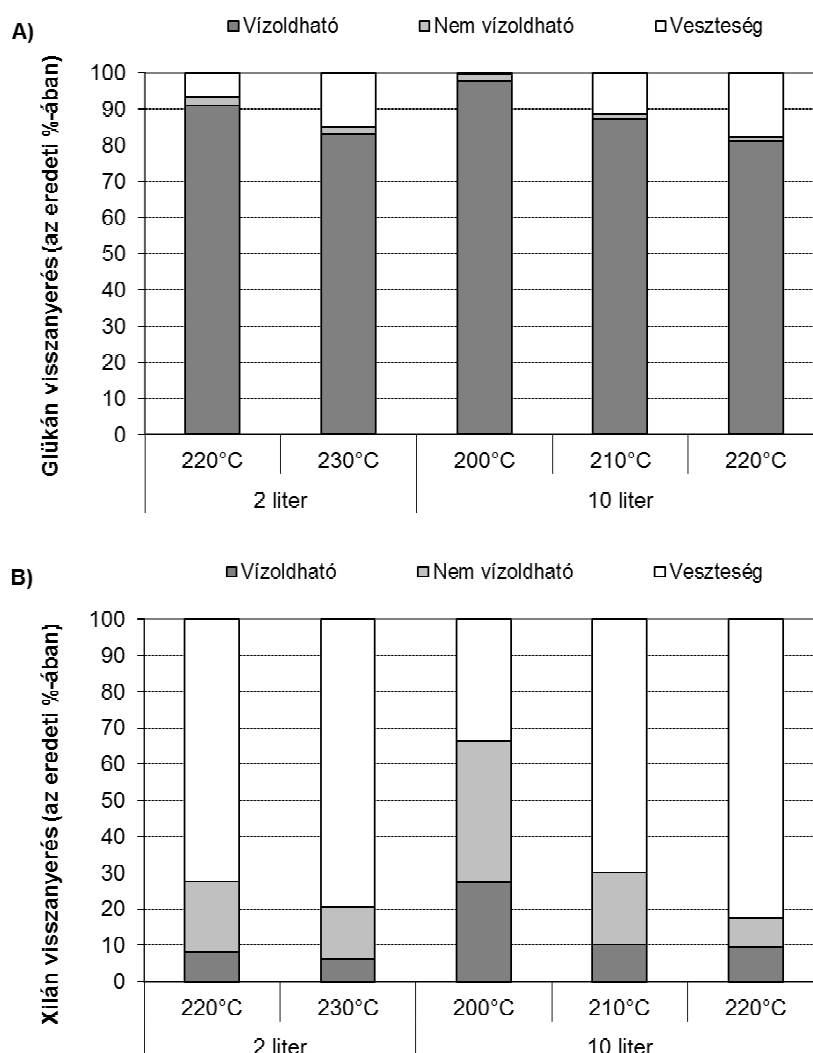
28. táblázat Kezeletlen és előkezelt kenderpozdorja mosott rost frakció összetétele (a sz.a. %-ában)

Előkezelési körülmények			Glükán	Mannán	Xilán	Lignin
	V _{reaktor} [l]	T [°C]				
kezeletlen	-	-	40,1	0,9	18,4	21,7
előkezelt	2 l	220 °C	62,8	0,0	2,6	36,2
		230 °C	60,3	0,0	2,1	38,8
előkezelt	10 l	200 °C	57,4	0,7	6,9	34,7
		210 °C	57,5	0,0	2,9	37,9
		220 °C	58,6	0,0	3,1	40,9

Az eredeti 40%-os glükán tartalom a mosott rostban 58-63%-ra emelkedett az előkezelések hatására a hemicellulóz frakció jelentős kioldódása és bomlása következtében, egyidejűleg a lignintartalom is 60-88%-kal növekedett.

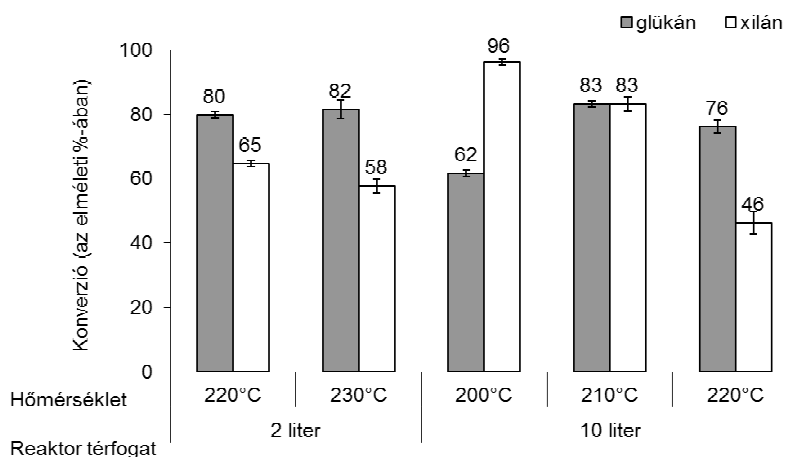
Az előkezelések során nyert frakciók megoszlását a szilárd és folyadékfrakciók között, valamint az előkezelések során fellépő veszteségeket a 21. ábra mutatja be. A 2 és 10 literes

reaktorok eltérően viselkedtek (az alkalmazott hőmérsékleteket korábbi, más nyersanyagokkal szerzett tapasztalataink alapján választottuk).



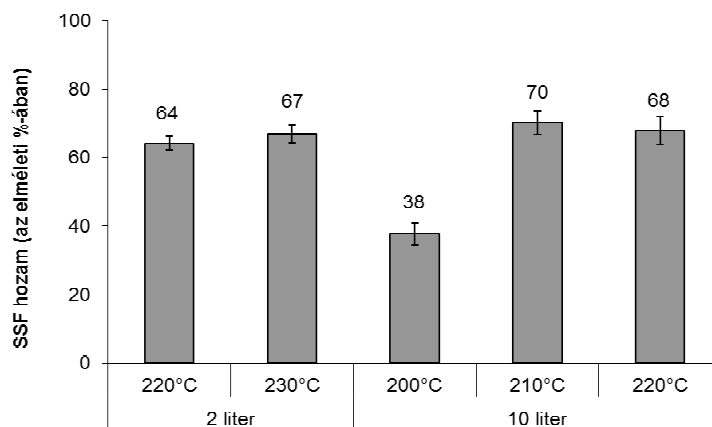
21. ábra Glükán (A) és xilán (B) visszanyerés kenderpozdorja gőzrobbantásos előkezelése után a reaktortérfogat és előkezelési hőmérséklet függvényében

A glükánvisszanyerés 82-99% közötti volt, s a hiányzó mennyiség többnyire nem volt visszamérhető a folyadékfázisból sem. A xilánfrakciónak mindössze 6-25%-a maradt a szilárd fázisban, a folyadék fázisban található 8-40% többnyire oligomerek formájában volt meghatározható. A legenyhébb körülmények között 200°C-on lefolytatott előkezelés mindössze 5% glükán- és 35% xilán veszteséget eredményezett, de az itt nyert előkezelt anyag csak gyenge enzimes bonthatósággal rendelkezett (22. ábra). A legjobb enzimes bonthatóságot eredményező előkezelés (210°C, 10 literes reaktor) esetén a glükán 87%-a, a xilán 10%-a maradt a szilárd frakcióban, s a glükánvesztesség 11%, a xilánvesztesség 70% volt. Az előkezelt minták enzimes bonthatóságának (5% WIS, 15 FPU/g sz.a., 15 IU BGL/g sz.a., pH 5,0, 50°C) 72 órás konverzió értékeit a 22. ábra mutatja be.



22. ábra Glükán és xilán konverziók előkezelt kenderpozdorja enzimes hidrolízise során az előkezelési reaktortérfogat és hőmérséklet függvényében

A 210°C-on előkezelt kenderpozdorjával tapasztaltuk a maximális a glükánbonthatóságot (83%), s ezen a hőmérsékleten xilán esetében is jó hidrolizálhatóságot értünk el. Az SSF kísérleteket 10% WIS koncentrációval, 25 FPU + 25 IU BGL/g sz.a. enzimadagolással, 4% (V/w) *S. cerevisiae* inokulummal, 32°C-on 72 óráig folytattuk. Az etanolkoncentrációt GC-val határoztuk meg, eredményeinket a 23. ábra mutatja be.



23. ábra Etanol hozamok SSF kísérletekben az előkezelt kenderpozdorja glükán és mannán tartalma alapján az előkezelési körülmények függvényében

A SPH, SPHS és SPHH gőzrobbantásos előkezelésének összehasonlításakor (210°C) megállapítottuk, hogy a SPHH előkezeléseknél jelentősen nagyobb volt a hemicellulóz frakció bomlása, valószínűleg a nagyobb hőterhelés hatására (magnövelt reakcióidő, katalizátor nélkül). Ennél a nyersanyagnál mindenképpen tovább kell folytatni a kísérleteket, célszerűen kétlépcsős gőzrobbantásos előkezelések irányába. Ekkor enyhébb körülmények között kinyerjük a hemicellulóz frakciót, majd a maradékot erélyesebb körülmények közt kezelve tesszük az enzimes konverzióra alkalmassá.

5.1.5 Egyéb lignocellulózok előkezelése

5.1.5.1 Balatoni nád előkezelése

(17. cikk)

Miután kísérleteink során kémiai kezelésekkal nem sikerült megfelelő bonthatóságot elérnünk, az előkezeléseket nedves oxidációval is végrehajtottuk. Lúgos katalízis mellett (2 g $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{l}$, 60 g sz.a. 1 l vízben, 12 perc) négy különböző hőfokon (185, 190, 195 és 200°C) végzett előkezelések összetételre vonatkozó eredményeit foglalja össze a 29. táblázat.

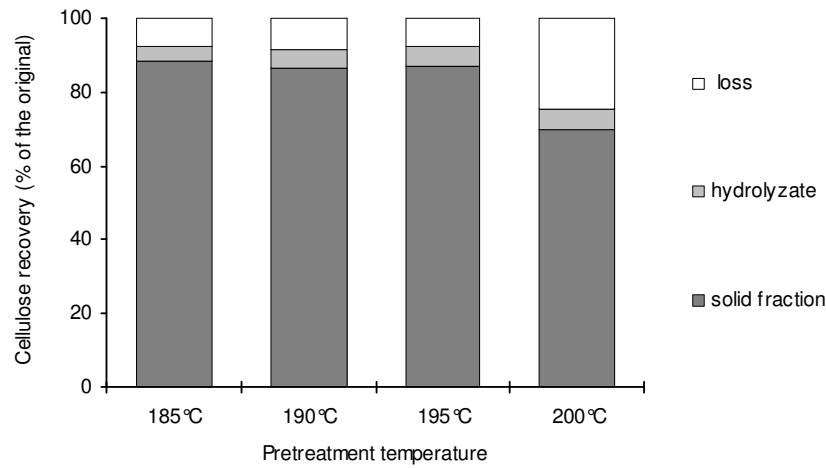
29. táblázat Nedves oxidációval előkezelt nád elválasztott szilárd frakciójának összetétele (g/100 g nyersanyag sz.a.)

Előkezelési hőmérséklet [°C]	DM	Glükán	Xilán	Arabinán	Lignin	Hamu
kezeletlen nád	100	32,82	17,38	2,53	24,85	2,08
előkezelt nád 185 °C	63,73	28,97	10,46	0,75	12,98	2,16
190 °C	61,66	28,38	8,37	0,49	12,19	1,94
195 °C	58,07	28,59	7,35	0,00	10,35	1,93
200 °C	54,12	22,97	3,31	0,00	11,16	1,97

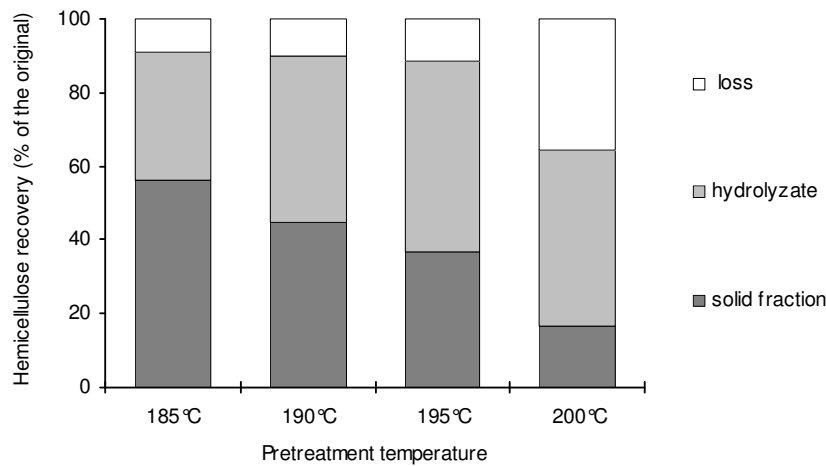
Az előkezelés hatására a szárazanyag 54-63%-a maradt a rostfrakcióban, a legerőteljesebb kezelés hatására a glükánfrakció 30%-a, a hemicellulózfrakció (xilán+arabinán) 83%-a, a ligninfrakció 55%-a ment oldatba, vagy bomlott el. A 24. ábra a cellulóz, valamint a hemicellulóz (xilán+arabinán) visszanyerést, és a veszteségeket mutatja be az előkezelési hőmérséklet függvényében.

Míg a 185, 190 és 195°C-on végrehajtott kezeléseknél a glükánfrakció 89%-a marad a szilárd frakcióban, s 10% alatti a veszteség, a 200°C-on végrehajtott előkezelés hatásaként 30% a glükánveszteség. A veszteségek a hemicellulóz frakciónál is hasonlóak, de itt az oldatba ment részarány 30-50%. A 200°C-on végrehajtott kezelésnél az eredeti hemicellulóz < 20%-a maradt a szilárd frakcióban. A különböző hőfokokon előkezelt minták enzimikus hidrolízisének (S 2% w/w, pH 4,8, 50°C, 25 FPU/g sz.a. + 25 IU BGL/g sz.a., 48 óra) eredményei a 25. ábrán láthatók.

(A)



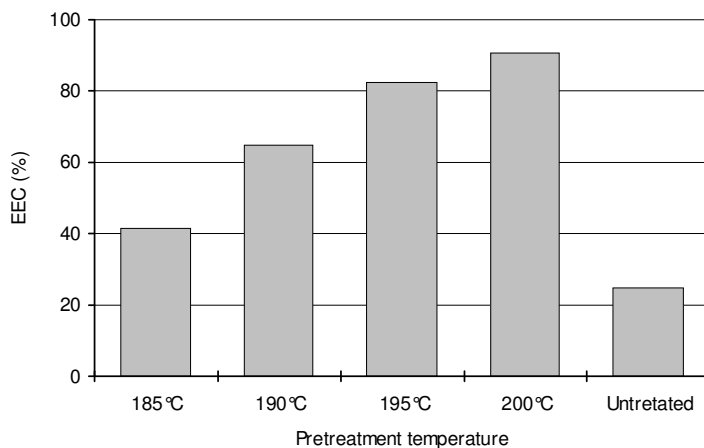
(B)



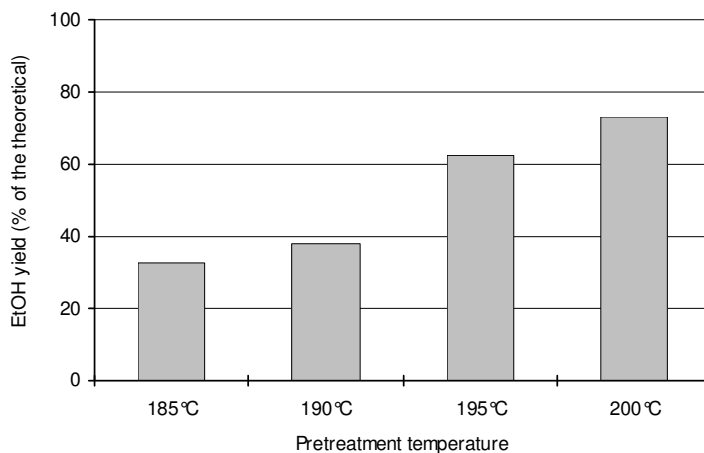
24. ábra Cellulóz (A) és hemicellulóz (B) visszanyerés előkezelt nád nedves oxidációs előkezelése (12 bar, 12 perc) során különböző hőmérsékleteken

Az előkezelési hőmérséklet növelésével az enzimes hidrolizálhatóság monoton emelkedett, a 200°C-os előkezelésnél 3,7-szerese volt a kezeletlen nádnál elért értéknek. Az SSF kísérleteket (5% (w/V), pH 4,8, 32°C, 25 FPU/g sz.a. + 25 IU BGL/g sz.a., *S. cerevisiae* 2 g/l, 72 óra) a csoportunkban kifejlesztett, CO₂ mérésen alapuló „köttyogó” berendezésben hajtottuk végre (5.4.2.1 fejezet).

dc_22_10



25. ábra Nedves oxidációval (12 bar, 12 perc) előkezelt nád enzimes bonthatósága az elméletileg átkonvertálható cellulóz %-ában az előkezelési hőmérséklet függvényében



26. ábra SSF etanol hozamok nedves oxidációval (12 bar, 12 perc) előkezelt nád szubsztráton az előkezelési hőmérséklet függvényében az elméleti hozam %-ában

Az etanol hozamok (26. ábra) az enzimes bonthatósághoz hasonlóan az előkezelési hőmérséklettel növekedtek, az elméleti maximális hozam (előkezelt minta glükán tartalmára vonatkoztatva) 32,5%-áról 73,2%-ára. A vizsgált körülmények közül a 200°C-os előkezelés eredményezte a legjobb etanol hozamot. A gondot az okozza, hogy ezen az előkezelési hőmérsékleten a cellulóz veszteség 30%, a hemicellulózveszteség pedig csaknem 40% volt. Miután a nád előkezelésénél mind a cellulóz, mind a hemicellulóz frakció hasonlóan viselkedett a hőfokemelés hatására (200°C-on erőteljes bomlás), a továbbiakban az előkezelési körülmények „finomhangolása” szükséges.

5.1.5.2 *Energiafű előkezelése*

(18. cikk)

Kísérleteinkhez az utóbbi évtizedben direkt égetésre nemesített szarvasi energiafűvet használtunk. A felállított háromfaktoros, kétszintes kísérleti terv alapján elvégzett előkezeléseket három szempont szerint értékeltük: összetétel, enzimes bonthatóság, erjeszthetőség. 135°C-on, 2% H₂SO₄ felhasználásával 60 perces reakcióidővel nyertük a komponensek legjobb elválasztását, 120 perces reakció idő után pedig a rostfrakció legjobb enzimes bonthatóságát (60%), ez utóbbi körülmények között a cellulóz 93%-a maradt a rostban, miközben a hemicellulóz frakció mintegy 90-95%-a a folyadékfázisba jutott (részletes eredmények: Soós és mtsi., 2004).

A hidrolizátumok fermentációs tesztje valamennyi kísérleti pontnál meghaladta a 90%-ot, s miután a hemicellulózt szinte teljesen eltávolítottuk a mintából, ígéretes a módszer a szénhidrátpolimerek szétválasztására. A jobb cellulóz konverzió érdekében a kukoricaszárnál javasolthoz hasonlóan egy második előkezelési lépést célszerű alkalmazni.

5.2 *Enzim fermentáció*

A celluláz enzim előállítására leggyakrabban használt törzs a *Trichoderma reesei* Rut C30, melyet hosszú törzsnemesítési munkával állítottak elő. Napjainkig is az egyik legjobb, mindenki számára hozzáférhető celluláz termelő. Ennek a felhasználásával végeztük szénforrás kísérleteinket, valamint a pH szabályzással, enzimlokalizációval, enzim inhibícióval kapcsolatos munkákat. Néhány speciális feladathoz rekombináns *Trichoderma* (T. *reesei* RF6026, T. *reesei* QM9414 mutánsai) szaporításával állítottunk elő enzimet. Miután a *Trichoderma reesei* fermentlevek általában nem rendelkeznek a hatékony hidrolízishez elegendő BGL aktivitással, azt külön forrásból kell biztosítani. Külön fejezetet szentelek a BGL fermentációnak, s ehhez kapcsolódva az enzim tisztításának és rögzítésének.

5.2.1 *Szénforráskísérletek Trichoderma reesei Rut C30 gombatörzsszel*

Szénforrásként elsősorban azokat a nyersanyagokat vizsgáltuk, melyek korábban, mint az enzimes hidrolízis szubsztrátjai már bizonyították, hogy alkalmasak második generációs etanoltermelés nyersanyagának. Ennek oka, hogy amennyiben a helyben történő („on site”) enzimtermelés megoldható, a jobb enzimes konverzió érdekében célszerű azonos nyersanyagot (szénforrást, illetve szubsztrátot) alkalmazni az enzim fermentációnál és az enzimes hidrolízisnél (Olsson és mtsi., 2003). Miután Európában a svédországi Lundi Egyetem Kémiai Központjában folyik a második generációs etanol előállítás legintenzívebb kutatása, kísérleteink jelentős részében az általuk gőzrobbantással előkezelt fűzfa és lucfenyő nyersanyagokat használtuk. Izgalmas kérdés az egyes technológiákban keletkező mellékáramok, az előkezelések során keletkező hemicellulóz frakciók (HH, F, CF), valamint a hulladékok, a hulladékpapír, vagy a papíriszap alkalmazása.

5.2.1.1 *Celluláz fermentáció különböző lignintartalmú gőzrobbantott fűzfa szénforrásokon*

(19. cikk)

A fűzfa előkezelésének optimalizálását, enzimes hidrolízisben és erjesztésben való felhasználását már korábban mélyrehatóan vizsgálták (Eklund és mtsi., 1995), celluláz fermentációs kísérleteinkben az általuk optimalizált körülmények között előállított SPW-t használtuk fel. Ellentmondóak a vélemények arról, hogy a fermentációs szénforrás lignintartalma mennyire befolyásolja a celluláztermelést, ennek eldöntésére három, különböző

lignintartalmú, de azonos eredetű szénforrást használtunk rázatott lombikban, valamint 4 és 22 literes bioreaktorokban végzett fermentációs kísérleteinkben. Kontrollként 57,7% cellulóz és 40,6% lignin tartalmú gőzrobbantott fűzfa szénforrást (SPW) alkalmaztunk. Ebből a szubsztrátból H₂O₂-os kezeléssel állítottunk elő kis (27,5 és 13,5%), illetve enzimes hidrolízissel nagy lignintartalmú szénforrást (71,3 és 79%) (30. táblázat).

30. táblázat Az alkalmazott SPW eredetű szénforrások szénhidrát és lignin tartalma

Szénforrás	Szénhidrát tartalom [% , w/w]	Lignintartalom [% , w/w]
Gőzrobbantott fűzfa (SPW)	57,7	40,6
SPW-D 4%	68,3	27,5
SPW-D 50%	83,4	13,5
SPW-H 24 óra	20,6	71,3
SPW-H 48 óra	10,8	79,0
SPW-D 4%, H 48 óra	15,3	72,3

A rázatott lombikos fermentáció 7. napján meghatározott FPA értékeket és a számított hozamokat a 31. táblázat tartalmazza.

31. táblázat Különböző lignintartalmú szénforrások koncentrációja, cellulóz és lignintartalma, valamint az elért FPA aktivitások és hozamok (7 nap)

Szénforrás Jelölés	Konc. [g/l]	Cellulóz [g/l]	Lignin [g/l]	Termelt cellulóz a 7. napon	
				Aktivitás [FPA/ml]	Hozam [FPA/g cellulóz]
SPW	15	8,7	6,9	0,61	70
SPW-D 4%	15	10,2	4,1	0,63	61
SPW-H 48 óra	15	1,6	11,9	0,18	110
SPW-D 4%, H 48 óra	15	2,3	10,8	0,19	81
SPW-H 48 óra	45	4,9	35,6	0,25	51
SPW-D 4%, H 48 óra	45	6,9	32,5	0,30	43
SPW	17,3	10	7,0	0,62	62
SPW-D 4%	14,7	10	4,0	0,56	56
SPW-D 50%	12	10	1,6	0,57	57
SPW-H 24 óra	48,5	10	34,6	0,66	66

Valamennyi általunk előállított és alkalmazott szénforrás alkalmasnak bizonyult *Trichoderma reesei* Rut C30 fermentáció szénforrásául. Megállapítottuk, hogy (i) a vizsgált anyagok a cellulóz és lignintartalomtól függetlenül alkalmasak az enzimtermelés indukálására, (ii) a legnagyobb térfogati aktivitások a legnagyobb cellulóztartalmú szubsztrátokkal érhetők el,

viszont (iii) a kis cellulóztartalmú szénforrások biztosították a maximális hozamokat. Azonos cellulóztartalom mellett lefolytatott enzimermentációk során a hidrolízis maradékon elért kiváló eredmény magyarázata lehet, hogy a hidrolízis során alkalmazott enzim egy része adszorbeálódott a maradék szubsztráton, így a fermentációs szénforrásként használt szubsztrát telített volt enzimekkel, és kevesebb adszorbeálódott a fermentáció során megtermelt enzimből. Ez az eredményünk jó lehetőséget mutat a hidrolízismaradék szénforráskénti hasznosítására. Hogan és Mes-Hartree (1990), gőzrobbantott nyárfa hidrolízis maradékát alkalmazva értek el ugyancsak jó fermentációs eredményeket.

5.2.1.2 Celluláz fermentáció, mint a gőzrobbantott fűzfa hemicellulóz frakciójának méregtelenítési módszere (20. cikk)

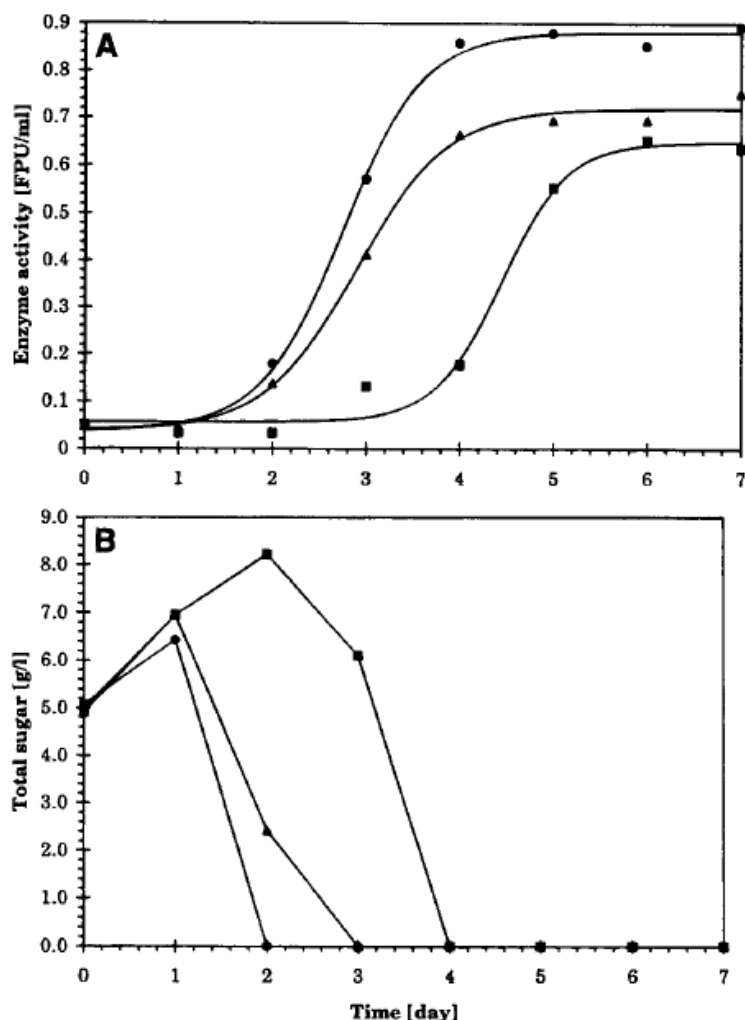
Amikor a fűzfát 205°C-on SO₂ katalízissel gőzrobbantással kezeljük elő, a hemicellulóz frakció csaknem teljes mértékben oldatba megy (Eklund és mtsi., 1994). Az oldatba ment cukrokat az előkezelés során keletkező inhibitorokkal együtt célszerű szűréssel és mosással elválasztani a rost frakciótól, így az inhibitorok (furfurol, HMF, ecetsav, hangyasav) nem okoznak gondot az enzimes hidrolízis és alkohol fermentáció során. Amennyiben nem mossuk ki az inhibitorokat -és velük együtt a pentóz cukrokat-, akkor valamilyen detoxifikációs lépést kell közbeiktatnunk, mely egyrészt anyagveszteséget, másrészt plusz költséget okoz (Tran és Chambers, 1985). Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a vákuumbepárlással besűrített hemicellulóz frakciót (összetétel g/l-ben: 9,3 összecukor, 2,6 ecetsav, 1,0 furfurol, 0,2 HMF) *Trichoderma reesei* Rut C30 fermentációs táptalajául felhasználva hogyan változik az egyes inhibitorok koncentrációja, képes-e a gomba a pentóz cukrok felhasználására, s lesz-e mérhető enzimtermelés csak a pentóz frakción, illetve a gőzrobbantott fűzfa rosttal kiegészített fermentációs táptalajon.

A bepárlás és az azt követő sterilizálás hatására a furfurol és a HMF koncentráció jelentősen lecsökkent, így elsősorban az ecetsav, valamint a lignin degradációs termékek okozhatnak inhibíciót a fermentáció során. Kísérleteinket rázatott lombikokban 9,3 g/l cukrot tartalmazó besűrített pentóz frakción, illetve olyan táptalajon folytattuk, mely a bekoncentrált pentóz frakción kívül 10 g/l cellulózt (SPW) is tartalmazott.

Megállapítottuk, hogy hosszú lag szakasz után képes a *Trichoderma reesei* az ecetsav hasznosítására, a lag szakasz a rost nélküli fermentációknál 120 óra, míg a rostot is tartalmazó kísérleteknél 68 óra volt, ezalatt az ecetsav koncentrációja nullára csökkent. A ligninből származó fenolos inhibitorok koncentrációjában 6 napos fermentáció alatt több mint 30%-os csökkenés következett be (részletes adatok: Palmqvist és mtsi., 1997). Mindkét szénforráson volt mérhető enzimtermelés (FPA).

5.2.1.3 Celluláz termelés hemicellulóz hidrolizátumon (21. cikk)

Az előzőekben méregtelenítésre alkalmazott pentózfrakciót az enzimtermelés szempontjából is vizsgáltuk. A szénforrást (10 g/l szénhidrát) egyrészt besűrített és visszahígított pentóz frakcióval (0,07 g/l cellobióz, 1,48 g/l glükóz, 3,35 g/l xilóz, 0,63 g/l ecetsav 0,13 g/l HMF, a furfurol koncentráció a kimutatási határ alatt), másrészt SPW-ből (5 g/l cellulóz) biztosítottuk. Olyan lényeges kérdésekre kívántunk választ kapni, hogy a fermentációs táptalaj kezdeti pH értéke hogyan befolyásolja a fermentáció lefutását (27. ábra), az ecetsav, illetve a különböző cukrok koncentrációjának alakulását és az enzimtermelést.



27. ábra FPA aktivitás és a cukortartalom alakulása a fermentációs idő függvényében, különböző indulási pH értékeken
(A: FPA, B: cukor; ■: pH 4,8, ▲: pH 5,3, ●: pH 5,8)

A cukorkoncentráció (27. ábra B) mindhárom vizsgált pH értéken kezdetben emelkedett, mutatván, hogy az inokulummal beadagolt celluláz enzimek elkezdtek hidrolizálni a szilárd szénforrást, de a gomba nem volt képes azt metabolizálni. A fermentáció lefutására (27. ábra A) jelentős hatása van a tenyészetek indulási pH-jának, a lag szakasz hossza a pH emelésével csökken, az enzimtermelés akkor indul be, amikor a táptalajból elfogy a vízoldható cukor.

Miután a „fából etanol” technológia során a folyamat gazdaságossága érdekében a cellulóz frakciót az etanol előállítására kell minél nagyobb százalékban felhasználni (Nguyen és Saddler, 1991), érdemes megvizsgálni, hogy az enzimfermentáció szénforrásként alkalmazott SPW helyettesíthető-e besűrített pentóz frakcióval (CF), a hozam romlása nélkül. Kísérleteinkben pH 5,8-on, 10, illetve 20g/l szénforrás koncentrációnál alkalmaztunk 50%-os helyettesítést, amikor a teljes cellulolitikus aktivitásra jellemző szűrőpapír lebontó aktivitás (FPA) mellett meghatároztuk a β -glükoszidáz (BGL) aktivitást is (32. táblázat).

32. táblázat FPA és BGL aktivitás SPW és SPW+CF szénforrást tartalmazó táptalajokon (indulási pH:5,8; 8 napos aktivitás értékek)

Szénforrás		FPA	FPA hozam	BGL
Eredet	Konc. [g/l]	[FPU/ml]	[FPU/g szénhidrát]	[IU/ml]
SPW	10	1,04	104	0,31
SPW+CF (50:50%)	10	1,33	133	0,47
SPW	20	1,58	79	0,44
SPW+CF (50:50%)	20	1,79	86	0,43

Méréseink szerint a tizedére besűrített pentózfrakció (CF) felhasználásával a fermentáció szénforrása (SPW), úgy helyettesíthető 50%-ban CF-tal, hogy a hozam közel 30%-kal nagyobb, mint a csak gőzrobbantott fűzfa szénforrást tartalmazó fermentációban.

Lényegesen változik a helyzet, ha a pentóz frakciót besűrítés nélkül, közvetlenül kívánjuk alkalmazni. Kezdeti negatív eredményeink után egy kísérleti tervben vizsgáltuk a keverés, a pH és az oldható cukorfrakció részarányának függvényében ennek a frakciónak az alkalmazhatóságát (összetételek a 33. táblázatban).

33. táblázat A 20, 50 és 80% oldható frakciót tartalmazó fermentlevek összetétele

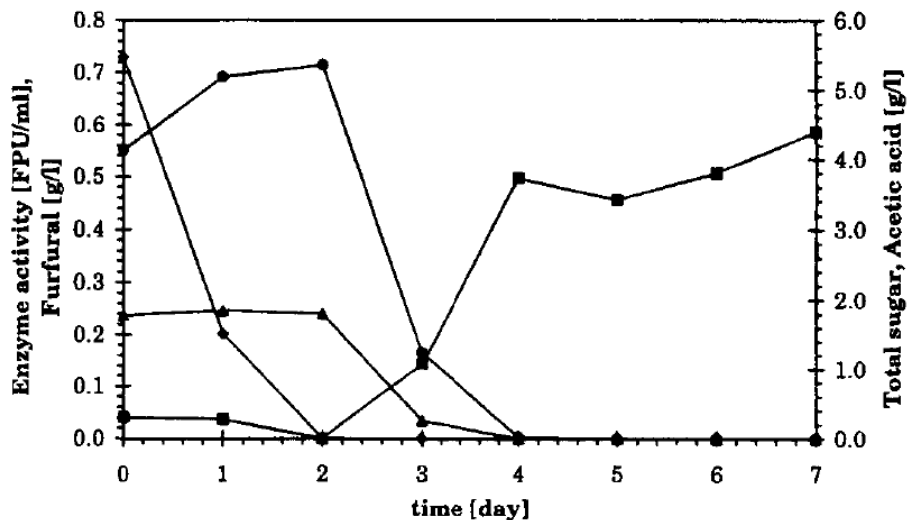
Oldható szénforrás aránya [%]	Cellobióz [g/l]	Glükóz [g/l]	Xilóz [g/l]	Összcukor [g/l]	Ecetsav [g/l]	HMF [g/l]	Furfurol [g/l]
20	0,05	0,32	1,18	1,55	0,72	0,06	0,27
50	0,12	0,91	3,11	4,14	1,78	0,16	0,78
80	0,15	1,35	4,65	6,15	2,63	0,23	1,08

A 15 beállítás közül mindössze 6-ban (34. táblázat) volt enzimtermelés, a többiben nem észleltük a gomba szaporodását sem.

34. táblázat Sikeres enzimtermelési kísérletek beállításainak adatai

Szaporítási körülmények			FPA aktivitás
Oldható szénforrás aránya [%]	pH	Rázatási fordulatszám [rpm]	[FPU/ml]
20	5,0	200	0,57
20	6,0	200	0,77
20	5,0	400	0,63
20	6,0	400	0,76
20	5,5	300	0,64
50	6,0	300	0,59

20%-os arányánál az alkalmazott pH-tól és a keverés fordulatszámtól függetlenül volt enzimtermelés, a pH növelése a térfogati aktivitásra és így a hozamra, a keverés fokozása az enzim képződési sebességre volt pozitív hatással. Az 50%-ban a hemicellulóz frakcióból származó oldható cukrot tartalmazó kísérleteink közül egyedül a pH 6,0-on lefuttatott volt sikeres (28. ábra). A többi vizsgált beállítást mellett egyáltalán nem indult meg az enzimtermelés, sőt a gomba szaporodása sem.



28. ábra Az FPA (■), az összcukor (●), az ecetsav (▲) és a furfurool (◆) koncentrációjának alakulása a rázatott lombikos fermentáció során (50%-ban a hemicellulóz frakcióból biztosított szénforrás)

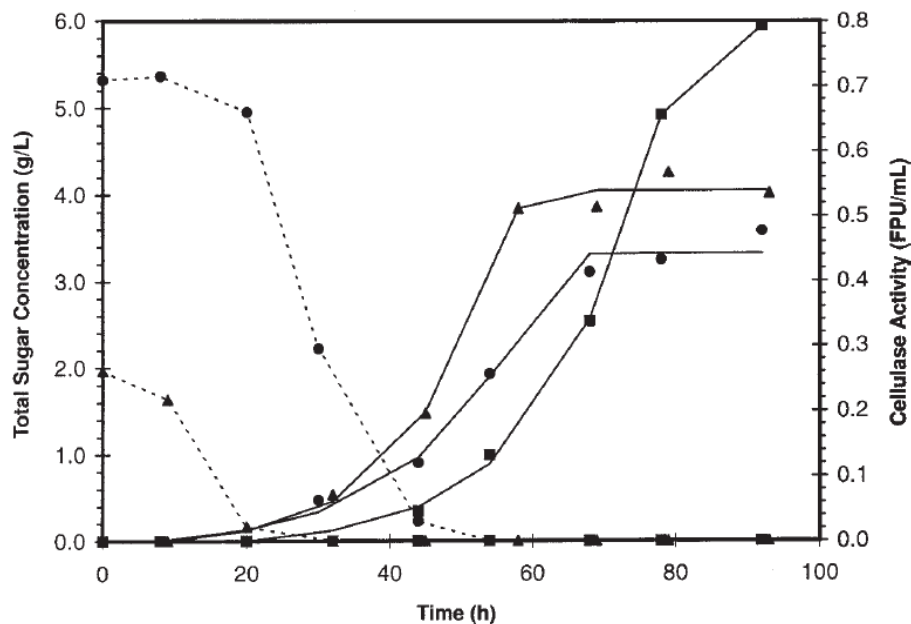
Az enzimtermelés pH 6,0-on 300 fordulat/perc keverés mellett 1,78 g/l ecetsavat, 0,16 g/l HMF-t és 0,73 g/l furfuroolt tartalmazó táptalajon két napos lag szakasz után indult meg. A furfurool és HMF koncentrációja a második napra, az ecetsavé és az oldott cukroké a negyedik napra csökkent le nullára. A 80%-ban a pentóz frakcióból származó szénforrás felhasználására tett kísérletünk nem hozott egyetlen értékelhető eredményt sem, a 2,63% ecetsavat, 0,23 g/l HMF-t és 1,08 g/l furfuroolt tartalmazó táptalaj túl toxikusnak bizonyult a *Trichoderma* számára. Ezek az eredmények jó egyezést mutatnak Szengyel és Zacchi (2000) munkájával, akik *T. reesei* Rut C30 celluláztermelését vizsgálták az ecetsav és furfurool adagolás függvényében. Míg az ecetsav az általuk vizsgált 3 g/l koncentrációig semminemű inhibíciót nem okozott, addig 3 g/l ecetsav és 1,2 g/l furfurool adagolásakor az elért FPA mindössze 12%-a volt a kontrollénak. Munkájuk felhívja a figyelmet arra is, hogy „valós” lignocellulóz szénforrásokon, ahol a különböző inhibitorok együttes hatása összegződik, a táptalaj viszonylag kis egyedi inhibitor koncentrációk esetén is toxikus lehet.

5.2.1.4 Celluláz termelés túlevelű szénforráson (22. cikk)

Az erdészeti hulladékokat nagy mennyiségű, valamint kedvező hemicellulóz összetételük miatt (a hemicellulóz frakció hat szénatomos cukrokból épül fel, melyet a *S. cerevisiae* is képes erjeszteni), a második generációs etanol gyártás potenciális nyersanyagának

tekinthetjük. A lucfenyő előkezelésével, enzimes hidrolízisével és a hidrolizátum erjesztésével kapcsolatos eredményeikről Eklund (1994) részletesen beszámol PhD dolgozatában. Enzim fermentációs kísérleteinket, melyekhez az általa optimálisnak talált előkezeléssel előállított SPS (215°C, 5 perc, SO₂ katalizátor) mosott rostfrakcióját, valamint hemicellulóz frakcióját használtuk szénforrásként, 4 literes fermentorban, valamint rázatott lombikokban hajtottunk végre. A szénforrás koncentráció valamennyi kísérletben 10 g/l volt, melyet (i) mosott rosttal; (ii) mosott rost mellett hemicellulóz frakcióval (20 illetve 50% rost helyettesítve) biztosítottunk. Az eredeti hemicellulóz frakció 48,5 g/l cukrot 4,4 g/l ecetsavat, 1,2 g/l furfurolt és 2,8 g/l HMF-t tartalmazott.

A fermentációs kísérleteket rázatott lombikokban 30°C-on 300 fordulat/perc keverés mellett pH 6,0-on hajtottuk végre (29. ábra).

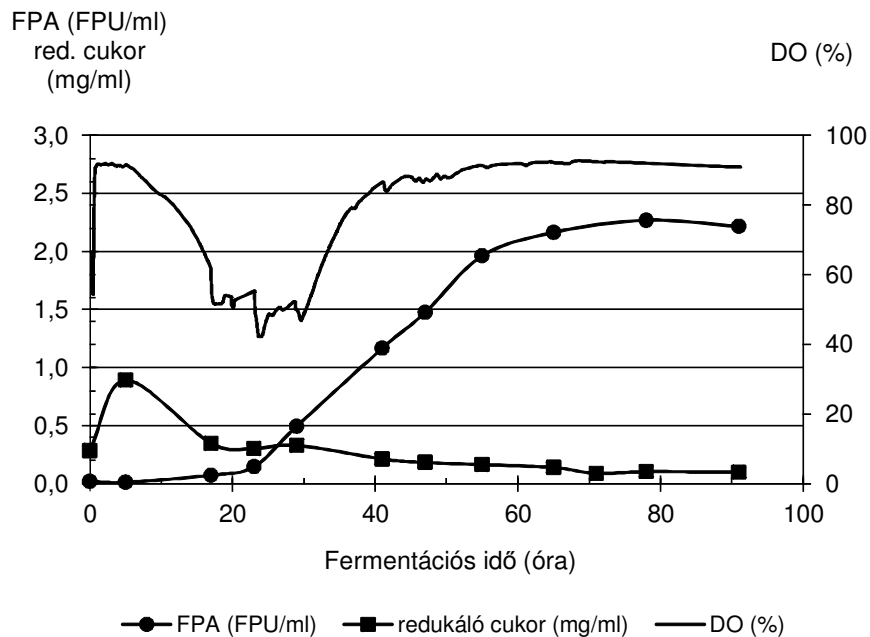


29. ábra FPA és összcukor értékek a fermentációs idő függvényében (■: SPS; ▲: 20% hemicellulóz frakció; ●: 50% hemicellulóz frakció)

A legnagyobb szűrőpapír lebontó enzimaktivitást (0,79 FPU/ml) gőzrobbantással előkezelt, mosott lucfenyő roston értük el, míg a legkisebbet abban az esetben, amikor a szénforrás 50%-át a hemicellulóz frakcióból biztosítottuk. Miután a hemicellulóz frakció 48,5 g/l cukrot tartalmazott, az 5 g/l cukorkoncentráció biztosításához ezt csaknem tízszeresre kellett hígítani, akkor pedig az ecetsav 0,44 g/l, a furfurool 0,12 g/l, a HMF pedig 0,28 g/l alatti koncentrációban volt jelen, ami nem indokolja a 30-40%-kal kisebb enzimhozamot. A túlevél előkezeléséhez szükséges nagy hőmérséklet valószínűleg a ligninből hasított le olyan vegyületeket, melyek gátolták a *Trichoderma* enzimtermelését. A hemicellulóz frakció vízdoldható cukorkomponensei kedvezően hatottak a lag szakasz hosszára, ez viszont azt sugallja, hogy az inhibitorok nem voltak jelen a fermentáció kezdetén, hanem valószínűleg a *Trichoderma* fermentáció során keletkeztek kevésbé toxikus lignin degradációs termékekből.

5.2.1.5 Celluláz előállítás papírszap, ill. hulladékpapír szénforráson (23., 24. cikk)

Hulladékpapír (OCC) fermentációs szénforráskénti felhasználhatóságát 31 literes bioreaktorban vizsgáltuk. A 30. ábra 10 g/l cellulózzal egyenértékű OCC szénforrás (12,5 g/l) felhasználásával Mandels' táptalajon végrehajtott fermentáció lefutását mutatja be.



30. ábra Celluláz fermentáció laboratóriumi fermentorban hulladékpapír szénforráson

Maximális térfogati aktivitást a fermentáció 78. órájában érték el (2,27 FPU/ ml), a maximális produktivitást 35,7 FPU/l.órának határoztuk meg, a hozam 227 FPU/g cellulóz. A termelt enzimet besűrített fermentlé formájában nyúltápok kezelésére használtuk (5.5.2.1 fejezet).

Sikeres szaporításokat végeztünk olyan táptalajon is, mely a szénforrás (hulladékpapír) mellett csak 10 g/l szeszgyári, illetve élesztőgyári vinaszt (besűrített fermentációs, desztillációs maradék) tartalmazott.

A szekunder rost felhasználásán alapuló technológiákban a rost kb 7%-a a papírgyári iszapba kerül, melynek hasznosítása nem megoldott, elszállítása költséges. A 35. táblázat különböző időpontokban vett papírszap minták (*Dunapack Papír-és Csomagolóanyag Zrt.*) összetételét tartalmazza, melyek különösen hamu és cellulóz tartalmukat illetően nagy változatosságot mutattak.

Többféle biotechnológiai hasznosítási kísérlet során kétféle *Trichoderma* törzsszel (*Trichoderma reesei* Rut C30, *Trichoderma viride* OKI B-1) rázatott lombikokban vizsgáltuk, hogy alkalmas-e a papírszap cellulázfermentáció szénforrásául (36. táblázat). Összehasonlításként SF szénforrást alkalmaztunk, azonos szénhidrát (10 g/l cellulóz ekvivalens) koncentrációban Mandels' táptalajon.

35. táblázat Különböző papírszap minták összetétele

Mintasám	Hamu [%]	Szénhidrát [%]	Lignin [%]
1	15	61	11
2	22	45	13
3	24	41	13
4	24	39	13
5	16	51	10
6	21	42	11
7	17	34	11
8	23	36	13

36. táblázat Celluláz termelés papírszap szénforráson

Fermentációs idő [nap]	FP aktivitás (FPU/ml)			
	<i>T. reesei</i> Rut C30		<i>T. viride</i> OKI B-1	
	SF-on	Papírszapon	SF-on	Papírszapon
1	0,202	0,095	0,374	0,215
2	0,451	0,363	0,608	0,356
3	0,660	0,481	0,670	0,361
4	0,905	0,509	0,709	0,356
5	0,995	0,488	0,709	0,350
6	1,004	0,479	0,680	0,320

Mindkét vizsgált gomba képes volt szaporodni és enzimet termelni, az elért aktivitás mintegy fele volt a SF kontrollon elértnek. A *Trichoderma viride* OKI B-1 törzs kiemelkedően nagy BGL aktivitása (0,58 IU/ml) az enzimes hidrolízis szempontjából nagyon előnyös.

5.2.1.6 Mezőgazdasági melléktermékek és ipari hulladékok, mint az enzimtermelés szénforrásai

Az előkezelési fejezetben a hemicellulóz frakció izolálása után visszamaradó kukoricarost (PCF) fermentációs szénforráskénti hasznosíthatóságát sikeresen oldottuk meg (13. ábra). Az 5 g/l szénforráson elért 0,62-0,64 FPU/ml jó aktivitásnak mondható.

A gőzrobbantással előkezelt kukoricaszár, valamint a tejsavó főtömegét adó laktóz egyaránt alkalmas szénforrásnak bizonyult (37. táblázat).

SPCS-on a SF-on elért FPA 75%-át és a BGL aktivitás 81%-át sikerült elérnünk. Laktóz szénforráson elért FPA alig több, mint a kontroll 50%-a, BGL aktivitása viszont kétszerese a

SF-on elértnek, s az 1,45-ös BGL:FPA arány igen kedvező az enzimes hidrolízis szempontjából.

37. táblázat A szénforrás minőségének hatása az FP és BGL aktivitásokra 10 g sz.a./l szénforrás koncentráció mellett, módosított Mandel's táptalajon pH 5,6-on végzett rázatott lombikos fermentációban (7. napos aktivitás adatok)

Szénforrás	FPA [FPU/ml]	BGL [IU/ml]
SF 200	2,175	0,821
Laktóz	1,127	1,636
SPCS I	1,636	0,672

Korábbi, a gőzrobbantáskor keletkező hemicellulóz frakció enzimfermentációban történő felhasználására irányuló sikeres kísérleteink alapján (5.2.1.3, 5.2.1.4) megvizsgáltuk, hogy a nedves oxidációval különböző módon előkezelt kukoricaszár minták (5.1.1.2) hemicellulóz frakcióit milyen körülmények között tudjuk felhasználni a cellulázfermentáció szénforrásaként. A két legerélyesebb körülmény alkalmazásával nyert HH összetételének főbb adatai [g/l]: **Alk-195-15**: hangyasav: 1,5; ecetsav: 1,9; furfurool: 0,17; HMF: 0,006, **Ac-195-15**: hangyasav: 1,8; ecetsav: 2,3; furfurool: 0,2; HMF: 0,033.

A viszonylag nagy szerves sav koncentrációk dacára bíztunk a HH alkalmazhatóságában, miután a furfurool koncentráció a legerélyesebb körülmények között is 0,2 g/l érték alatt maradt. A szerves savak gátló hatását csökkentendő magas pH-t biztosítottunk (pH 6,0) a fermentáció folyamán. A 38. táblázat az Alk-195-15, Ac-195-15 és Alk-185-5 előkezelés felülúszóját felhasználó fermentációs kísérleteink eredményeit foglalja össze.

38. táblázat Nedves oxidációval különböző körülmények között előkezelt kukoricaszár hemicellulóz frakciójának összetétele (HPLC analízis) és azok felhasználása celluláz enzim fermentációra *T. reesei* törzsszel (rázatott lombik, 10 g/l SF szénforrás, 30°C, 0,1 M TRIS-maleát, pH 6,0) Mandels' táptalaj, 75%(V/V) HH tartalom)

	Alk-185-5	Alk-195-15	Ac-195-15	Kontroll
Szénhidrátok a hidrolizátumban [g/l]				
Össz oldott cukor	3,9	13,8	14,1	-
Güzkóz	1,1	1,9	1,4	-
Xilóz	2,0	10,1	10,7	-
Arabinóz	0,8	1,8	2,0	-
Cukrok monomer formában	0,4	2,0	3,3	-
Cukrok oligomer formában	3,5	11,8	10,8	-
Szubsztrátok a tápoldatban [g/l]				
SF	10,0	10,0	10,0	10,0
Össz szénhidrát (monoszacharidban)	13,9	21,3	21,6	11,0
FPA				
FPA _{max} [FPU/ml]	2,57	2,44	2,09	1,85
FPA _{max} elérésének ideje [nap]	6	8	10	8
Hozam [FPU _{max} /g szénforrás]	184,8	114,3	96,9	168,2
BGL				
BGL _{max} [IU/ml]	1,69	1,49	1,25	1,39
BGL _{max} elérésének ideje [nap]	14	14	14	14
Hozam [IPU _{max} /g szénforrás]	121,5	69,8	58,0	126,4

Jó enzimtermelést tapasztaltunk valamennyi kísérletben, ahol a fermentációs táptalajban a csapvizet 75%-ban HH-mal helyettesítettük. Az ezáltal megnövelt szénforrás koncentráció FPA esetében minden esetben megnövekedett térfogati aktivitást eredményezett (13-39%-os emelkedés), így a HH felhasználása hozzájárulhat a hidrolízishez szükséges enzim előállításához, még akkor is, ha a hozamok közül a SF kontrollon elérhető képest egyedül a 185°C-os lúgos katalízissel végrehajtott kezelés HH frakciójának felhasználásával értünk el 10%-os javulást, a többi kísérletben a kontroll SF-on elértnél gyengébb hozamokat kaptunk.

Lignocellulóz szénforrásokon (SPW, SPS, SPCS) sikerült a kontroll SF-kal összemérhető mértékben cellulázt termelni. A megnövelt lignintartalmú szénforrásokon elért pozitív eredmények alapján megállapítottuk, hogy lehetséges a hidrolízis maradék ilyen irányú felhasználása. A mellékáramok (HH, F) használhatósága jó alternatívát nyújt az inhibitorok jelenlétében nehézkes pentóz fermentációnak. Különösen jelentős eredmény a csapvizet 75%-ban helyettesítő nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár hemicellulóz hidrolizátumának, valamint a BGL termelők szaporításához (5.2.4.2 fejezet) alkalmazott SPW folyadékfrakciójának korlátozás nélküli felhasználhatósága. A papíriszap ill. a hulladékpapír fermentációs szénforráskénti alkalmazása akkor jelenthet jelentős eredményt, ha enzimés hidrolízissel és etanol/hidrogén fermentációval kapcsoljuk össze. Nagy előnye ezeknek az anyagoknak, hogy miután a papírgyártás folyamán már jelentős fizikai és kémiai hatásoknak voltak kitéve, nem igényelnek semminemű előkezelést. A laktóz szénforrás alkalmazása a BGL aktivitás biztosítása érdekében lehet lényeges, különösen, ha azt tejsavó felhasználásával biztosítjuk.

5.2.2 A celluláztermelést befolyásoló tényezők, enzimlokalizáció, indukció

A *Trichoderma reesei* egyik legnagyobb hátránya, hogy az általa termelt enzimkomplexben kevés a BGL, ami azt jelenti, hogy a fermentálé felhasználásakor, a hidrolízis során felhalmozódik a cellobióz, mely gátolja az endo- és főleg az exoglukanázok tevékenységét. Az előállított enzimkomplex összetételét és aktivitását több tényező mellett a fermentáció során beállított pH is befolyásolja, tapasztalataink szerint a nagyobb pH (5,8-6,0) kedvezőbb az extracelluláris BGL termeléséhez. Rázatott lombikos kísérletekben, melyek széles skálájú kísérletezést tesznek lehetővé egy új nyersanyag, vagy új törzs tesztelésében, komoly gondot okoz a pH állandó értéken tartása a fermentáció során. Különböző puffer rendszerek alkalmazásával ezt a problémát kívántuk orvosolni. Emellett ebben az alfejezetben ismertetjük az enzimlokalizációra, valamint az enzimindukcióra vonatkozó eredményeinket is.

5.2.2.1 A pH hatása a celluláz és β -glükózidáz termelésre (25. cikk)

Rázatott lombikos kísérletekben SF szénforráson vizsgáltuk különböző pH állítási stratégiák, valamint citromsav, borostyánkősav, ecetsav, maleinsav adagolás hatását *Trichoderma reesei* Rut C30 celluláz termelésére. Kísérleteink célja az volt, hogy (i) vizsgáljuk a pH hatását az elérhető szűrőpapír lebontó és (ii) BGL aktivitásra, másrészt olyan pufferrendszert találjunk, amellyel (iii) a pH állandó értéken tartható és emellett (iv) nem befolyásolja károsan a *Trichoderma* enzimtermelését. Méréseink során megállapítottuk, hogy az acetát, citrát, szukcinát és citrát-foszfát puffer nem megfelelő a pH 5,0 állandó értéken tartására, mivel a komponenseik vagy gátolják a mikroba növekedését (acetát), vagy számára tápanyagul

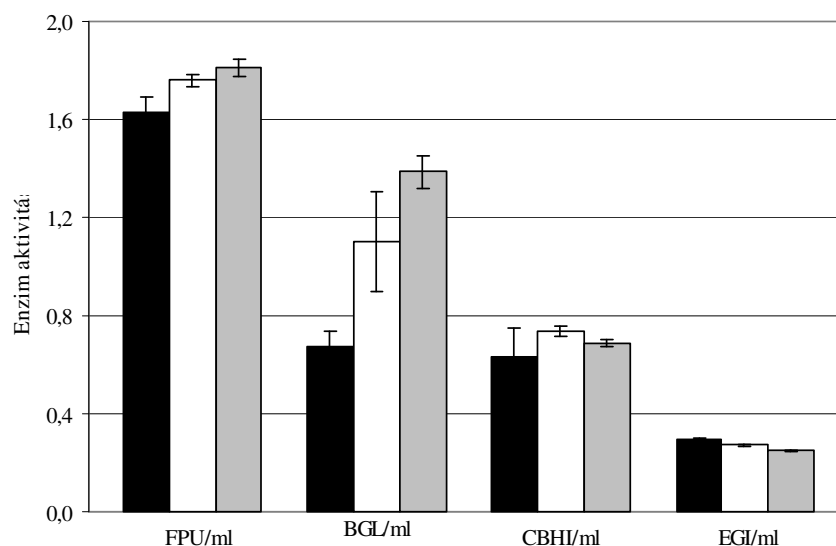
szolgálnak (citrát, citrát-foszfát, szukcinát). Két pufferrendszert találtunk (maleát és trisz-maleát), melyek képesek az állandó pH 6,0 fenntartására (39. táblázat).

39. táblázat FPA és BGL aktivitások alakulása a pH állítás függvényében

pH _{tervezett}	pH kontroll módja	FPA (4. nap) [FPU/ml]	Produktivitás (4. nap) [FPU/h]	BGL (7. nap) [IU/ml]
5,0	napi pH állítás	1,034	10,8	0,6
6,0	napi pH állítás	1,520	15,8	0,9
6,0	0,1 M TRIS-maleát puffer	1,282	13,4	1,5
6,0	0,1 M Maleát-NaOH puffer	1,282	13,4	1,2

SF szénforráson állandó pH 6,0-on lefolytatott fermentációnál 0,1 M-os Tris-maleát puffer alkalmazásakor az FPA 84%-a volt a puffer nélküli, naponta pH állított tenyészetekben elértnek, a BGL aktivitás viszont 67%-kal nagyobb volt, mint a kontroll. Ez az aktivitás arány változás különösen előnyös lehet az enzimes hidrolízisben. Fermentoros kísérleteikben (31 literes Biostat CDCU-3) a pH szabályozásával, pufferek alkalmazása nélkül nem sikerült a várakozásunknak megfelelő hasonlóan nagyobb BGL aktivitást elérni.

Mosatlan gőzrobbantott kukoricaszár szénforráson (SPCS II, 210°C, 5 perc) törköly tartalmú táptalajon 0,1 M-os Tris-maleát puffer rendszer alkalmazásával a pH hatását tovább vizsgáltuk, pH 5,0, 5,5 és 6,0-on lefolytatott rázatott lombikos fermentációkban (31. ábra).



31. ábra A pH hatása extracelluláris enzimaktivitásokra törköly tartalmú táptalajon SPCS II-n végzett fermentáció 7. napján (0,1 M TRIS-maleát puffer)
(■) pH 5,0; (□) pH 5,5; (■) pH 6,0

Ryu és Mandels (1980) eredményeivel összhangban megállapítottuk, hogy lignocellulóz szubsztrátok esetén a nagyobb pH értékek a kedvezőbbek, mindamellett a pH emelésének

igazán nagy hatása a BGL termelésre volt. Az FPA aktivitás 8 illetve 11%-kal, a BGL 62 illetve 104%-kal nőtt a pH növelés hatására. A CBH I és EG I aktivitásokra a pH változtatása nem volt lényeges hatással.

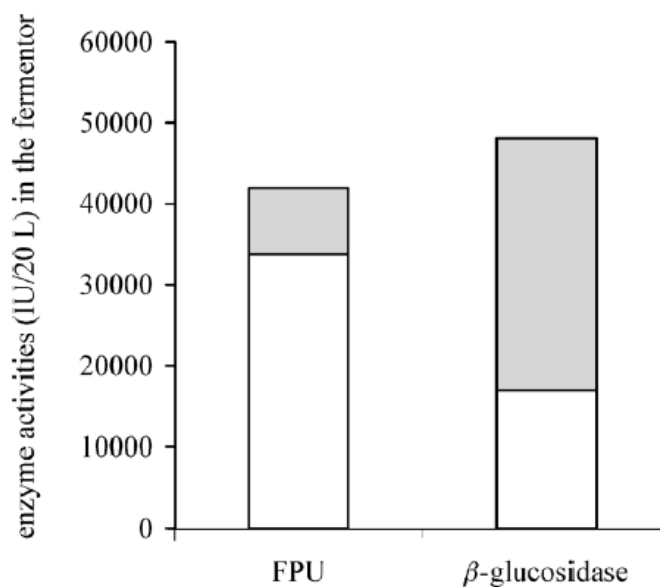
5.2.2.2 *Celluláz termelés vizsgálata szuperkritikus széndioxidos sejtfeltárással* (26. cikk)

A *Trichoderma* által termelt enzimkomplexben állandó problémát jelent a BGL alacsony szintje. Sejtfeltárási kísérleteinkkel a termelt összes cellulolitikus aktivitás meghatározását kívántuk lehetővé tenni. A 20 liter hasznos térfogatú laboratóriumi fermentorban (Biostat CDCU-3) SF szénforráson előállított celluláz tartalmú fermentlé felülúszójából és a feltárt micéliumból FPA és BGL aktivitást határoztunk meg. A sejtek feltárását szuperkritikus CO₂-ban (100 bar, 40°C) hajtottuk végre, a tartózkodási időt 15 és 60 perc között változtattuk (40. táblázat). Méréseink szerint a feltáráshoz a vizsgált körülmények között 15 perc elégséges.

40. táblázat *T. reesei* sejtek feltárása szuperkritikus CO₂-ban

Tartózkodási idő [perc]	FPA aktivitás [FPU/g]
60	7,81
45	8,05
30	7,95
15	8,14

Az intracelluláris és extracelluláris tóból meghatározott FPA és BGL aktivitásokat a 32. ábra mutatja be.

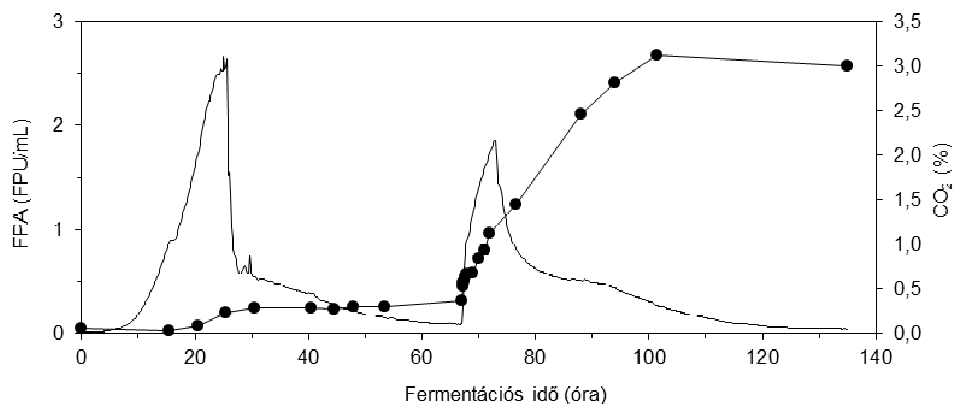


32. ábra Összenzimtermelés SF szénforráson, extracelluláris (□), intracelluláris (■)

A „teljes”, azaz intra- és extracelluláris enzimaktivitások meghatározásakor az FPA : BGL arány 1 : 1,14-nek adódott, ami azt mutatja, hogy a *T. reesei* Rut C30 SF szénforráson (pH 5,7-en) megszintetizálja az optimális cellulózhidrolízishez szükséges BGL mennyiséget, de annak mintegy 2/3-a sejtfalhoz kötötten marad, így a felülúszóval végzett hidrolízis során nem hasznosul. Ezt a megállapításunkat támasztják alá Kovács és mtsi. (2009) eredményei, akik összehasonlító hidrolíziseket végeztek *T. reesei* RutC30 felülúszóval és teljes fermentlével. 48 órás hidrolízisben SPS szubsztráton teljes fermentlé alkalmazásakor 200%-kal nagyobb glükóz koncentrációt értek el a csak felülúszóval végzett hidrolízishez képest.

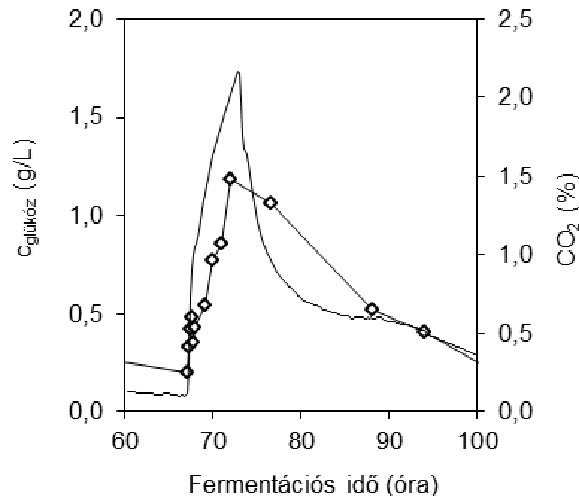
5.2.2.3 Enzimtermelés indukálásának vizsgálata glükózon növesztett *Trichoderma*-al (27. cikk)

Glükóz szénforráson (10 g/l) szaporított *T. reesei* Rut C30 enzimtermelésének indukálását vizsgáltuk CO₂ képződés detektálására alkalmas fermentorban. A gomba 24 óra alatt elfogyasztotta az összes glükózt, a CO₂ képződés erre az időpontra jelentősen lecsökkent, de csak a 65. órára szűnt meg. A 67. órában történő SF adagolás hatására impulzuszerű CO₂ fejlődés és enzimképződés indult meg (33. ábra).



33. ábra A kétlépcsős fermentáció: FPA aktivitás a fermentlében (—●—) és CO₂ koncentráció az elmenő gázban (—)

A kétlépcsős enzimfermentáció során megfigyelhető, hogy az impulzuszerű SF beadagolás hatására jelentős a glükóz képződés, s a glükóz koncentráció csak lassan közelíti meg a nullát (34. ábra).



34. ábra A glükóz koncentráció alakulása (—◇—) és az elmenő gáz CO₂ koncentrációja a fermentáció második szakaszában

Ennek a kétlépcsős modellnek akkor lehet gyakorlati jelentősége, amikor az előkezelés után elválasztott pentóz cukrokat használjuk fel a gomba elszaporítására, majd impulzusszerű cellulóz adagolással biztosítjuk az enzimindukciót. Méréseinkkel igazoltuk, hogy a *T. reesei* Rut C30 pillanatszerűen képes metabolizmusát glükóz hasznosításról cellulóz hasznosítására átkapcsolni. Ez különösen figyelemreméltó Ike és mtsi. (2010) glükóz szénforrás alkalmazásának előnyeit hangsúlyozó munkája tükrében.

5.2.3 Cellulázfermentáció rekombináns *Trichoderma*kkal

Egy speciális feladatra különböző rekombináns törzseket állítottak elő svéd és finn együttműködő partnereink. A genetikai munkában nem, de a rekombináns törzsek tesztelésében, szaporításában, enzimtermelésének és az enzimek alkalmazásának vizsgálatában aktívan részt vett csoportunk.

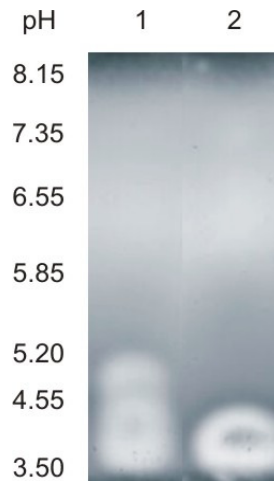
5.2.3.1 *T. reesei* QM9414 rekombinánsok enzimtermelése, szekunderrost kezelése céljából (29., 30. cikk)

T. reesei EG-t, ill. annak csupán katalitikus alegységét genetikailag módosított *T. reesei* QM9414 törzsek (Collén és mtsi., 2001) szaporításával glükóz-tartalmú táptalajon állítottuk elő. A fermentlé felülszókat szekunder papír rostok kezeléséhez használtuk (5.5.1.2).

A fermentáció során mind az endoglukanáz aktivitásban (0,06-0,075 IU/ml pNPC-áz), mind a fermentlé fehérje-tartalmában (0,095-0,097 mg/ml) hasonlóságot tapasztaltunk a két *T. reesei* QM9414 rekombináns szaporítása során (8 nap).

A két rekombináns endoglukanáz enzim-termelését izoelektromos fókuszálást követő aktivitás-festéssel ellenőriztük CMC szubsztráton. Mindkét rekombináns esetén a glükóz-tartalmú táptalajon folytatott rátáplálásos fermentáció 5. napján vett mintákat vizsgáltuk. A Cel7B aktivitását az 35. ábrán átlapoló zónák mutatják a 3,5-5,1 pH tartományban, míg a Cel7B core aktivitását a 3,5-4,2 pH tartományban. Az észlelt pH intervallumok megegyeznek az irodalomban található pH értékekkel mind a Cel7B (Biely, 1990), mind a Cel7B core

(Eriksson és mtsi., 2004) enzim molekulák izoformjai esetén. Az aktivitás festés altámasztotta a célkomponensek szelektív termelését a *T. reesei* endoglükánázok közül.



35. ábra TrCel7B (1) és TrCel7Bcore (2) endoglükánázok azonosítása CMC-áz aktivitás-festéssel IEF szeparálás után

Mind az EG I, mind az EG I katalitikus alegységét tartalmazó fermentlével sikeres kezeléseket hajtottunk végre szekunder rostokon (5.5.1.2 fejezet).

A genetikailag módosított *T. reesei* QM9414 fermentációjának léptéknövelését 3 l-es laboratóriumi fermentorban végeztük. Előkísérletként szakaszos fermentációk lefutását vizsgáltuk módosított *Trichoderma* minimál táptalajon. A N-forrás limitáló tényezőnek bizonyult 2 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot (0,42 g/l N) tartalmazó táptalajon, ezzel szemben emelt N-tartalmú (2,1 g/l N), 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot tartalmazó tápközegben az enzimtermelés egészen a C-forrás kimerüléséig folytatódott. Emiatt a *T. reesei* QM9414 rekombinánsok rátáplálásos fermentációiban a továbbiakban a N-gazdag, 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot tartalmazó tápközeget alkalmaztuk.

A két rekombináns fehérje-termelésében nem volt különbség, az extracelluláris endoglükánáz aktivitás viszont jelentősen nagyobb volt az EG I katalitikus alegységet termelő rekombináns felülúszójában. SDS-PAGE és IEF gélelektroforézis vizsgálatok azt mutatták, hogy az EG I katalitikus alegységet termelő rekombináns esetén a célfehérje viszonylag nagy arányban, viszont a teljes EG I-et termelő rekombináns felülúszójában a teljes EG I csupán kis mennyiségben volt jelen. Az okok felderítésére irányuló kísérleteink során a fermentlében egy eddig ismeretlen szerin proteázt azonosítottunk, mely a fermentáció hőmérsékletén maximális aktivitásának 85-90%-át, ill. az alkalmazott pH-n maximumának 45-50%-át mutatja. Emiatt, valamint mert a termelt célfehérje (*T. reesei* EG I) aminosavsorrendje számos potenciális (tripszinre jellemző) hasítási helyet tartalmaz, feltételezzük, hogy ezen enzim működésének hatására az EG I hasad, s ezért találjuk csak nagyon kis mennyiségben a fermentlében a teljes enzimet. A megemelt N-tartalmú táptalaj tehát nem alkalmas a teljes EG I szelektív termelésére.

5.2.3.2 *Thermoascus aurantiacus* CBHI termeltetése *T. reesei* RF6026 törzsszel (31. cikk)

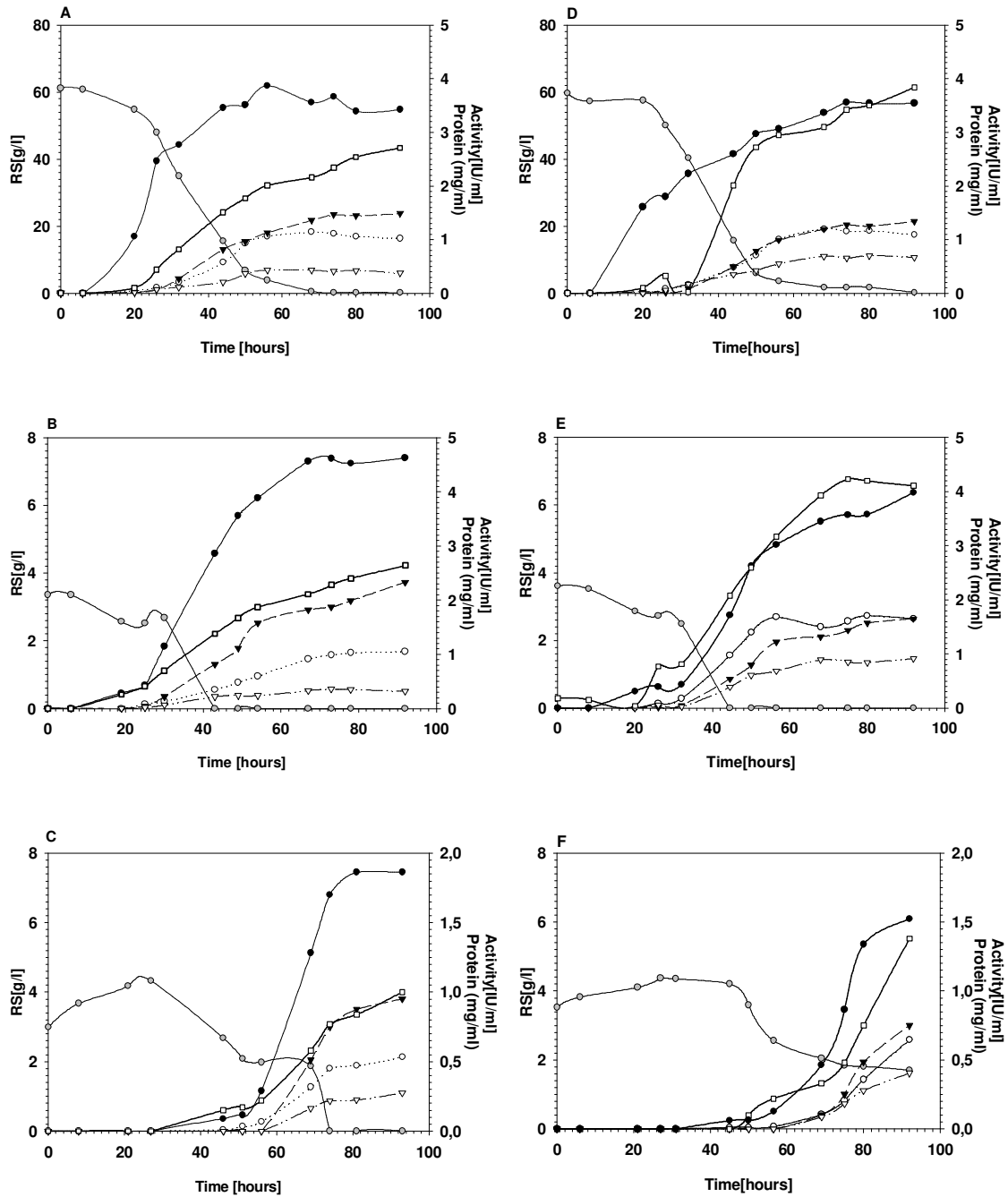
Ezt a munkánkat szoros együttműködésben végeztük egy finn enzimgyártó céggel (Roal Oy), valamint a finn VTT kutatóintézetrel egy Európai Unió projektben (5. KP, TIME ENK6-CT-2002). A finn partnerek, annak érdekében, hogy 70°C fölött is jól működő cellobiohidrolázt tudjunk előállítani, a *Thermoascus aurantiacus* CBH I-et klónozták és expresszálták *T. reesei* Rut C30-ban. Az így előállított *T. reesei* RF6026 törzs szaporítását és enzimtermelését vizsgáltuk a „szülő” törzsszel (*T. reesei* Rut C30) történő összehasonlítás céljából. Kísérleteinkhez egy ipari jellegű táptalajt alkalmaztunk, mely a szénforráson kívül mindössze szeszyári törkölyt, KH_2PO_4 -ot és $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot tartalmazott. Különböző szénforrásokon (SF, laktóz, SPCS), melyeket 60, 60, ill. 30 g/l koncentrációban alkalmaztunk 30 literes laboratóriumi fermentorban végeztük az összehasonlítást (36. ábra).

A redukáló cukortartalom alakulása SF és laktóz szénforráson hasonló volt mindkét törzsnél, a fermentáció 42-44., illetve 74-96. órájára csökkent nullára. SPCS-on a Rut C30 kezdetben nehezebben indult, erről tanuskodik a redukáló cukortartalom kezdeti emelkedése, de értéke a 74. órára nullára csökkent, míg az RF6026 esetében a fermentáció végén (96. óra) is volt 2 g/l mérhető redukáló cukor tartalom.

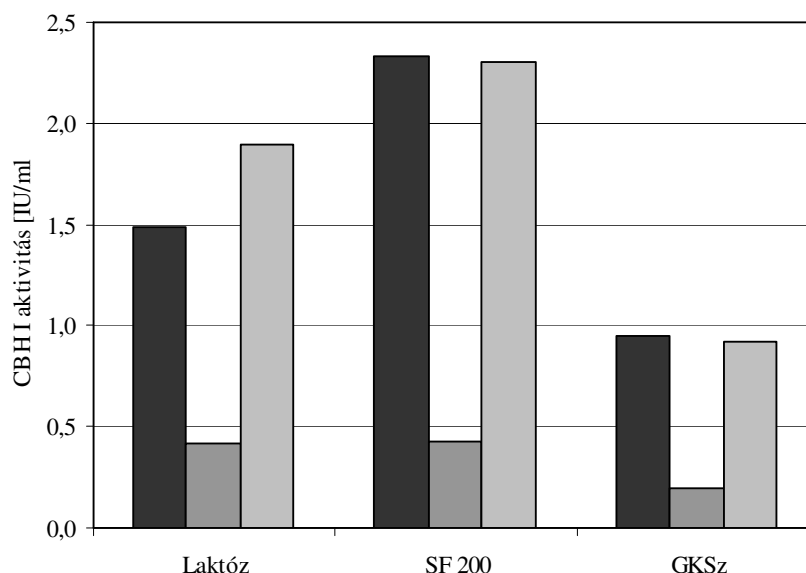
Az enzimtermelés a SF és laktóz szénforrást tartalmazó kísérletekben mindkét törzs esetében gyorsabban indult meg, mint SPCS-en. A fehérjetermelés nagyobb volumenű volt a rekombináns törzsnél, az FPA értékek viszont mindhárom szénforráson kismértékben, de alulmaradtak az új törzs alkalmazásakor. Ennek egyik oka lehet, hogy a *T. aurantiacus* CBH I nem rendelkezik szubsztrát kötő régióval, ami a szubsztrát jobb hidrolízisét tenné lehetővé. A BGL aktivitások 1,1-1,7 között voltak laktózon és SF-on, ez utóbbi 70%-kal nagyobb, mint a kontroll Rut C30-cal elért aktivitás. Az elért EG I aktivitások jobbaktak a rekombináns törzsnél, viszont a módosított törzs 50°C-on mért CBH I aktivitása mindhárom szénforráson alatta maradt a szülő törzs által mutatott értékeknek (az enzimaktivitás mérés az enzim számára nem optimális hőfokon történt).

A heterológ termelt CBH I-et a termelt enzim saját hőmérséklet optimumumán végzett aktivitásméréssel teszteltük összehasonlítva a Rut 30 által termelt CBH I aktivitásával (37. ábra).

A heterológ CBH I enzimtermelés sikerességét bizonyította a 70°C-on végzett CBH I aktivitás mérés (ahol viszont a Rut C30 törzs CBH I enzime elvesztette aktivitásának 70-80%-át).



36. ábra Enzimtermelés *T. reesei* Rut C30 törzsszel (A) 60 g/l laktóz, (B) 60 g/l SF, és (C) 30 g/l SPCS; illetve *T. reesei* RF 6026 törzsszel (D) 60 g/l laktóz, (E) 60 g/l SF, és (F) 30 g/l SPCS szénforrásokon
(●) RC; (●) FPA; (○) BGL; (▼) CBH I; (▽) EG I; (□) fehérje koncentráció



37. ábra Különböző szénforrásokon termelt *T. reesei* Rut C30 CBH I aktivitása 50 (■) és 70°C-on (■), illetve RF6026 CBH I aktivitása 70°C-on (■)

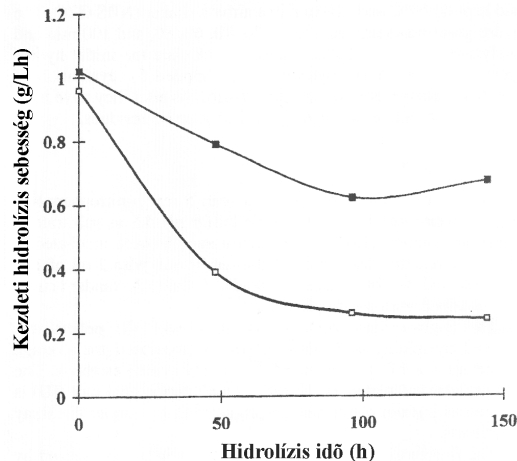
5.2.4 Béta-glükózidázzal kapcsolatos kutatások

Kandidátusi dolgozatom beadása óta (1991) a témában elért legfontosabb eredményeinket foglalom össze az alábbi alfejezetekben.

5.2.4.1 β -glükózidáz stabilizálása *Aspergillus phoenicis* pelletekben (32. cikk)

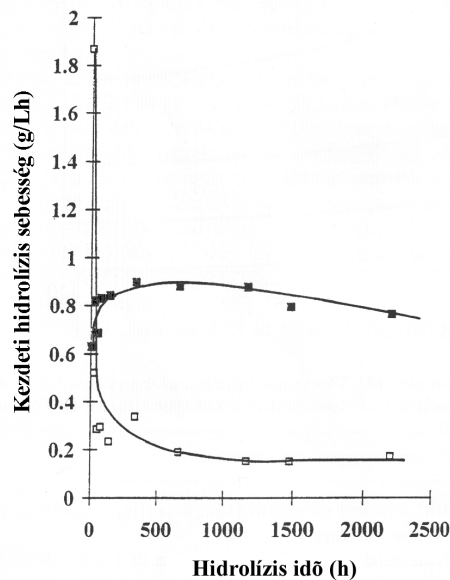
Korábbi munkánkban beszámoltunk róla, hogy *Aspergillus phoenicis* oszlopreaktoros fermentációjával sikerült BGL aktivitású mikrobiális pelletet előállítani, melyek enzimreaktorban megfelelő stabilitással rendelkeztek (Réczey és mtsi., 1989, Réczey és mtsi., 1990). Ahhoz, hogy a BGL aktivitással rendelkező mikrobiális pelletet tárolható, szállítható, iparilag is hasznosítható legyenek, célszerű a szárításuk, melynek hatására a korábban 700 órában meghatározott felezési idő 48 óra alá csökkent (38. ábra).

A nagymérvű felezési idő csökkenés valószínű oka, hogy a sejtmembrán a szárítás következtében elvesztette féligáteresztő hártya tulajdonságát, megrepedezett, s így a sejtben oldott állapotban levő BGL kiáramlott a hidrolizátumba. Ezt a hipotézisünket a hidrolizátumból végzett aktivitásmérések eredményei is alátámasztják (Flachner és mtsi., 1999). A pelletekben levő BGL stabilizálására glutáraldehydes keresztkötést alkalmaztunk. Kísérleti terv alapján meghatároztuk azokat a körülményeket, melyek biztosítják, hogy az enzim a pelletben rögzítve maradjon, ugyanakkor a kezelés nem csökkenti le jelentősen az eredeti enzimaktivitást.



38. ábra Szárított és nedves pelletek működési stabilitásának összehasonlítása
(—■—nedves pelletek, —□—szárított pelletek)

Az optimalizált körülmények között stabilizált pelletek (1,2%(V/V) glutáraldehid, 24 óra kezelési idő, 25°C, pH 4,8 0,05 M citrát pufferben, 100 fordulat/perc rázatás) használhatóságát szobahőfokon történő szárítás után egymást követő hidrolízisekben teszteltük cellobióz szubsztráton (39. ábra).



39. ábra Optimálisan kezelt és szárított pelletek stabilitásának vizsgálata
(—■—glutáraldehiddel kezelt pelletek, —□—szárított pelletek)

Az optimális körülmények között végrehajtott kezelés hatására a pelletek stabilitása jelentősen megnőtt, a 2196 órás hidrolízis kísérlet alatt (15 ml, 25 g/l cellobióz, 0,1-0,3 g pellet, pH 4,8, 50°C, 110 rpm), a kezdeti hidrolízis sebesség mintegy 95%-a megmaradt, míg a kezeletlen mikrobiális pelletknél ez az érték mindössze 10%.

5.2.4.2 β -glükózidáz fermentáció hemicellulóz hidrolizátumon (33. cikk)

A korábban jó BGL termelőnek talált gombatörzsek (*P. ochro-chloron*, *A. niger*, *A. foetidus*, *A. phoenicis*) szaporítását vizsgáltuk különböző gőzrobbantással előkezelt fűzfa frakciókon, egyrészt az „on site” enzimtermelést, másrészt az etanoltermelésre csak korlátozottan hasznosítható pentóz frakció alkalmazhatóságát tesztelve. A SPW hemicellulóz frakcióját (F) illetve annak besűrített formáját (CF) használtuk szénforrásul, kontrollként glükózt és előhidrolizált SF-ot (PSF) alkalmaztunk (41. táblázat).

41. táblázat Jó BGL termelők enzimtermelése különböző szénforrásokon: glükóz, előhidrolizált SF (PSF), hemicellulóz frakció (F), betöményített hemicellulóz frakció (CF)

Törzs	Glükóz	BGL [IU/ml, 6. nap]		
		PSF (10 g/l)	F (5 g/l)	CF (10 g/l)
<i>A. niger</i>	2,80	2,46	1,90	2,48
<i>A. phoenicis</i>	2,80	3,6	2,11	3,75
<i>A. foetidus</i>	1,42	1,38	2,51	2,21
<i>P. ochro-chloron</i>	0,37	0,83	0,24	0,45

Maximális hozamot (502 IU/g szénhidrát) az *A. foetidus* adott, amikor hemicellulóz hidrolizátumot alkalmaztunk szénforrásnak. Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy mind a hemicellulóz hidrolizátum (F), mind a bekoncentrált hemicellulóz hidrolizátum (CF) kiváló szénforrás mindhárom vizsgált *Aspergillus* fermentációjához (a *P-ochro-chloron*nak nem). A BGL termelések meghaladják a kontroll előhidrolizált SF és a glükóz szénforráson elért aktivitás értékeket.

Kevert táptalajon, mely SPW-t (5 g/l) és hemicellulóz frakciót (5 g/l) is tartalmazott vizsgáltuk az enzimtermelést és a vízzoldható, valamint az össz szénhidrátra vonatkoztatott hozamokat (42. táblázat).

42. táblázat Jó BGL termelők enzimtermelésének vizsgálata kevert szénforrásokon (5 g/l SPW+ 5 g/l F)

Törzs	β -glükózidáz aktivitás	Hozam	Hozam
	[IU/ml]	[IU/g vízzoldható szénhidrát]	[IU/g össz szénhidrát]
<i>A. niger</i>	2,90	580	290
<i>A. phoenicis</i>	4,60	920	460
<i>A. foetidus</i>	2,02	404	202
<i>P. ochro-chloron</i>	0,69	138	69

Maximális térfogati enzimaktivitást, 4,6 IU/ml-t az *A. phoenicis* törzssel értük el. Az aktivitások és hozamok alapján feltételezzük, hogy az *A. phoenicis* képes a szilárd szénforrás hasznosítására is.

5.2.4.3 *β -glükózidáz fermentáció *Aspergillus* és *Trichoderma* kevert fermentációjával*

(34. cikk)

T. reesei Rut C30 és *A. niger* BKMf 1305 együttes fermentációját optimalizáltuk maximális BGL aktivitás elérése érdekében. Kísérleteinket egy 2³ kísérleti terv szerint végeztük, ahol vizsgáltuk a táptalaj összetételének, a két gombatörzs inokulum arányának és annak a hatását, hogy milyen késleltetéssel kell az *Aspergillust* beoltani a *Trichoderma* tenyészetbe. A mérési eredményeket a Statisztika program segítségével értékeltük és megállapítottuk, hogy mindhárom vizsgált faktor szignifikáns hatású a BGL termelésre. A legnagyobb enzimaktivitást 3,07 IU/ml-t 7 napos fermentáció esetén akkor értük el, amikor az inokulum 3,3% *Aspergillust* és 6,7% *Trichodermát* tartalmazott, a kétféle gombát egyszerre oltottuk be és a táptalaj dupla mennyiségű tápsót és hulladék papír szénforrást tartalmazott (részletes eredmények: Juhász és mtsi., 2003).

5.2.4.4 *β -glükózidáz tisztítás és koncentráció vizes kétfázisú rendszerekkel*

(35. cikk)

A. niger fermentlé felülúszóját vizes kétfázisú rendszerben 700-szorosra töményítettük. A két fázisú rendszert úgy készítettük, hogy magában a fermenté felülúszóban oldottuk fel a két fázisalkotó polimert, a dextránt és a polietilén glikolt, még hozzá úgy, hogy az alsó fázis, mely az enzimet tartalmazta, kis térfogatú legyen a felső fázishoz viszonyítva. Az enzim nagy affinitást mutatott az alsó fázishoz, ha a rendszer 100 mM KSCN-t tartalmazott pH 8,0-on. A BGL visszanyerése 85-95% volt, a tisztulása 2-3-szoros (részletes eredmények: Johansson és Réczey, 1998).

5.3 *A lignocellulózok enzimes hidrolízisével kapcsolatos kutatások*

A lignocellulózok enzimes hidrolízisével kapcsolatos kutatások gyakorlatilag az egész lignocellulóz tematikát átszövik. Enzimes hidrolízis hatékonyságát sok paraméter befolyásolja, ilyenek (i) az alkalmazott enzimkomplex összetétele, (ii) az enzim/ szubsztrát arány, (iii) a kiegészítő enzimek jelenléte, (iv) a szubsztrát koncentrációja, hozzáférhetősége, porozitása, lignin tartalma, (v) felületaktív anyagok, polimerek, inhibitorok jelenléte, (vi) a hidrolízis hőmérséklete, (vii) pH-ja. Enzimes hidrolízissel teszteljük valamely előkezelés jóságát, többnyire a kezeletlen, kontroll minta bonthatóságához viszonyítva. Amikor a lignocellulóz minták erjeszthetőségét vizsgáljuk, ugyancsak lényeges lépés az enzimes hidrolízis. Ezekben az esetekben előre meghatározott kísérleti körülmények között (S koncentráció, E/S arány, hidrolízisidő, keverés) végezzük a hidrolízist.

Ebben a fejezetben néhány, az enzimes hidrolízissel kapcsolatos kutatásunk eredményéről számolok be, ilyenek az ún. „on site” előállított, azaz saját fermentálású enzimek jellemzése és hidrolízisben történő alkalmazása, valamint azon kutatások, melyekben speciális új enzim komponensek és kiegészítő enzimek, valamint polimerek hatását vizsgáltuk. A lignocellulózok enzimes hidrolízisét a kezdeti sebesség gyors csökkenése jellemzi (Puls és mtsi., 1985, Tu és mtsi., 2009), ennek enyhítése, akár segítő enzimekkel, akár polimerekkel, akár kedvezőbb összetételű enzimkomplex alkalmazásával nagy jelentőséggel bír, ugyanis különben a kis sebesség kompenzálására nagyobb enzimdózisra van szükség, ami jelentős többletköltséget jelent.

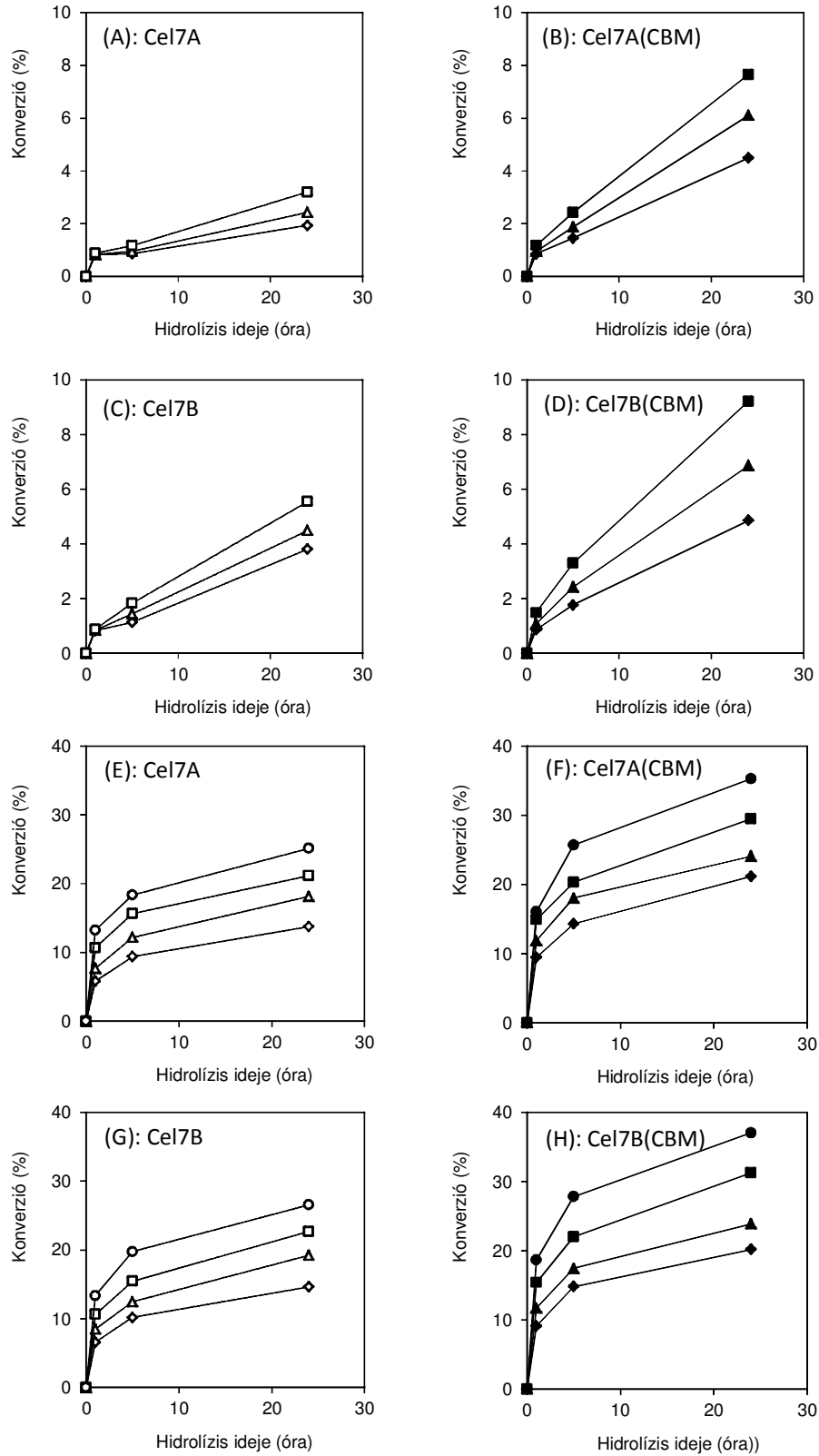
5.3.1 Kísérletek egyedi enzimkomponensekkel

5.3.1.1 Tiszta enzimkomponensek hatása kristályos és amorf tiszta cellulóz hidrolízisében (36. cikk)

A genetikai munka sok esetben az eltérő tulajdonságú enzimek előállítására képes szervezetek létrehozására irányul. Különösen keresettek a magasabb hőfokoptimummal, eltérő pH optimummal rendelkező enzimek szintézisére képes rekombinánsok. Ebben a munkánkban két olyan *Melanocarpus albomyces*ből származó termotabil cellulázt vizsgáltunk, melyeket rekombináns *Trichoderma reesei*vel (Haakana és mtsi., 2004) heterológ módon állítottunk elő. A gének kifejeztetésére kétféle formában került sor: (i) az eredeti genetikai szekvencia szerint, illetve (ii) módosított formában, egy idegen, *T. reesei* eredetű cellulóz-kötő modul (CBM) hozzácsatolásával az eredeti kódoló szekvenciához. A fermentlé szűrése és az enzimfehérjék tisztítása után (részletes adatok: Sziártó és mtsi., 2008) került sor az enzimek vizsgálatára. A Cel7A endoglükánázt, valamint a Cel7B cellobiohidrolázt hidrolízis kísérleteinkben tisztított formában pH 6,0-on 50°C-on alkalmaztuk. A vizsgált enzimek hidrolitikus hatását a hidrolízis során keletkező termékösszetétellel jellemeztük. Miután a kristályosság egyike azoknak a fizikai paramétereknek, melyek a cellulázok működését jelentősen befolyásolják, az új *Melanocarpus* enzimek hidrolizáló képességét két karakteresen különböző szubsztráton, a kristályos Avicel-en és az ebből foszforsavas duzzasztással előállított amorf cellulózon az un. Walseth cellulózon (PASC) vizsgáltuk. (40. ábra).

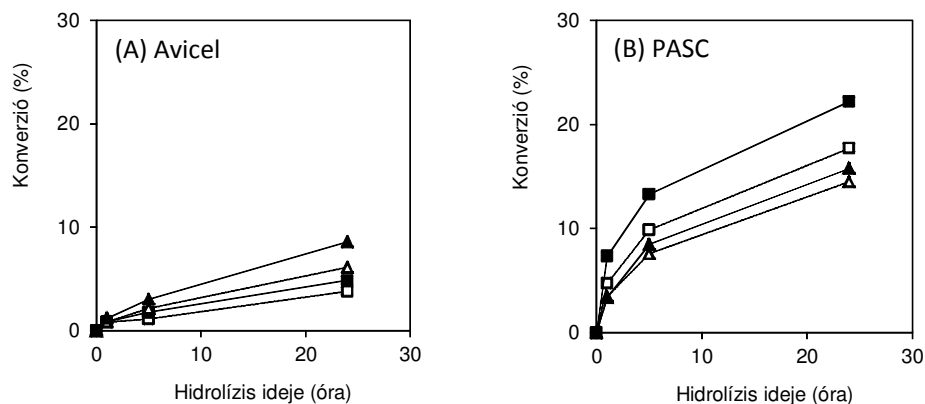
A alkalmazott kis enzim dózisok, valamint az a tény, hogy csak egyedi enzimkomponensek hatását vizsgáltuk kis glükánkonverzió értékeket eredményezett, Avicel szubsztrát esetében egyetlen beállítással sem értük el a 10%-ot. PASC szubsztrátnál a legjobb konverziók megközelítették a 40%-ot. Kristályos szubsztráttal szemben a vizsgált CBH nagyobb aktivitással rendelkezett, mint az EG, az amorf cellulózon nem volt jellemző a különbség a két új enzim hatásában. Azonos enzimdózis (mg fehérje/g S) alkalmazásakor a Cel7A endoglükánázzal 14-szeres, a Cel7B cellobiohidrolázzal 7,5-szeres konverziót értünk el az amorf cellulózon (PASC) a mikrokristályoson (Avicel) elérthez képest. A CBM pozitív hatását más enzimeknél többen leírták (Ståhlberg és mtsi., 1991, Linder és Teeri, 1997), eredményeink az új *Melanocarpus* enzimekkel alátámasztották ezt a megfigyelést, valamennyi kísérletben jobb konverzió eredményeket kaptunk, amikor *Trichoderma* CBM-lal kapcsolt Cel7A-t illetve Cel7B-t alkalmaztunk. A pozitív hatás (százalékosan) nagyobb volt Avicel hidrolízisekor, mint PASC-on. Érdekes módon a Avicel hidrolízisekor a CBM léte különösen az endoglükánáz (Cel7A) hatását javította, ami annak *Trichoderma* eredetével függhet össze. PASC szubsztráton a CBM pozitív hatása mindkét új *Melanocarpus* enzimnél 40% körüli értéknek adódott.

A kristályos Avicel sokkal ellenállóbb volt, mint az amorf cellulóz, így a hatékony enzim hidrolíziséhez jelentősen nagyobb enzimdózisokat alkalmaztunk (5, 10, 20 mg/g szubsztrát). Sajnos, még a tízszeres enzimdózis sem eredményezett a PASC-on elérthez hasonló konverziót. A Cel7B kíváló hatása az amorf cellulózon ellentmond a CBH-okkal kapcsolatos eddigi tudásunknak (Medve és mtsi., 1998, Kipper és mtsi., 2005). Miután SDS PAGE méréseink nem utaltak szennyező (endoglükánáz aktivitású) fehérjék jelenlétére, feltételeztük, hogy az új *Melanocarpus* Cel7B rendelkezik endoglükánáz típusú mellékaktivitással és az eredményezte a PASC jó bontását. Ezt a feltételezést CMC és HEC szubsztrátokkal szemben meghatározott nyomnyi endoglükánáz aktivitások alátámasztották.



40. ábra (A-D) Avicel hidrolízis az enzimkomponensekkel 5 (◇, ◆), 10 (△, ▲) 20 (□, ■) mg/g szubsztrát, illetve (E-H) PASC hidrolízis 0,5 (◇, ◆), 1 (△, ▲), 2 (□, ■), illetve 5 (○, ●) mg/g szubsztrát enzim dózis mellett (50°C, pH 6,0)

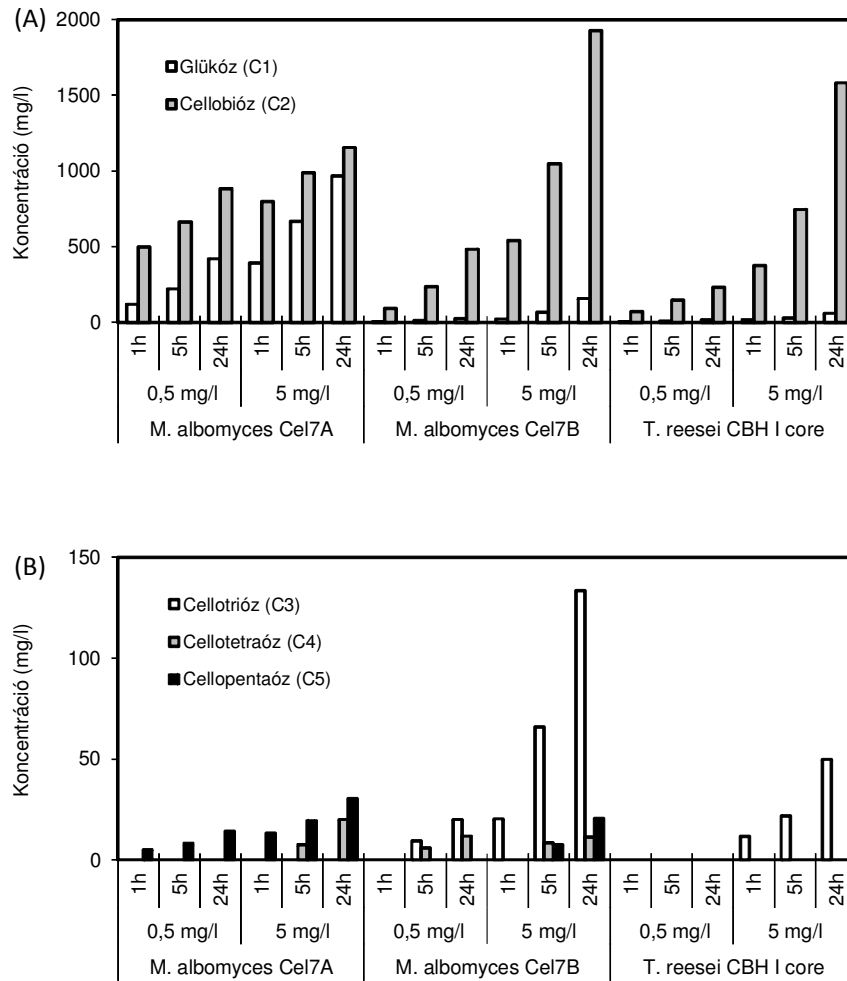
A 41. ábrán a *Trichoderma* és a *Melanocarpus* eredetű CBH működését hasonlítjuk össze Avicel és PASC szubsztrátokon (T 50°C, pH 6,0, S 10 g/l (Avicel/PASC), E/S 5 mg fehérje/g S).



41. ábra Avicel (A) és PASC (B) konverziója a hidrolízis idő függvényében (■) *M. albomyces* Cel7B, (□) *M. albomyces* Cel7B(CBM), (Δ) *T. reesei* Cel7A, és (▲) *T. reesei* Cel7A(CBM) alkalmazásával (50°C, pH 6,0)

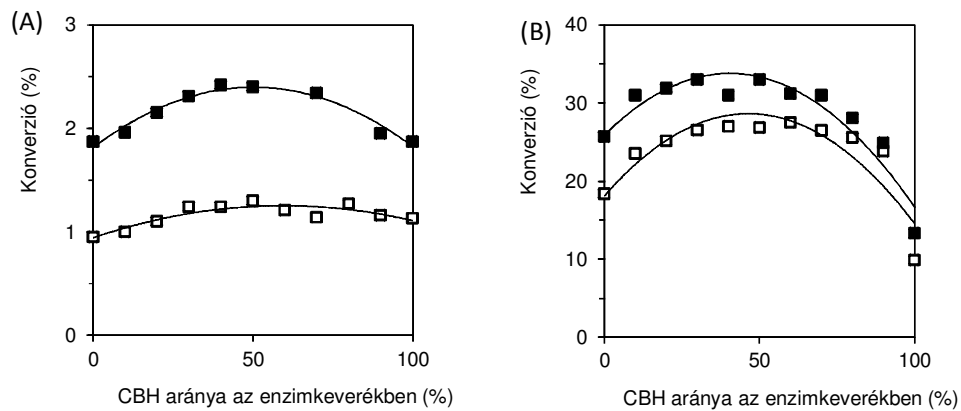
Avicelen a *Trichoderma* eredetű, PASC-on a *Melanocarpus* eredetű CBH teljesített jobban, mindkét esetben a kötő domént is tartalmazó enzim volt hatásosabb.

A termékeloszlás PASC 1, 5 és 24 órás hidrolízisekor a 42. ábrán látható. Az alkalmazott körülmények között (50°C, pH 6,0) a *M. albomyces* CBH aktívabb volt amorf szubsztráton, mint a hasonló *T. reesei* eredetű CBH, és a *Trichoderma* CBH-val ellentétben a hidrolízistermékek között C4 és C5 tagszámú dextrinek is előfordultak, ami endoglukanáz mellékaktivitásra utal.



42. ábra PASC hidrolízis az enzimkomponensekkel; a termék eloszlás (A: C1, C2 cukrok; B: C3, C4, C5 cukrok) összehasonlítása *T. reesei* eredetű CBH-vel

A szinergizmust mindkét szubsztráton vizsgáltuk (43. ábra).



43. ábra Szinergizmus vizsgálata Avicel (A) és Walsheth (B) cellulóz (PASC) hidrolízisekor
□ CBD nélküli Cel7A és Cel7B, ■ Cel7A és Cel7B CBD-vel

A vizsgált enzimek együtt egyértelmű szinergisztikus hatást mutattak mindkét szubsztrát hidrolízisekor (S 10 g/l Avicel ill. PASC, T 50°C, pH 6,0, t 5 h). CBM-t is tartalmazó celluláz komponensek alkalmazásakor a hidrolízis mutatók javultak, a javulás mértéke hangsúlyosabb volt az endoglükánázok esetén, különösen kristályos szubsztráton.

A vizsgált *Melanocarpus* eredetű enzimeknek a *Trichoderma*-énál nagyobb pH optimuma alkalmassá teszi őket textilipari alkalmazásokra (mosószeripar, farmer anyagok „kőmosása”) amelyet eredményeink, miszerint már 50°C-on összemérhető eredményt produkálnak a hagyományos (ipari) enzimekkel (41. ábra) mindenképp megerősítenek, annál is inkább, mert a vizsgált enzimek hőmérsékleti optimuma 50°C feletti.

5.3.1.2 Tiszta enzimkomponensek és segítő enzimek alkalmazása lignocellulóz szubsztrátok hidrolízisében (37. cikk)

A növényi sejtfal egyik leglényegesebb hemicellulóz komponense a xiloglükán, mely közvetlenül a cellulóz rostokkal asszociálva fordul elő. Kísérleti munkánkban azt vizsgáltuk, hogy miként befolyásolja a xiloglükánáz enzim adagolása a glükán illetve a xilán konverziót különböző eredetű, eltérő módon előkezelte, így különböző összetételű (más és más xilántartalmú) lignocellulózok enzim hidrolízisekor. A nyersanyagok között szerepelt keményfa és tűlevelű fa, különböző mezőgazdasági melléktermékek, illetve egy energianövény (zöld pántlikafű). A nyersanyagok egyetlen kivételtől eltekintve (nedves oxidációval előkezelte kukoricaszár) gőzrobbantással voltak előkezelve. A mosott minták (100% sz.a.) szénhidrát koncentrációit a 43. táblázat tartalmazza.

43. táblázat Szubsztrátok előkezelési körülményei és az előkezelte, mosott minták összetétele

Szubsztrát	Összetétel [a sz.a. tartalom %-ában]				
	Glükán	Xilán	Galaktán	Arabinán	Mannán
Fűzfa 195°C-on előkezelte	54,0	10,00	<0,1	<0,1	2,90
Fűzfa 200°C-on előkezelte	58,7	7,40	<0,1	<0,1	1,10
Fűzfa 210°C-on előkezelte	50,8	3,30	<0,1	<0,1	1,01
Gőzrobbantott kukoricaszár	71,8	7,40	0,70	0,20	<0,1
Nedves oxidált kukoricaszár	46,7	14,89	0,39	1,00	<0,1
Gőzrobbantott búzaszalma	61,5	3,25	<0,1	0,40	0,12
Gőzrobbantott fenyő	56,4	0,12	<0,1	<0,1	0,18
Árpa szalma 190°C-on előkezelte	63,5	12,10	0,28	0,69	<0,1
Árpa szalma 200°C-on előkezelte	64,3	5,81	<0,1	0,29	0,14
Zöld pántlikafű 195°C-on	55,2	9,58	0,32	0,77	0,32
Zöld pántlikafű 200°C-on	66,9	5,69	0,16	0,43	0,20
SF 200	93,0	7,00	0,00	0,00	0,00

Minden nyersanyagot egy un. alap celluláz enzimkeverékkel (ACE) hidrolizáltunk, melyben csak cellulózbontó aktivitással rendelkező enzimkomponensek szerepeltek (xilánáz vagy xiloglükánáz mellékaktivitással rendelkező enzimkomponensek nem). A segítő enzimek

hatását a celluláz enzimkeverék kiegészítésével nyert enzimkoktélokkal (ACE+XG; ACE+XL; ACE+XG+XL) teszteltük. A szubsztrátok teljes szénhidrát tartalmára vonatkoztatott konverziókat (48 óra) adja meg az 44. táblázat.

44. táblázat Alap celluláz enzimkeverék (ACE), valamint különböző segítő enzimekkel kiegészített celluláz enzimkeverék (ACE+XG; ACE+XL; ACE+XG+XL) hatására 48 órás hidrolízisben elért konverziók. A konverziók az előkezelt szubsztrát szénhidráttartalmára vonatkoznak

Szubsztrát	Konverzió össz-szénhidrát tartalomra vonatkoztatva [%]			
	ACE	ACE+XG	ACE+XL	ACE+XG+XL
Fűzfa 195 °C	14,2	13,7	20,6	21,2
Fűzfa 200 °C	23,3	25,4	29,7	29,1
Fűzfa 210 °C	37,8	38,1	41,3	40,2
Gőzrobbantott kukoricaszár	35,4	34,1	55,6	63,8
Nedves oxidált kukoricaszár	49,1	52,3	67,9	68,9
Gőzrobbantott búzaszalma	68,1	69,7	84,9	92,6
Gőzrobbantott fenyő	63,2	56,4	72,0	69,5
Árpaszalma 190 °C	32,7	39,5	59,6	60,6
Árpaszalma 200 °C	58,9	63,2	76,8	79,6
Zöld pántlikafű 195 °C	39,4	43,9	59,6	56,9
Zöld pántlikafű 200 °C	54,3	58,6	67,0	70,6
SF 200	59,2	59,9	90,7	91,6

A legtöbb xilán polimert a nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár, legkevesebbet a gőzrobbantott fenyő tartalmazta. Fűzfa esetén 195, 200 és 210 °C-on végzett előkezeléseknél a G/X arány a hőmérséklet emelésével nőtt: 5,4; 7,9; és 15,4. Minél erőteljesebb tehát az előkezelés, annál jobban sérül a hemicellulózok polimer szerkezete, a vízzoldható monomerek és oligomerek ugyanis az előkezelést követő mosással távoznak, így az előkezelt szubsztrát xilán tartalma csökken, a G/X arány nő.

Xiloglukanáz (XG) kizárólagos használatakor a segítő hatás nem minden nyersanyag esetén érvényesült (195 °C-on kezelt fűzfa, SPCS és SPS), a nagy maradék xilántartalommal (>9,5%) rendelkező szubsztrátok esetén a XG adagolásnak a SPW kivételével mindenütt jelentős pozitív hatása volt (6,5-21 %), ez alatt a xilántartalom alatt a hatás nem volt egyértelmű.

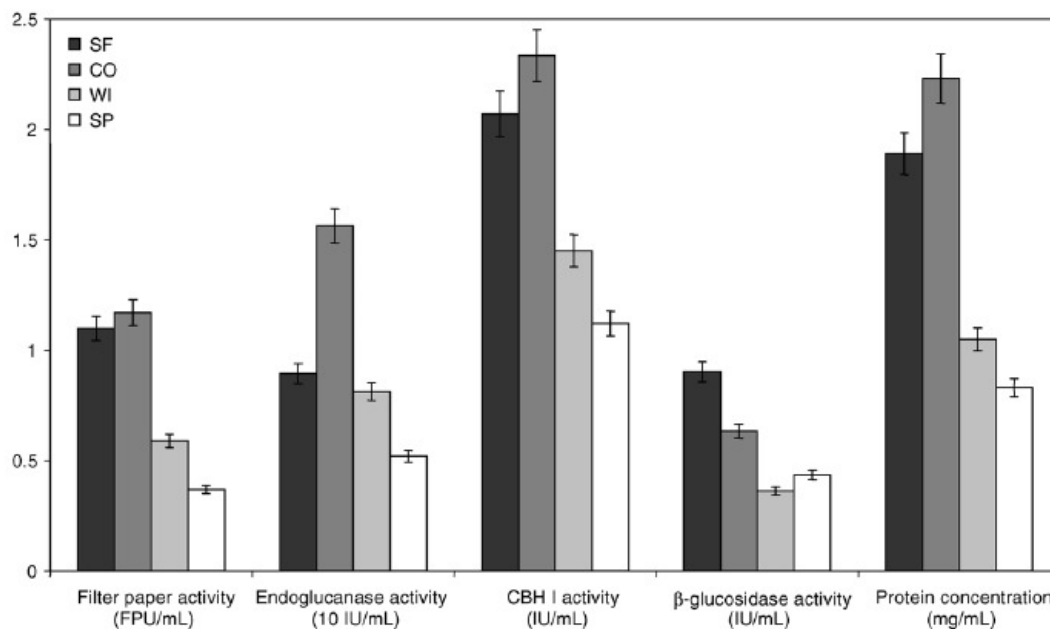
A xilanáz (XL), valamint a xilanáz+xiloglukanáz (XL+XG) együttes alkalmazása minden esetben javította a konverziót pusztán cellulázok alkalmazásához képest. A legjelentősebb hatást a SPCS, valamint a 190 °C-on gőzrobbantott árpaszalma szubsztát alkalmazásával értünk el (82, ill. 83%), a legkisebbet a SPS esetén, ahol a vizsgált anyagok közül a legkisebb hemicellulóz tartalmat határoztunk meg (43., 44. táblázat). SPW esetén, ahol három különböző előkezelési hőfok következtében három különböző xilántartalmú szubsztátot nyerünk jól követhető, hogy azonos szubsztráton belül, a xilántartalom emelkedésével nő a segítő enzimek konverziót növelő hatása.

A segítő enzimek (XL+XG) a lignocellulóz hidrolízisben valószínűleg azáltal fejtik ki segítő hatásukat, hogy a cellulóz rostokról eltávolítják az előkezelés során ott maradt hemicellulóz láncokat. Selig és mtsi. (2008). előkezelt kukoricaszár hidrolízisében xilanáz és észteráz enzimek adagolásával növelték a cellobiohidrolázok hatékonyságát. A hidrolízisben elért glükán és xilán konverziók abban az esetben voltak a legnagyobbak, ha xilanázt, ferulsav-észterázt és acetyl-xilán észterázt tartalmazott az enzimkeverék. A három segítő enzim kis mennyiségben történő adagolása hatékonyabbnak bizonyult (mg hidrolizált glükán/mg felhasznált fehérje), mint a CBH mennyiségének növelése. A cellulázok és segítő enzimek között fellelhető szinergizmust kihasználva csökkenthető a hidrolízisben alkalmazott összes enzimfehérje mennyisége, ami a folyamat gazdaságossága szempontjából lényeges.

5.3.2 Különböző szénforrásokon fermentált celluláz aktivitású fermentlevek és ipari enzimkészítmények vizsgálata lignocellulózok és tiszta cellulázok hidrolízisében

5.3.2.1 Cellulázok és hemicellulázok különböző szénforrásokon nyert fermentlevekben (38. cikk)

Különböző szénforrásokon más és más összetételű fermentlevek nyerhetők, melyek egyes szubsztrátokat eltérően hidrolizálnak (Olsson és mtsi., 2003). SPCS, SPW, SPS és SF szénforrásokon, rázatott lombikos fermentációban nyert fermentlé felulúsók jellemzésére 11 különböző celluláz, hemicelluláz és BGL aktivitást, valamint oldható fehérje tartalmat határoztunk meg (45. táblázat). A főbb aktivitásokat a 44. ábra mutatja be.



44. ábra Különböző szénforrásokon (SPCS, SPW, SPS, SF) nyert fermentlevek enzimaktivitásai (FPA, EG, CBH, BGL) és fehérjetartalma

Megállapítottuk, hogy az enzimkomplexek összetételét jelentősen befolyásolta a fermentációban alkalmazott szénforrás minősége. SPW és SPS szénforráson a kontroll SF-on elért FPA-nak csak 50, ill. 30%-át értük el, a SPCS-en viszont 4-5%-kal nagyobbat (7. nap). Ez az eredmény összefügghet a SPCS jobb bonthatóságával, valamint a SPW és SPS

előkezelésénél alkalmazott erőteljesebb körülmények között keletkező inhibitorok hatásával. A celluláz enzimkomplex teljes egészére jellemző FPA a CBH I-hez és az oldott fehérje tartalomhoz hasonló lefutású, ami várható volt, hiszen a *Trichoderma* enzimkomplex 55-60%-át a CBH I adja. Az endoglükánáz aktivitás SPCS szénforráson, a BGL aktivitás a kontroll SF szénforráson volt a legnagyobb. A 7 napos szaporítással nyert fermentlevek fehérjetartalmát és fajlagos aktivitás értékeit két ipari enzimek készítménnyel összehasonlítva tartalmazza a 45. táblázat. A különböző lignocellulózokon nyert fermentlevek és az ipari enzimek készítmények (Celluclast 1.5L, Econase CE) fajlagos celluláz aktivitása (FPA, EG, EG I, CBH I) közt nincs jelentős különbség, a BGL aktivitásnál illetve a különböző hemicellulázoknál viszont jelentősek az eltérések. A nagy xilán tartalmú szénforráson (SF, SPCS) nyert fermentlében nagy fajlagos xilánáz és xilobiáz aktivitást határoztunk meg. Az ipari enzimek specifikus BGL és néhány hemicelluláz aktivitása kisebb volt, mint a fermentleveké, a fajlagos acetil xilán észteráz aktivitásuk viszont jelentősen nagyobb.

45. táblázat Különböző szénforrásokon nyert fermentlevek fehérjetartalma és fajlagos enzimaktivitás értékei

Minták	Fermentlé felülúszók				Ipari enzimek	
	SF	SPCS	SPS	SPW	Celluclast	Econase
Fehérjetartalom [mg/ml]	1,89	2,23	0,83	1,05	125	110
Fajlagos enzimaktivitások:						
FPA [FPU/mg]	0,58	0,52	0,45	0,56	0,55	0,63
EG [IU/mg]	8,94	7,02	5,24	8,16	7,80	9,18
EG I [IU/mg]	0,25	0,23	0,22	0,32	0,28	0,40
CBH I [IU/mg]	1,10	1,05	1,35	1,38	1,03	1,00
BGL [IU/mg]	0,48	0,28	0,53	0,34	0,25	0,27
XYL [IU/mg]	119,1	64,6	12,2	52,1	6,0	15,4
MAN [IU/mg]	4,5	2,43	1,99	4,02	1,57	1,31
AXE [IU/mg]	0,33	0,09	0,02	0,13	0,85	0,46
α -GAL [IU/mg]	0,01	0,08	0,07	0,08	0,01	0,38
β -XYL [IU/mg]	0,75	0,21	0,16	0,21	0,14	0,17
α -ARA [IU/mg]	1,10	0,97	1,41	1,38	0,26	0,83

5.3.2.2 Tiszta cellulózok és lignocellulózok hidrolízise különböző szénforrásokon termelt cellulázokkal (39. cikk)

Aktivitásprofil és hidrolitikus hatékonyság szempontjából vizsgáltuk a *T. reesei* Rut C30 által három különböző szénforráson (SF, laktóz, SPCS I) termelt enzimet egy kereskedelmi forgalomban kapható enzimmal (Celluclast 1.5L) együtt. A volumetrikus enzintermelés tekintetében a két cellulóz szubsztrát hatékonyabbnak bizonyult, mint a laktóz, a laktózon termelt enzimkomplex viszont nagyobb BGL aktivitást mutatott.

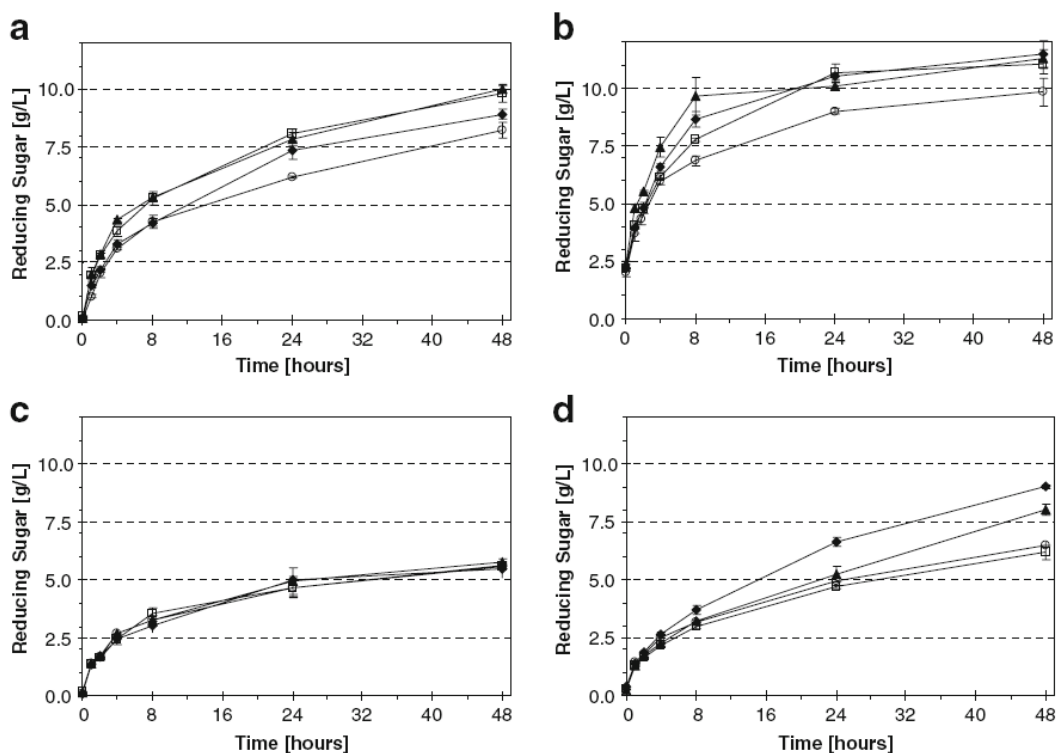
Az előállított enzimeket hidrolízis kísérletekben azonos FPA aktivitással (10 FPU/g szénhidrát; 10 mg/ml szénhidrát koncentráció; 45°C; pH 5,0; 5 ml térfogatban) négy

különböző szubsztráton teszteltük. Az adagolt FPA-nak megfelelő lényegesebb enzimaktivitások értékei a 46. táblázatban találhatók.

46. táblázat Számított enzimaktivitások a hidrolízis reakcióelegyekben

Enzimek	FPA [FPU]	HEC [IU]	BGL [IU]	XIL [IU]	AXE [IU]	BX [IU]
Celluclast	0,5	10,07	0,32	9,58	0,90	0,59
RutC30 SF-on	0,5	8,07	0,67	101,35	1,08	0,79
RutC30 laktózon	0,5	8,13	1,13	13,54	0,23	0,19
RutC30 SPSC-en	0,5	6,16	0,42	82,15	0,53	0,15

Az enzim hidrolíziseket két lignocellulózon (SPCS, SPS) és két modell szubsztráton (SF, Avicel) hajtottuk végre. A hidrolízis során képződött redukáló cukortartalmak a 45. ábrán láthatók.



45. ábra Enzim hidrolízis a termelt enzimekkel (T.r. RutC30 ▲: SF, ◆: laktóz, □: SPCS szénforráson) és ○: Celluclasttal (a) SF; (b) SPCS; (c) Avicel; (d) SPS szubsztráton

A SF hidrolízisekor a SF-on és a SPCS-en előállított enzimekkel értük el a legnagyobb redukálócukor tartalmakat. A SF-on előállított enzimmel hidrolizáltuk legjobban a SPCS-t, ami valószínűleg a gyors xilán hidrolízisnek köszönhető. Az Avicel hidrolízisekor csak kis különbségek mutatkoztak a különböző enzimkomplexekkel végzett hidrolízisek lefutásában, úgy tűnik Avicel esetében az azonos FPA alapon történő enzimadagolás azonos hidrolízist

eredményez, a BGL nem befolyásolta a hidrolizálhatóságot. SPS szubsztráton a laktózon termelt enzim biztosította a legnagyobb kezdeti hidrolízis sebességet és a legjobb 48 órás glükánkonverziót is.

A SF és az Avicel nem tartalmaz lignint, a különbség a szénhidrát összetételben (az Avicel tiszta cellulóz, a SF jelentős (15%) xilán tartalommal rendelkezik), és a cellulóz szerkezetében (az Avicel mikrokristályos cellulóz, a SF jelentős hányada amorf) jelentkezik (Wood, 1997). Ez a különbség nemcsak a hidrolízisben elért cukortartalomban mutatkozik meg (az Avicel-en a SF-on mértnek mintegy 42%-át értük el), de az is látszik, hogy a hemicellulózt is tartalmazó SF hidrolízisekor nagyobb a jelentősége az enzimkomplex összetételének, míg a nehezen bontható Avicel bontásakor a cellulázok aktivitása a sebesség és konverzió meghatározó.

A 47. táblázat a 48 órás hidrolízis alatt elért glükán és xilán konverziókat foglalja össze.

47. táblázat Glükán és xilán konverziók a SF, az Avicel, a SPCS és SPS enzim hidrolízisekor (48 óra)

Konverzió [%]	Szubsztrátok	Ipari enzimmel	Termelt enzimekkel		
		Celluclast	SF-on	Laktózon	SPCS-on
Glükán konverzió	SF	62,8	73,2	73,3	61,7
	SPCS	55,9	75,1	80,6	65,9
	Avicel	44,3	50,4	51,8	45,4
	SPS	32,7	48,2	59,8	31,6
Xilán konverzió	SF	62,2	74,6	30,2	88,2
	SPCS	59,8	71,8	63,2	68,9

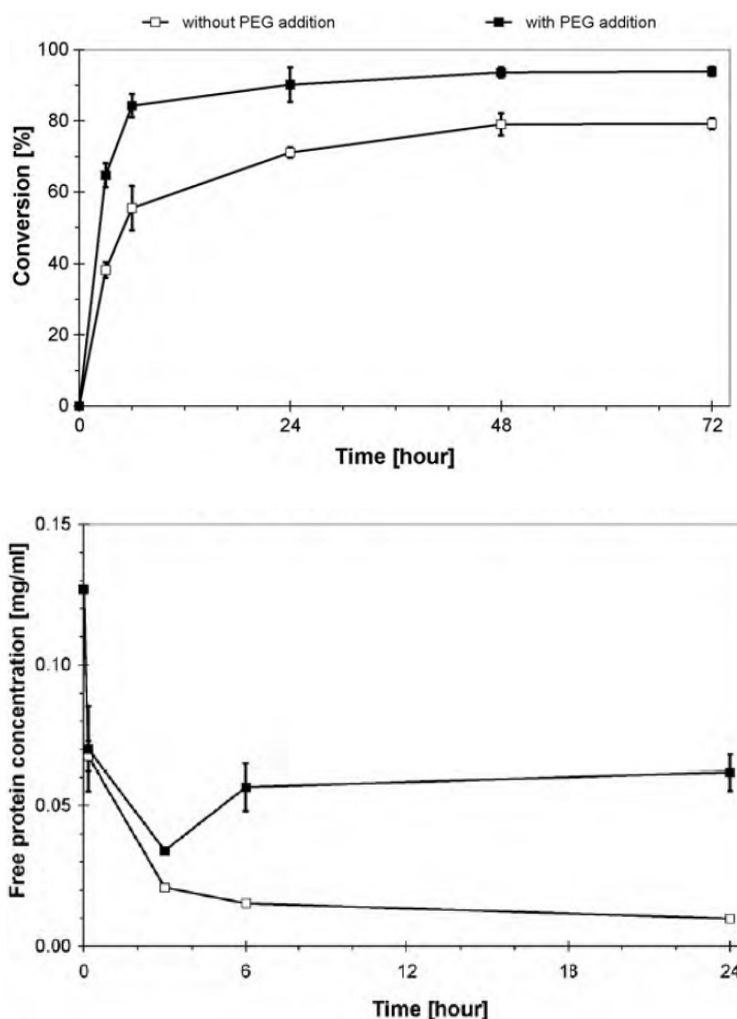
A maximális glükán konverziót valamennyi szubsztrátnál a laktóz szénforráson termelt enzimkompleksszel értük el, ami a nagy (1,7-3,5-szeres) BGL aktivitásnak köszönhető. A xilán konverziót egyértelműen a xilanáz aktivitás határozza meg, a legjobb xilán bontást SF és SPCS szubsztrátokon az ezeken a szénforrásokon fermentált enzimekkel értük el (68,9-88,2%). Kísérleteinkkel nem sikerült bizonyítanunk Olsson és mtsi. (2003) feltételezését, mely szerint az azonos szénforráson termelt enzim eredményezi a leghatékonyabb szénhidrát konverziót, de azt bizonyítottuk, hogy a hatékony xilán bontás csak olyan fermentlével lehetséges, melyet xilán tartalmú szénforráson állítottunk elő. A hidrolitikus hatások vizsgálata azt mutatta, hogy a glükán konverzióra a BGL, míg a xilán konverzióra a BGL és xilanáz enzimeknek volt szignifikáns hatása.

5.3.3 PEG adagolás hatása a lignocellulózok enzim hidrolízisére és a celluláz komponensek adszorpciójára

(40. cikk)

Korábbi kísérletek kimutatták, hogy gőzrobbantott lucfenyő enzim hidrolízisére jótékony hatással van a poli-etilén-glikol (PEG) adagolása. Egyedi enzimkomponensek izolált ligninen történő adszorpciójának vizsgálata azt mutatta, hogy ez a jótékony hatás az enzimek ligninen történő nem-produktív adszorpciójának megakadályozásában rejlik (Börjesson és mtsi., 2007). Kísérleteink során ezt a hatást kívántuk igazolni vagy elvetni valós körülmények

között végrehajtott hidrolízisben, gőzrobbantott fenyőfa szubsztrát (SPS) és teljes enzimkomplex felhasználásával (46. ábra). PEG adagolás hatására a 72 órás hidrolízis glükán konverziója 81%-ról 96%-ra emelkedett.

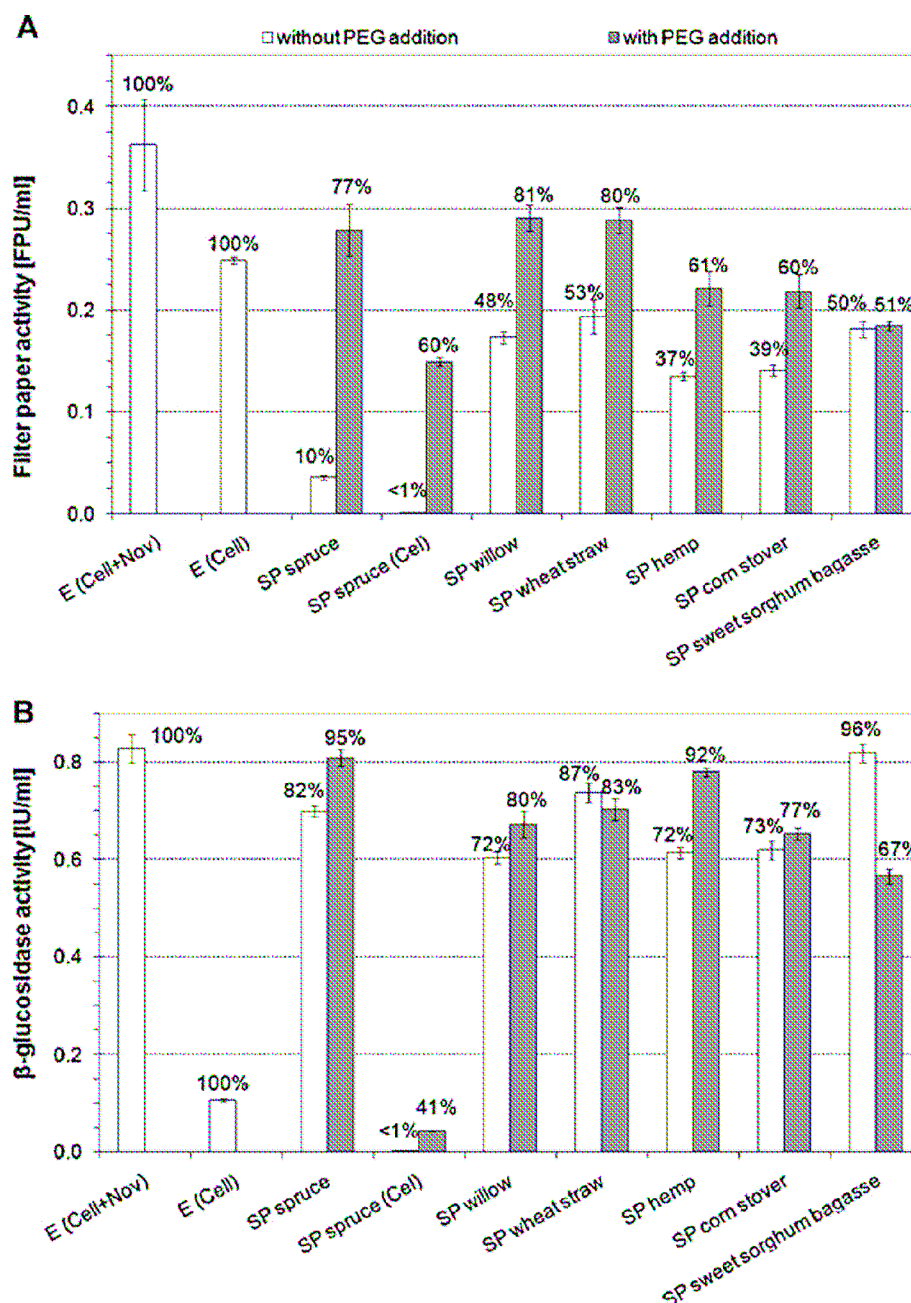


46. ábra SPS hidrolízise PEG adagolással (■) és PEG nélkül (□), glükán konverzió és oldható fehérjetartalom a hidrolízis idő függvényében

A beadagolt (enzim)fehérje 50%-a pillanatszerűen adszorbeálódott a szubsztráton, majd 3 óra alatt 85%-ra, 24 óra alatt 92%-ra növekedett az adszorbeálódott fehérje mennyisége. PEG alkalmazásakor a hidrolízis 3. órájáig folytatódott az adszorpció, majd a hidrolízis előrehaladtával a felülúszóban mérhető fehérjetartalom lassan növekedett, s a 24. órára 43-45%-on stabilizálódott. A hidrolízis alatt különböző enzimaktivitásokat mértünk a hidrolízis minták felülúszóiban, a görbék lefutása hasonló volt a fehérjetartaloméhoz. A 72 órás hidrolízis végén fehérjetartalmat, FPA, BGL és EG aktivitásokat határoztunk meg, a legszembetűnőbb enzimaktivitás csökkenést a referencia kísérletekben az össz-celluláz aktivitás (FPA) esetében tapasztaltuk, ahol a kiindulási FPA 95%-a „veszett el” a 72 órás hidrolízis végére (az enzim veszteség már a hidrolízis 3. órájában is 90% volt), ezzel szemben PEG adagolás hatására a hidrolízis végén a kiindulási FPA érték 56%-át tudtuk meghatározni

a felülúszókban. A 72 órás hidrolízis felülúszók kvantitatív gélelektorforetikus vizsgálata azt mutatta, hogy a cellobiohidroláz adszorpció az FPA adszorpcióval mutat korrelációt. A szubsztrát ligninszerkezetének ^{31}P -NMR-rel történő vizsgálata nem mutatott szerkezeti változást a PEG adagolás hatására, ami arra enged következtetni, hogy a PEG a lignin szerkezetén gyenge, fizikai kölcsönhatással adszorbeálódott.

A PEG hatást vizsgáltuk más gőzrobbantással előkezelt lignocellulózokon is. A 47. ábra az FPA (A) és a BGL (B) aktivitások alakulását mutatja PEG adagolással, illetve anélkül SPS, SPSSB, SPCS, SPH, SPW és SPWS szubsztrátok alkalmazásakor (Sipos és mtsi., 2011).



47. ábra Szabad FPA (A) és BGL (B) aktivitások 72 órás hidrolízis után különböző előkezelt szubsztrátokon PEG adagolással és anélkül

A különböző szubsztrátok nagyon eltérően viselkedtek, a PEG enzimadszorpciót (FPA) csökkentő hatása a SPS esetében volt a legjelentősebb, míg SPSSB esetében egyáltalán nem jelentkezett. A SPW és SPWS a SPS-hoz hasonlóan viselkedett, PEG hatására az enzimadszorpció 19-23%-ra csökkent. A különbség a PEG adszorpciót csökkentő hatásának mértékében volt. A BGL adszorpció korábbi méréseink szerint PEG adagolás nélkül sem volt jelentős, így a PEG hatás sem volt lényeges.

Az irodalom nagyon ellentmondó a BGL adszorpcióját illetően. Yang és Wyman (2006) valamint Sutcliffe és Saddler (1986) a BGL jelentős adszorpcióját tapasztalta lignocellulózokon, míg Lu és mtsi. (2002), Puls és mtsi. (1985), valamint Berlin és mtsi. (2006) a mi eredményeinkhez hasonlóan kevésbé jelentős BGL adszorpcióról számoltak be. A kérdés tisztázása érdekében a SPS hidrolízisét *Aspergillus* eredetű BGL kiegészítés nélkül is elvégeztük (csak Celluclast enzimkészítménnyel). Abban az esetben (47. ábra), ha csak *Trichoderma* eredetű enzimet alkalmazunk a hidrolízisben (az ábrán SPS without Nov), a BGL adszorpció jelentős (99%-os), s a PEG adagolás erőteljesen (59%-ra) csökkentheti az adszorpciót. Ezek szerint a jelentős BGL adszorpció a *Trichoderma* enzimek jellemzője, míg a kevésbé hangsúlyos adszorpció az *Aspergillus* eredetűek sajátja. Miután a publikációkban nem minden esetben jelzik a BGL eredetét, egymásnak látszólag ellentmondó eredmények születnek az adszorpciót illetően.

5.4 Etanol és biohidrogén fermentatív előállítás

A lignocellulózok felhasználásának potenciális lehetősége sokkal nagyobb, mint az a kis szegmens, melyet kutatócsoportommal vizsgáltunk. Kutatómunkánk során elsősorban etanol fermentációval foglalkoztunk. Egyetlen európai uniós projekt (QLK5-1999-01267) keretében vizsgáltuk a biohidrogén előállítás lehetőségét, a hollandiai Wageningeni Egyetem Agrotechnológiai Kutatóintézetével együttműködve, amikor is célunk egy papírgyártási hulladék, a különben deponálásra kerülő papíriszap hasznosítása volt.

5.4.1 Biohidrogén fermentáció

(41., 42. cikk)

A hidrogén előállításának költsége jelentősen csökkenthető, amennyiben olcsó, nagy mennyiségben rendelkezésre álló nyersanyagból állítjuk elő. A papíriszap a papírgyártás hulladéka, azokat a finom rostokat tartalmazza, melyek már nem alkalmasak papírkészítésre, s melynek kezelése, elhelyezése a mai napig nem megoldott. Nagy szénhidrát tartalma (50-60%) enzim hidrolízis után alkalmassá teheti hidrogénfermentáció szénforrásának. Kísérleti munkánk során *T. elfii*, *T. neapolitana* és *C. saccharolyticus* anaerob fermentációját vizsgáltuk különböző táptalajokon (részletes eredmények: Kádár és mtsi., 2003). Mindhárom mikroorganizmus képes volt papíriszap hidrolizátumon hidrogén termelésre, azonban tápanyag igényük nagyon különböző volt. A *T. elfii* hidrogén termelésére szignifikáns hatással volt az élesztőextrakt, hiányában hidrogén nem termelődött. Az élesztő extrakt hiánya nem volt hatással a *C. saccharolyticus* hidrogén termelésére, így a továbbiakban ezt vizsgáltuk analitikai tisztaságú cukrokat (glükóz és xilóz), illetve ezen cukrokat tartalmazó papíriszap hidrolizátumot tartalmazó táptalajon. A fermentációs idő függvényében mértük a cukor fogyást, valamint a hidrogén, acetát és laktát képződést. Részletes eredményeinket Kádár és mtsi. (2004) cikke tartalmazza. Kísérleteink célja, a nagy hozam és nagy hidrogén képződési sebesség elérése a papíriszap hidrolizátumon, csak részben teljesült, a hozam jobb volt, mint a kontroll kísérletekben (valószínűleg a papíriszap hidrolizátumban jelenlevő, de

nem mért celooligószok hasznosítása következtében), a hidrogén képződési sebesség viszont csak 47-58%-a volt a glükózt és xilózt tartalmazó kontrollnak.

5.4.2 Etilalkohol fermentáció

A különböző előkezelések értékelésénél általánosan alkalmaztuk az SSF-et az előkezelés hatékonyságának meghatározására, ekkor előre meghatározott standard körülmények között, vizsgáltuk az etanol termelést.

Ebben a fejezetben néhány, az etanol fermentációval kapcsolatos olyan munkánkról számolok be, ahol a szubsztrátkoncentráció növelésével, az alkalmazott enzimdózis hatásának vizsgálatával, az SSF/SHF összehasonlításával foglalkoztunk. Külön fejezetben tárgyalom a termotoleráns élesztők vizsgálatával elért eredményeinket.

A szakirodalom által a gazdaságos betöményítés szempontjából minimumnak tartott 5% (V/V) etanolkoncentráció elérését nemcsak a szubsztrát koncentráció növelésével, vagy fed-batch SSF alkalmazásával, de az első és második generációs etanol előállítás integrálásával is vizsgáltuk.

5.4.2.1 *Etanolképződés valós idejű detektálása*

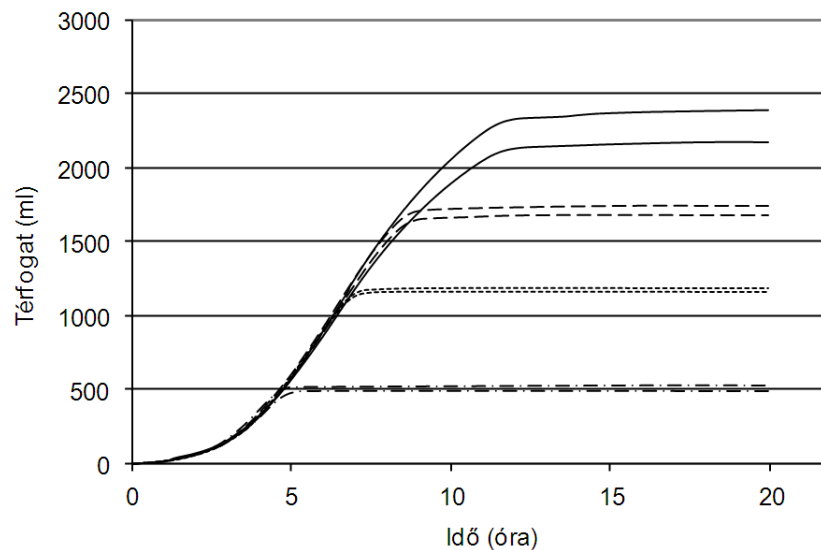
(43. cikk)

Miután a különböző szubsztrátok etanolpotenciáljának, az előkezelések jóságának, a hidrolizátumok erjeszthetőségének meghatározása nagy számú minta esetén nagyon időigényes munka, kifejlesztettünk egy olyan módszert, mellyel jól reprodukálható körülmények között nyolc párhuzamos erjesztést tudunk kivitelezni és detektálni egyidejűleg. Egy mol glükóz lebontása során 2 mol etanol és ugyanennyi széndioxid képződik, ez az alapja az etanolképződés valós idejű detektálásának. A keletkező gáz mennyiségének mérésére viszonylag egyszerű, olcsó, nagyobb mennyiségű gáz mérésére alkalmas automatizálható módszer a folyadék kiszorításos mérés. Ennek továbbfejlesztése, amikor elektródák detektálják a folyadékszint változását (Veiga és mtsi., 1990). Az általunk kiépített online fermentációs modul (48. ábra) a Veiga féle berendezésen alapul. A rendszer alapvetően két részből áll, a tényleges mérést végző mérőberendezésből, valamint a jelfogadó és jelfeldolgozó szoftverből. Egyszerre nyolc minta párhuzamos mérése lehetséges. Az egész lelke a speciális kiképzésű üvegedény, edényenként egy pár elektróddal, ami létrehozza a mérőjelet. Továbbítás után az elektromos jel a nyomtatóporton keresztül jut a számítógépbe.

A módszer előnye, hogy nincs felső határa a mérhető kumulált térfogat mennyiségnek és eredményként, grafikon formában azonnali adatokat kapunk a fermentáció állapotáról. Egy a Stereo Vision Kft.-től származó szoftver dolgozza fel a beérkező nyers adatokat: tárolja és megjeleníti a gáz térfogat – eltelt idő valós idejű grafikont. A mérés lezárása után a program képes az adatok exportálására Excel formátumba, így az eredmények további feldolgozása nem jelent problémát. Teszt méréseinket 20, 40, 60 és 80 g/l koncentrációjú glükóz oldatokkal végeztük, a felvett grafikonon (49. ábra) jól kirajzolódnak a szubsztrát koncentráció különbségei. A fermentáció befejeztével, HPLC-vel mértük, illetve egy, a tökéletes gáztörvényre épülő tapasztalati képlettel – a mért gáztérfogat értékek felhasználásával – határoztuk meg az etanol koncentrációkat.



48. ábra Online fermentációs modul működés közben



49. ábra Mérési eredmények az online fermentációs modullal, 20 (---), 40 (....), 60 (-.-) illetve 80 (—) g/l kezdeti glükóz koncentrációk esetén, mintánként két párhuzamos méréssel

További kísérleteink, melyeket glükóz szénforrást tartalmazó szintetikus táptalajon, cukorciroklén, valamint SPSSB-on végeztünk (Fehér és mtsi., 2010) azt mutatták, hogy a rendszer megbízhatóan működik, a fermentáció valós idejű detektálására tökéletesen alkalmas, de az etanol koncentrációra történő átszámítás hibával terhelt, átlagosan 7% körüli az eltérés a HPLC és a képlettel számított eredmények közt.

5.4.2.2 Az előkezelésekkel kapcsolatban végzett SSF kísérleteink

Lúgosan előkezelt kukoricarost hasznosításának SSF eredményeit a 20. táblázat (5.1.2.1. fejezet) tartalmazza, a glükán koncentrációra számított elméleti etanolhozam 90-97%-át sikerült elérnünk, szemben a keményítőmentes rostos (DCF) és a SF-on elért 24,1 és 53,6%-os hozammal.

Gőzrobbantással előkezelt kender és kendersizilázs SSF eredményeit a 20. ábra mutatja be (5.1.4.2 fejezet). Az előkezelt zagy szétválasztása, különösen a gőzrobbantott kendersizilázs esetében javította az erjesztés hatékonyságát (33%-kal), ez jó egyezést mutat Palmqvist és Hägerdahl (2000b) eredményeivel, akik a szerves savak etanolfermentációra gyakorolt inhibíciós hatásáról számoltak be. Az elválasztott szilárd frakcióval végzett kísérletekben kendernél 21,3 g/l, kendersizilázsánál 20,3 g/l etanolkoncentrációt és 17,1 g/100 g kenderkóró és 16,3 g/100 g kendersizilázs etanol hozamokat értünk el, melyek 190-220 l/t etanol hozamnak felelnek meg.

Gőzrobbantással előkezelt kenderpozdorja SSF eredményei a 23. ábrán láthatók (5.1.4.3. fejezet). Az előkezelt minták glükán+mannán tartalmára vonatkoztatott elméleti értékek százalékában 64-70% közötti etanol hozamot értünk el. A leghatékonyabb előkezelést követő SSF 14,1g etanol/g kenderpozdorja kihozatalt eredményezett.

5.4.2.3 A szubsztrát és celluláz koncentráció hatása SPS egyidejű hidrolízisére és fermentációjára (44. cikk)

SPS szubsztrát alkalmazásával vizsgáltuk a szubsztrát és az enzimkoncentráció hatását az etanol hozamra és a produktivitásra (48. táblázat).

48. táblázat Etanol hozamok különböző szubsztrát koncentrációknál és E/S arányoknál

Celluláz aktivitás [FPU/g cellulóz]	Szubsztrát [% sz.a.]	EtOH hozam az eredeti nyersanyagra		EtOH hozam az SSF-ben [az elméleti max. %-a]
		[g/100g]	[az elméleti max. %-a]	
5	2	11,4	35	42
5	5	14,8	45	54
5	7,5	14,4	44	53
10	2	14,1	43	52
10	5	18,1	55	66
21	2	18,8	57	69
21	5	20,4	62	75
21	7,5	10,6	32	39
32	2	20,3	62	74
32	5	22,4	68	82
32	7,5	19,7	60	72

Az etanol hozam emelkedett az enzimadagolás növelésével, s a legnagyobb alkalmazott enzimdózisnál értük el a maximumot, a vizsgált tartományban nem értük el a telítési értéket.

A legnagyobb etanolhozamot, az elméleti maximális érték 68%-át (az eredeti fában levő glükán és mannán tartalom alapján), 5% szubsztrát koncentrációnál érték el, ekkor az SSF hozam 82%-a volt az elméleti maximumnak (az SPS glükán + mannán tartalmára vonatkoztatva). Nagyobb szubsztrát koncentrációk alkalmazásakor nem volt megfelelő hatékonyságú az erjesztés, kisebb szubsztrát koncentráció alkalmazásakor (2%) pedig a jelentős tejsav képződés csökkentette az etanol hozamot. Az SSF-et félsteril körülmények között (az enzimeket nem sterilizáltuk) *S. cerevisiae* steril tenyésztéssel oltottuk éppen a tejsavbaktériumokkal történő befertőződés megakadályozása érdekében (Wyman és mtsi., 1992). Ennek dacára tejsavképződést 5% szubsztrátkoncentráció alkalmazásakor is tapasztaltunk az 55. órától. Lemareshquier, (1987) valamint Narendranath és mtsi., (1997) a *S. cerevisiae* tejsavbaktériumok szaporodását iniciáló képességéről számolnak be, mely egyrészt az inhibitorok átalakításával, másrészt a tejsavbaktériumok számára fontos anyagok (tiamin) kiválasztásával magyarázható. Megfigyelésünk szerint a tejsavbaktériumok elszaporodása az élesztő autolízisével hozható összefüggésbe. 7,5% szubsztrát koncentrációnál egyáltalán nem tapasztaltunk tejsavképződést, viszont az etanolfermentáció hozama és megbízhatósága romlott, valószínűleg a nagyobb szubsztrát mennyiségével bevitt nagyobb inhibitor koncentráció következtében. Ezt a feltételezésünket támasztja alá az a tény, hogy a szubsztrát koncentrációt 10%-ra tovább növelve egyáltalán nem tapasztaltunk sem etanol-, sem tejsavképződést, pedig az enzim hidrolízis következtében volt erjeszthető cukor a reakcióelegyben.

Szeparált hidrolízis és erjesztéshez viszonyítva az SSF 50%-kal nagyobb hozamot eredményezett, a produktivitás pedig megduplázódott, ezzel együtt nem egyértelmű az SSF prioritása az SHF-fel szemben. Az SSF legnagyobb hátránya a befertőződés veszélye, mely lehetetlenné teszi a folytonos fermentációt, másik hátránya, hogy az élesztőrecirkuláció nem megoldható, miután az élesztő a ligninnel együtt alkotja a szilárd fázist.

5.4.2.4 Etanolfermentáció alacsony pH-n inhibitorok jelenlétében

(45. cikk)

Az üzemanyag célú etanolfermentáció csak úgy képzelhető el gazdaságosan, ha nem steril körülmények között hajtjuk végre. A bakteriális befertőződés elkerülése érdekében a pH-t a fermentáció alatt alacsony értéken (pH 4,0-5,0) kell tartani, ez viszont kedvezőtlen az inhibitorok, különösen az ecetsav hatása szempontjából (Palmqvist és Hägerdahl, 2000b).

Egy inhibitor toleráns élesztőtörzset (*Saccharomyces cerevisiae* ATTC 26602) pH 4,0-en vizsgáltunk különböző eredetű hemicellulóz hidrolizátumokon, úgy, hogy az eredeti cellulózzrostnak megfelelő glükózt (100% glükán konverziót feltételezve) adagoltuk a táptalajokba. Kísérleteink során SPS, SPW, SPW(+SO₂), SPCS I hemicellulóz frakcióját (HH) használtuk fel (49. táblázat).

Kísérleteinkkel nem a cellulózkonverziót, hanem kizárólag az előkezelés (gőzrobbantás) során keletkező inhibitorok hatását kívántuk tesztelni, s azt eldönteni, hogy az egyes HH-okat milyen koncentrációban lehet alkalmazni az erjesztési sebesség drasztikus csökkenése nélkül (50. táblázat).

A 0,42-0,49-es hozamok (az elméleti maximum érték 82-96%-a) nagyon nagyok, miután a kísérletekben nem volt „valós” cellulóz hidrolízis, ugyanis a cellulóztartalomnak megfelelő glükózt adagoltuk a reakcióelegyekbe. A gőzrobbantott kukoricaszár HH-át csaknem 100%-ban, míg a két fa nyersanyag (SPW; SPS) HH frakcióját csak 50-65%-ban tudtuk alkalmazni a fermentációs lag szakasz jelentős megnövekedése nélkül. Adaptációs kísérletekkel csak mérsékelten és korlátozott ideig tudtunk az élesztő inhibitor tűrésén javítani.

49. táblázat Gőzrobbantással előkezelt nyersanyagok összetétele

Minta	SPCS	SPW - SO ₂	SPW + SO ₂	SPS
Előkezelt zagy (whole slurry) [%]				
Nedvességtartalom	89,97	81,39	75,3	76,24
Vízoldható frakció	3,39	4,52	8,93	8,34
Cellulóz tartalom	4,12	9,05	10,91	8,95
Folyadék frakció (liquid fraction) [g/l]				
Cellobióz	0,16	0,4	1,4	3,0
Glükóz	2,54	1,7	10,5	40,2
Mannóz	-	-	-	35,8
Xilóz	12,9	3,7	28,1	-
Arabinóz	1,35	0,17	0,67	0,9
Hangyasav	0,7	1,36	1,57	2,4
Ecetsav	1,59	8,24	9,34	6,8
Levulánsav	-	-	-	1,7
HMF	0,04	1,18	1,38	5,0
Furfurol	0,16	2,66	2,03	3,3

50. táblázat Etanolfermentáció eredményei glükóz és HH tartalmú táptalajokon

Szubsztrát (HH)		Sz.a. tartalom	Végső etanol konc.	Hozam
	[Maximális % (V/V)]	[%]	[% (V/V)]	[%]
SPS	50	11,9	4,53	0,42
SPCS	94	9,4	2,73	0,44
SPW (-SO ₂)	64	11,9	4,09	0,48
SPW (+SO ₂)	65	16,6	5,74	0,49

5.4.2.5 Különböző *Kluyveromyces* törzsek tesztelése SSF céljára (46., 47., 48. cikk)

Ha gőzrobbantással előkezelt fát vagy egyéb lignocellulózt, például papíripari hulladékot kívánunk SSF-ben etanollá konvertálni, az alkalmazott élesztőnek nemcsak termotoleránsnak, hanem inhibitor toleránsnak is kell lennie. Munkánk során öt különböző törzset teszteltünk erre a két tulajdonságra, három *Kluyveromyces marxianus* és két *Kluyveromyces thermotolerans*. A kísérleteket mind glükóz szénforrást tartalmazó táptalajon, mind az inhibitorokat tartalmazó folyadékfázison (SPS HH) lefolytattuk rázatott lombikokban és szilárd agarlemezekeken egyaránt. Ráztatott lombikos kísérleteinkben aerob fermentációban 35 és 45°C-on vizsgáltuk a glükózhasznosítást és a sejttömeg képződést (51. táblázat).

51. táblázat Különböző *K. marxianus* élesztőtörzsek glükózhasznosítása (50 g/l kiindulási glükóz koncentráció) 35 és 45°C-on

Élesztőtörzs	Szaporítási hőmérséklet [°C]	Glükóz koncentráció [g/l]			Képződött sz.a. [g/l]
		0. óra	10. óra	18. óra	
<i>K. marxianus</i>	35	50	0,9	0,9	4,8
Y 01070	45	52	5,2	1,1	3,0
<i>K. marxianus</i>	35	51	0,8	0,8	5,1
Y 00243	45	54	20,2	13,5	1,9
<i>K. marxianus</i>	35	46	0,9	1,0	4,1
Y 00242	45	51	27,2	18,1	1,7
<i>K. thermotolerans</i>	35	51	31,8	22,3	3,4
Y 00773	45	48	49,9	52,6	0
<i>K. thermotolerans</i>	35	50	37,0	30,2	4,2
Y 00798	45	50	49,4	51,0	0,3
<i>S. cerevisiae</i>	35	51	8,2	0,8	4,8
(pékélesztő)	45	50	48,5	48,7	1,0

A vizsgált termotoleráns törzsek közül glükóz hasznosítás és sejttömeg termelés szempontjából a *K. marxianus* Y 01070 bizonyult a legjobbnak, egyedül ez a törzs volt képes 45°C-on elfogyasztani a beadagolt cukrot, s szárazanyag termelése ezen a hőfokon elérte a 35°C-on mért érték 62,5%-át. Agarlemezen lefolytatott kísérleteink alapján is a *K. marxianus* Y 01070 volt a leginkább termotoleráns, de ez a törzs az inhibitorokat egyáltalán nem tolerálta.

Az élesztőtörzsek inhibitor tűrését először fermentációs teszttel vizsgáltuk 25 ml-es lombikokban a gőzrobbantással előkezelt lucfenyő (SPS) folyadék frakcióján (HH) illetve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -dal méregtelenített szűrleten 42°C-on, hogy kiválasszuk az inhibitorokat és a nagy hőmérsékletet leginkább toleráló élesztőtörzset. SPS folyadék frakciójának összetétele: 13,3 g/l glükóz, 3,0 g/l arabinóz, 25 g/l xilóz+galaktóz+mannóz, 0,8 g/l furfural, 1,7 g/l HMF, 4 g/l ecetsav. Az 52. táblázat SPS szűrleten, illetve detoxifikált szűrleten végzett erjesztési teszt eredményeit tartalmazza.

Miután a *S. cerevisiae* és a *K. marxianus* Y 00243 mind az eredeti hemicellulóz hidrolizátumon, mind a méregtelenítetten viszonylag jól teljesített, SSF kísérleteinkben ezt a két törzset vizsgáltuk.

Az SSF kísérleteket 37 FPU/g glükán + 38 IU BGL/g glükán adagolással 1 literes bioreaktorokban hajtottuk végre úgy, hogy az SPS zagyot 5%-osra hígítottuk (53. táblázat).

52. táblázat Erjesztési teszt SPS folyadékfrakción (HH), és detoxifikált folyadékfrakción (DHH) 42°C-on

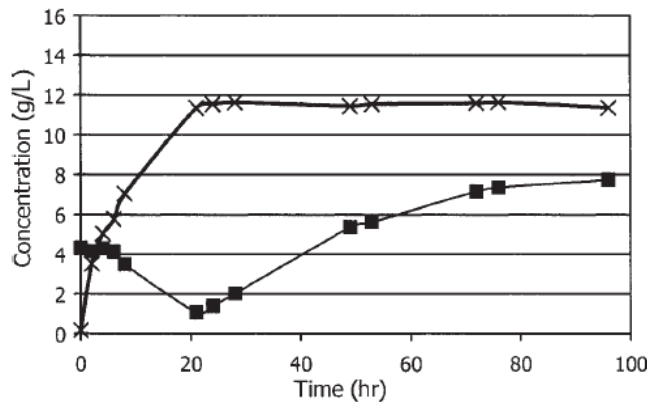
Élesztőtörzs	Szubsztrát	Ferm. idő [óra]	C _{glükóz} [g/l]		C _{xil+gal+man} [g/l]	C _{EtOH} [g/l]
			kiind.	maradék	maradék	max.
<i>K. marxianus</i>	HH	8	18,1	0,8	34	6,3
Y 00243	DHH	8	16,6	0,7	34	6,7
<i>K. marxianus</i>	HH	6	19,3	4,6	65	4,9
Y 01070	DHH	24	17,0	0,5	44	7,5
<i>K. marxianus</i>	HH	3	20,3	12,6	74	3,7
Y 00242	DHH	24	16,5	0,5	35	7,4
<i>S. cerevisiae</i>	HH	14	15,3	0,0	44	5,9

53. táblázat 42°C-os SSF-ben *K. marxianus* Y 11243 és *S. cerevisiae* élesztőtörzsekkel elért hozamok SPS és detoxifikált SPS szubsztrátokon

Élesztőtörzs	Inokulum	Szubsztrát	pH	Etanol hozam	
			szabályozás	[g/100g sza.]	[% elméleti max.]
<i>K. marxianus</i>	friss	SPS	+	5,5	17
Y 11243	1 napos	SPS	+	7,7	24
	1 napos	detoxifikált SPS	+	10,5	33
	friss	SPS	-	13,9	44
	1 napos	detoxifikált SPS	-	10,3	33
<i>S. cerevisiae</i>	száraz	SPS	+	16,4	52

A kontroll *S. cerevisiae* teljesített a legjobban, SPS szubsztráton (méregtelenítés nélkül) 16,4 g/100g sz.a. etanolt értünk el, ami az elméleti hozam 52%-a. A *Kluyveromycesek* közül a legjobb eredményt, 13,9 g/l etanol koncentrációt, az elméleti hozam 44%-át, olyan kísérletben értük el, ahol nem alkalmaztunk sem detoxifikálást sem pH állítást. A pH állítás nélküli kísérletekben a pH a kezdeti 4,8-ról 5,2-5,3-ra emelkedett, mely csökkentette az ecetsav toxikus hatását. Ez jó egyezést mutat Palmqvist és Hahn-Hägerdahl, (2000b) eredményeivel, akik *S. cerevisiae* esetében számoltak be a pH emelésének az ecetsav toxikusságát csökkentő hatásáról. Valamennyi SSF kísérletben a glükóz felhalmozódás jelentős volt (50. ábra), ami azt jelenti, hogy sem a detoxifikált sem az eredeti gőzrobbantással előkezelt lucfenyő zagy szénforráson nem volt képes a *K. marxianus* Y 00243 42°C-on 10 illetve néhány esetben 20 órán túl erjesztetni a keletkező glükózt, míg az enzimes hidrolízis a kísérletek végéig (96-140 óra) folytatódott. Korábbi munkánkban (Stenberg és mtsi., 2000) *S. cerevisiae* élesztőtörzsszel 37°C-on lefolytatott SSF kísérletben 5% szubsztrátkoncentráció (SPS) alkalmazásakor nem volt mérhető cukortartalom a reakcióelegyben, az alkoholképződés pedig a 60-80. óráig folytatódott. Ez a különbség *S. cerevisiae* esetében egyértelműen a jelen

kísérletünkben alkalmazott, számára nem optimális magas hőmérséklettel (42°C), *K. marxianus* Y 00243 esetében pedig inhibitor érzékenységgel, vagy csak korlátozottan termotoleráns létével magyarázható.



50. ábra Glükóz (■) és etanol (x) koncentráció az SSF során friss *K. marxianus* Y 00243 inokulummal pH szabályozás nélkül SPS szubsztráton

Ipari hulladékok etanolfermentációra történő felhasználása előkezelés nélkül történt. Szubsztrátként hulladékpapírt, papíriszapot és összehasonlításként SF-ot alkalmaztunk 6% koncentrációban, melyeket ipari enzimekkel hidrolizáltunk (15 FPU/g sz.a és 15 IU BGL/g sz.a. aktivitás dózis). Az SSF kísérleteket *S. cerevisiae*-vel, ill. *K. marxianus* Y 01070-nel - mely törzs korábbi vizsgálataink szerint glükózos táptalajon a leginkább termotoleránsnak bizonyult (51. táblázat) - folytattuk le. Kísérleteink célja az ipari hulladékok tesztelése mellett a két élesztőtörzs SSF-ben való felhasználhatóságának vizsgálata volt (54. táblázat).

54. táblázat *K. marxianus* Y 01070 és *S. cerevisiae* SSF eredményei 40°C-on (72 óra)

Szubsztrát	<i>K. marxianus</i> Y01070		<i>S. cerevisiae</i>	
	Etanol	Hozam	Etanol	Hozam
	[g/l]	[g EtOH/g cellulóz]	[g/l]	[g EtOH/g cellulóz]
SF	17,8	0,337	16,6	0,314
OCC	14,1	0,312	14,2	0,315
PS	8,8	0,325	9,0	0,334

SF-on 7,3%-kal jobb hozamot értünk el *K. marxianus* estében, különben a *S. cerevisiae* ugyanolyan jól volt használható 40°C-on, mint a termotoleráns *K. marxianus* Y 01070. Mindkét ipari hulladék alkalmasnak bizonyult etanolfermentáció nyersanyagául, mégha az elért 0,31-0,34 g etanol/g cellulóz az elméleti maximum érték 56-60%-a, szerénynek is mondható. Lynd és mtsi. (2001) egyes papíriszapokon végzett SSF kísérletekben az elméleti etanol hozam 63-84%-át, más szerzők csak az elméleti hozam 21-45%-át érték el (Barron és mtsi., 1995, Nilsson és mtsi., 1995).

5.4.2.6 Nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár egyidejű hidrolízise és fermentációja nagy szubsztrátkoncentráció alkalmazásával
(49. cikk)

A lignocellulózok alkalmazásakor komoly gondot okoz a nagy kiindulási nyersanyag koncentráció, ekkor ugyanis keverési, anyagátadási problémák merülnek fel. Jelen kísérleteink célja olyan nagy etanol koncentráció (5% (V/V)) elérése volt, mely már ipari feldolgozást tesz lehetővé (Galbe és mtsi., 2007). Ennek érdekében mind lúg, mint sav katalízis mellett végrehajtott nedves oxidációs előkezelés (5.1.1.2 fejezet) termékét vizsgáltuk (195°C, 15 perc, 12 bar oxigén) SSF kísérletekben (55. táblázat). Az SSF kísérletek előtt az előkezelt anyaggal fed-batch hidrolízist végeztünk 5 óránkénti, összesen háromszori rátáplálással.

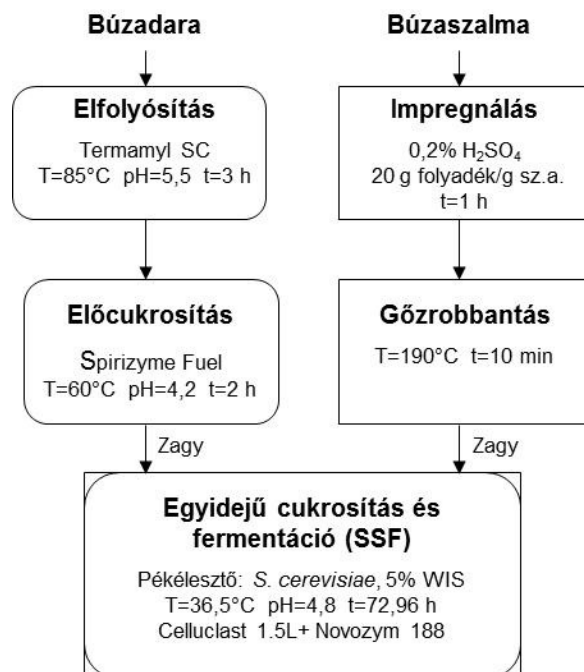
55. táblázat Nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár minták SSF eredményei: hozamok és cellulóz konverziók különböző szubsztrát koncentrációknál (24+120 óra, E/S 36 FPU/g cellulóz)

Szubsztrát koncentráció	Etanol hozam (előkezelt anyag cellulóz tartalmára vonatk.)	Cellulóz konverzió
[% sz.a.]	[%]	[%]
Lúgos kezelés (Alk-195-15)		
8	87,0	90,4
10	85,7	88,1
12	81,8	87,0
14	79,6	83,5
17	77,3	82,9
20	4,4	5,7
Savas kezelés (Ac-195-15)		
10	89,3	96,4
12	86,3	94,2
15	78,1	87,6
20	5,3	6,2

Optimalizált körülmények között (savkatalízis az előkezelésnél, 10% sz.a., 43,5 FPU/g cellulóz enzimdózis) a nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár cellulóz tartalmára vonatkoztatva az elméleti etanol hozam 89%-át sikerült elérnünk, ami az eredeti nyersanyag glükán koncentrációjára vonatkoztatva 83,4%. Az enzimdózist 29, ill. 22 FPU/g cellulózra csökkentve a hozam még mindig az elméleti érték 76 ill. 73%-a volt. 120 órás SSF után az etanol koncentráció elérte a 52 g/l-t. Saját korábbi eredményeink (Stenberg és mtsi., 2000), hasonlóan Spindler és mtsi. (1989, 1990) SSF eredményeihez azt mutatták, hogy 5% fölötti lignocellulóz koncentráció esetén jelentősen leromlik a hozam, ezt sikerült kiküszöbölünk a fed-batch technikával, amikor is 14, ill. 17% sz.a. szubsztrát koncentrációval közel 80%-os hozamot értünk el, mely meghaladja a korábbi lignocellulózon elért eredményeket (Spindler és mtsi., 1989).

5.4.2.7 Első és második generációs etanol előállítás összekapcsolása (50. cikk)

A második generációs etanolgyártás egyik problémája a fermentációban alkalmazható kis szárazanyag tartalom. Ez kis etanolkoncentrációt és produktivitást eredményez, a híg cefre desztillálási költsége pedig az etanol koncentráció csökkenésével drasztikusan nő (Galbe és mtsi., 2007). A kis etanol koncentráció növelhető, ha az etanol fermentációhoz a lignocellulóz szubsztrát mellett valami könnyebben cukrosítható, a zagysűrűséget jelentősen nem emelő szénhidrátot adagolunk. Ez megvalósítható az első és második generációs etanolgyártási technológia összekapcsolásával. Ennek vizsgálata érdekében szimultán cukrosítási és fermentációs kísérleteket végeztünk gőzrobbantott búzaszalma és előcukrosított búzadara különböző arányú keverékein (51. ábra).



51. ábra A kísérleti terv az első és második generációs etanol előállítás összekapcsolására

Az SSF kísérletekben alkalmazott szubsztrátokat, azok keverési arányát, s a főbb komponenseket az 56. táblázat tartalmazza.

56. táblázat Az SSF kísérletekben alkalmazott szubsztrátok keverési aránya (az adatok a reakcióelegy tömegszázalékát jelentik)

Szubsztrát	WIS		Glükóz ekvivalens				
	teljes	PWM	SPWS	PWM		SPWS	
				WIS	folyadékfrakció	WIS	folyadékfrakció
SPWS	5	-	5,0	-	-	3,7	0,2
A keverék	5	0,8	4,2	0,1	2,5	3,2	0,2
B keverék	5	1,5	3,5	0,3	5,0	2,6	0,1
C keverék	5	2,0	3,0	0,4	6,6	2,2	0,1
D keverék	5	2,5	2,5	0,5	8,3	1,9	0,1
PWM	2,8	2,8	-	0,5	9,4	-	-

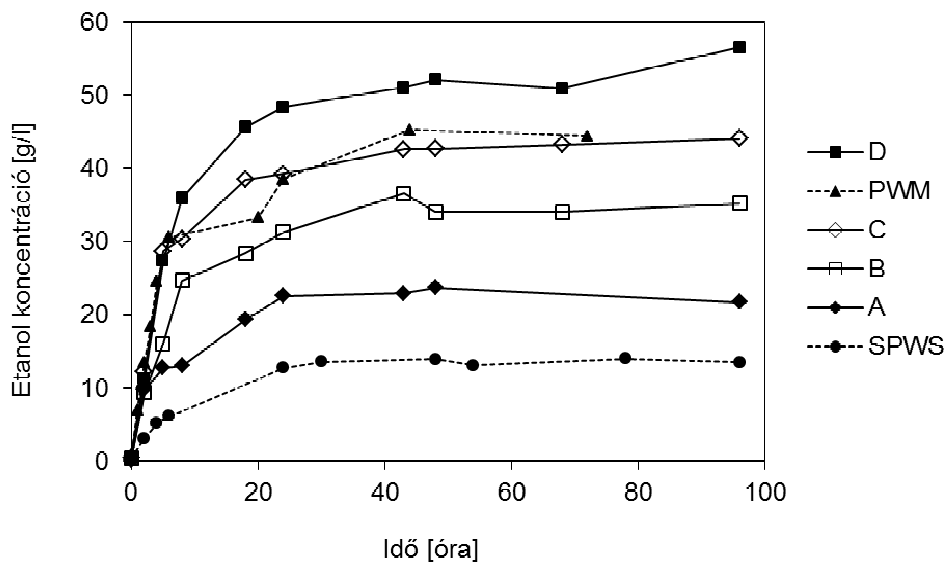
A SPWS WIS és folyadék frakciójának összetételét az 57. táblázat tartalmazza.

57. táblázat SPWS szilárd és folyadékfrakciójának összetétele

WIS		Hemicellulóz hidrolizátum		
Komponensek	sz.a. [%]	Komponensek	[g/l]	[g/l]
Glükán	67,6	Cukrok	Oligoszacharidok	Monoszacharidok
Mannán	-	Glükóz	0,9	2,3
Xilán	0,7	Mannóz	4,1	1,1
Galaktán	-	Xilóz	2,9	22,0
Arabinán	0,4	Galaktóz	-	1,4
ASL	5,1	Arabinóz	-	2,9
AIL	23,1	Inhibitorok		
Teljes hamu	1,0	Ecetsav	1,7	
AIA	0,4	HMF	0,4	
		Furfurol	1,5	
		Hamu	0,3	

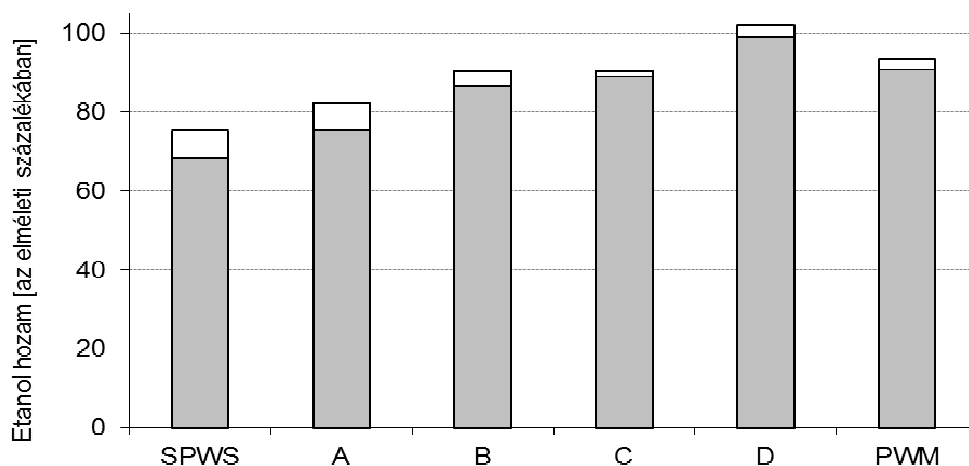
A búzadara amilázos előhidrolízise során a 27. órára 300 g/l glükóz koncentrációt értünk el. Az 52. ábra a különböző keverékeken elért etanol koncentrációkat tartalmazza az SSF kísérletek reakcióidejének függvényében.

dc_22_10



52. ábra Etanol koncentráció változása a SPWS, a PWM, valamint a keverékekkel (A-D) végrehajtott SSF kísérletek alatt

A szubsztrátok elegyítése kedvező hatással volt mind a cefre végső etanol koncentrációjára, mind az etanol hozamra, amely az egyik legfontosabb paraméter a folyamat gazdaságossága szempontjából (53. ábra). A szubsztrátok elegyítése valószínűleg az ecetsav jelenléte miatt volt pozitív hatással az etanol hozamra, az ecetsav ugyanis kis koncentrációban stimulálhatja az anaerob fermentációt (Taherzadeh és mtsi., 1997).



53. ábra Etanol hozamok (■) a nyersanyagok (SPWS, PWM, A-D keverékek) glükóz tartalmára vonatkoztatott elméleti értékek százalékában, valamint potenciális etanol hozamok a hexózokból képződött tejsav korrekciójával (□)

Az 58. táblázat tartalmazza 1 liter etanol előállításának nyersanyag igényét a különböző konfigurációk alkalmazása esetén.

58. táblázat 1 liter etanol előállításának nyersanyagigénye

Szubsztrát	Nyersanyag szükséglet [kg. sz.a./l etanol]	Búzaszalma : búzadara arány az elegyben
SPWS	5,4	-
A keverék	4,0	2,6
B keverék	3,1	1,1
C keverék	2,9	0,7
D keverék	2,5	0,5
PWM	2,4	0

A B keverék felelne meg leginkább a betakarítási arányoknak (1:1), de a D keverékkel sikerült a legjobb hozamot és a legnagyobb etanol koncentrációt elérnünk.

5.5 Cellulázok és különböző lignocellulóz komponensek felhasználása egyéb iparokban

1980-as években jelentek meg az első nagy volumenű ipari alkalmazások, s a cellulázok felhasználása azóta is töretlenül és intenzíven növekszik, s vezető helyet foglalnak el az ipari enzimek piacán. Napjainkban az élelmiszeripar, a sörgyártás, borászat, a takarmányipar, a papír- és textilipar, valamint a kutatás-fejlesztési ágazatok használnak nagy mennyiségben cellulázokat.

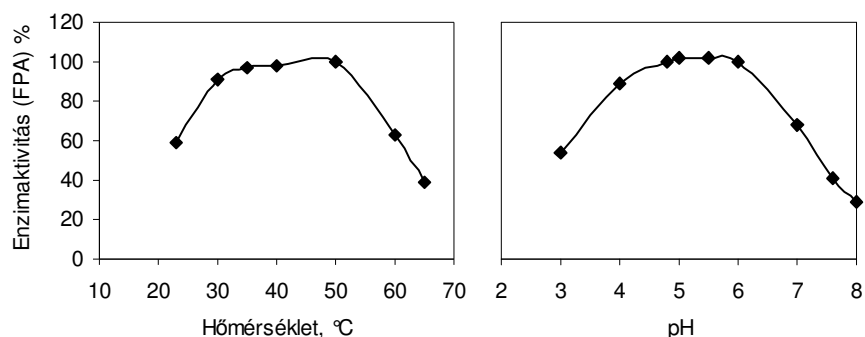
5.5.1 Cellulázok papíripari felhasználása

Az enzimek papíripari alkalmazásának első mérföldköve (1959) a rostok celluláz enzimekkel történő fibrillálásának felismerése volt, mely a szilárdság fokozását eredményezte. A cellulóz- és papíripar a celluláz enzimeket ma a bio-mechanikai rostosításban, a bio-fehérítésben, a szekunder rostok víztelenedésének javítására és az enzimes festéktelenítésben alkalmazza (Kirk és Jeffries, 1996). Kísérleteinkben kereskedelmi cellulázokat és saját fermentálású *T. reesei* QM9414 rekombinánsok enzimeit alkalmaztuk szekunder rostok kezelésére elsősorban a papír víztelenedésének javítása érdekében.

5.5.1.1 Papír víztelenítés javítása ipari enzimekkel (28. cikk)

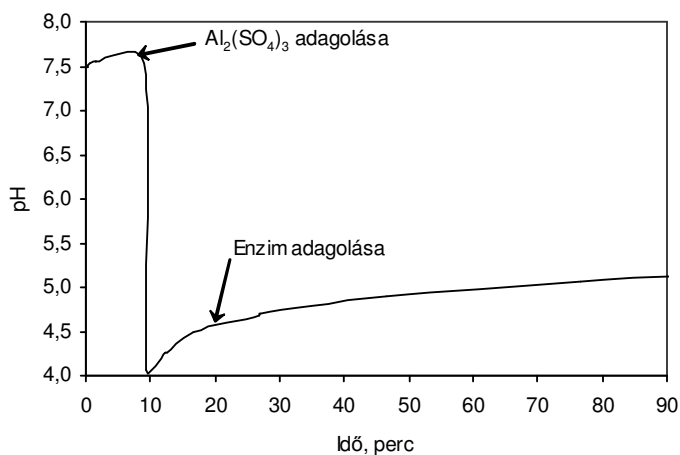
Szekunder papír gyártása során a papírgép teljesítményét jelentősen rontják a rostsuszpenzióban lévő rövid rostok, melyek a papírpép víztelenedését csökkentik. Kísérleteink ezek eltávolítására irányultak. Kereskedelmi celluláz enzimek alkalmazásának vizsgálata során teljes *Trichoderma* celluláz-hemicelluláz komplex enzim (Pergalase A40) hatását vetettük össze egy főkomponensként egyedi endoglükánázt tartalmazó enzimek-szítménnyel (IndiAge Super L). A szekunder papír előállítás során olyan beadagolási pontot kerestünk, ahol a papírmassza pH-ja megfelel az általunk alkalmazni kívánt enzimek pH optimumának. A Pergalase pH optimuma az FPA mérési körülményei között 5,0,

hőmérsékleti optimuma pedig 60°C. Az IndiAge aktivitásának hőmérséklet és pH függését az 54. ábra mutatja be.



54. ábra IndiAge Super L enzimmészítmény hőmérséklet és pH függése

A széles hőmérsékleti és pH optimum különösen kedvező egy tervezett ipari technológiában. A szekunder rostok enzimes kezelésének körülményei az ipari feldolgozás paramétereire kell, hogy igazodjanak. Az enzimadagolást az őrlések után terveztük 35°C-on az ipari folyamatban retenciós- és flokkulálószerként alkalmazott alumínium-szulfát adagolás után 20 perccel, amikor a reakcióelegy pH-ja 4,5 (55. ábra).



55. ábra Szekunder rostsuszpenzió kezelésének pH profilja

Az enzimeket 0,2 g enzim/100 g száraz rost dózisban adagoltuk. Az adagolásnak megfelelő enzimaktivitások (fehérjetartalmak) a kezelés hőmérsékletén meghatározva az 59. táblázatban található. Az azonos tömegbemerés jelentősen nagyobb fehérjetartalmat és enzimaktivitást jelent a Pergalase A40 alkalmazásakor.

Az enzimes kezeléseket hatásait a rostsuszpenzió/papír (a rostsuszpenzióból készített próbalapok) következő tulajdonságaira vizsgáltuk: víztelenedés, vízviisszatartás, légáteresztés, repesztő-, szakító- és tépőszilárdság (60. táblázat).

59. táblázat Szekunder rostok kezelésére alkalmazott enzimdózis Pergalase A40 és IndiAge Super L esetén

	Enzimb készítmény	FPA [*]	CMC-áz [*]	Fehérje
Dózis [per g száraz rost]	[g]	[FPU]	[IU]	[µg]
Pergalase A40	0,002	0,08	2,20	75,8
IndiAge S. L	0,002	0,01	1,37	0,46

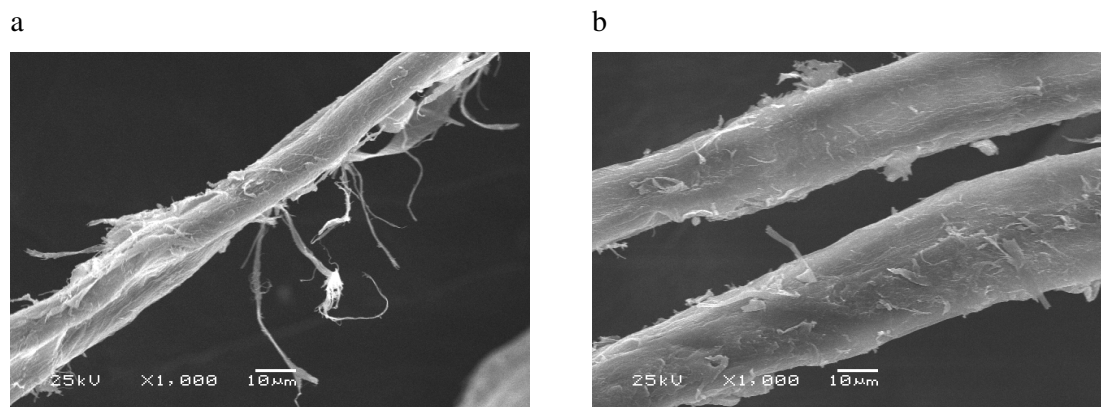
*A kezelési hőmérsékleten, 35 °C-on mért aktivitás értékek

60. táblázat Az enzimes kezelések hatása a rost- és papírtulajdonságokra

Rost- / papírtulajdonság	Referencia	Pergalase A40	IndiAge S. L
Víztelenedés [SR; CSF]	37 ± 0,5	35 ± 0,8	31 ± 0,7
Vízvisszatartás [%]	144 ± 6	135 ± 6	168 ± 7
Légáteresztés [ml/s]	2,99 ± 0,23	3,70 ± 0,31	3,47 ± 0,15
Repesztőszil. mutató [kPa·m ² /g]	3,06 ± 0,07	3,21 ± 0,04	3,23 ± 0,08
Tépőszil. mutató [Nm ² /kg]	10,81 ± 0,49	9,49 ± 0,90	8,06 ± 0,27
Szakítószil. mutató [Nm/g]	51,4 ± 1,5	53,9 ± 2,1	52,2 ± 2,2

Azonos enzimdózis [g/g] mellett az EG III hatására jelentősebb javulást értünk el az újrahasznosított rostok tulajdonságaiban (elsősorban a víztelenedésben, de emellett a rosthossz-eloszlásban, vízvisszatartásban, légáteresztésben is). Az EG III alkalmazásakor tapasztalt kedvező hatás magyarázható a cellulóz-kötő alegység hiányából eredő fokozott mobilitással, mivel ez esetben a CBD nem „lassítja” az enzimet a szubsztrát felületéhez történő kötődés, ill. annak felületéről történő deszorpció során.

A kezelt és kezeletlen szekunder rostok elektronmikroszkópos képén (56. ábra) jól látható a rostok „kírojtózódásának” eltűnése az enzimes kezelés hatására.



56. ábra Referencia (a) és 2,0% IndiAge Super L enzimb készítménnyel kezelt (b) szekunder rostsuszpenzió elektron-mikrográfja

5.5.1.2 Papírvíztelenítés javítása fermentlevekkel (29. cikk)

Trichoderma reesei rekombináns teljes EGI enzimével és annak csupán katalitikus alegységével végzett kísérleteinkben (az ipari enzimekkel végzett kísérleteink alapján) arra a kérdésre kerestünk választ, hogy vajon a CBD szükséges, avagy inkább gátló hatással bír az endoglükánáz molekula hidrolitikus aktivitására magas amorf cellulóz-tartalmú szubsztráton (szekunder rostokon). Az enzimes kezelést ez esetben azonos pNPC-áz dózissal végeztük (61. táblázat).

A saját fermentálású Cel7B (EG I) mindkét variánsának (5.2.3.1. fejezet) szignifikáns hatását tapasztaltuk a szekunder rostok víztelenedésére (16,0-16,6%). A próbalapok szilárdsági jellemzői csupán néhány %-os, egyik esetben sem szignifikáns eltérést mutattak a referencia mintákhoz képest (62. táblázat).

61. táblázat Szekunder rostok kezelésére alkalmazott enzimdózis *T. reesei* QM9414 rekombinánsok fermentlevének (TrCel7B és TrCel7Bcore) felhasználásával

<i>T. reesei</i> QM9414 rekombináns	Enzimmélesztmény	pNPC-áz*	Fehérje
dózis [per g száraz rost]	[μl]	[IU]	[μg]
TrCel7B (EG I)	0,0147	88·10 ⁶	0,13
TrCel7Bcore (EG I core)	0,0116	88·10 ⁶	0,11

*A kezelési hőmérsékleten, 35°C-on mért aktivitás értékek alapján

62. táblázat *T. reesei* QM9414 rekombinánsok fermentlevével (TrCel7B és TrCel7Bcore) végzett enzimes kezelések hatása a rost- és papírtulajdonságokra

Rost- / papírtulajdonság	Referencia	TrCel7B	TrCel7Bcore
Víztelenedés [SR; CSF]	31,2 ± 0,15	26,0 ± 0,93	26,2 ± 0,15
Légáteresztés [ml/s]	3,27 ± 0,16	3,66 ± 0,18	3,41 ± 0,16
Repesztőszil. mutató [kPa·m ² /g]	3,78 ± 0,09	3,82 ± 0,07	3,77 ± 0,14
Tépőszil. mutató [Nm ² /kg]	11,9 ± 0,23	12,1 ± 0,46	12,1 ± 0,45
Szakítószil. mutató [Nm/g]	56,0 ± 1,77	55,9 ± 1,24	55,9 ± 1,76

Mind Cel7B, mind Cel7B core tartalmú fermentlé esetén javulást tapasztaltunk a légáteresztésben, mely tulajdonság zsákpapír esetén különösen fontos. E tekintetben eltérés volt megfigyelhető a teljes enzim (11,8%) és annak katalitikus alegysége (4,3%) okozta változás mértékében, a Cel7B enzim kötődőmód nélkül csupán nem-szignifikáns javulást eredményezett. Kísérleti tapasztalatainkkal ellentétben az irodalomban található vizsgálatok több esetben is a cellulázos kezelés papírsűrűséget növelő hatásáról számolnak be. Mansfield és Wong (1999) azonos őrlésfok esetén nagyobb lapsűrűséget és kisebb légáteresztést tapasztalt a celluláz enzimmel kezelt mintáknál, Pere és mtsi. (1995) Cel5A alkalmazása esetén tapasztaltak azonos hatást.

Cel7B és Cel7B core hatására, az előző, Cel12A (EGIII)-val végzett kísérleteinkkel (5.5.1.1 fejezet) ellentétben, nem tapasztaltunk romlást a tépőszilárdságban. A megfigyelés meglepően pozitív, hiszen endoglükánázokkal végzett kezelés hatására jellemzően romlás tapasztalható a

szilárdsági tulajdonságokban (Oksanen és mtsi, 1997). Eredményeink azt is igazolták, hogy Cel7B alkalmazásakor a papírpép kezelésekor a CBD meglete kedvező a próbalapok légáteresztésére, a víztelenedést pedig nem befolyásolja.

5.5.2 Cellulázok alkalmazása a takarmányozásban

Nagy lehetőségek rejlenek a cellulázok takarmányipari felhasználásában, csoportunk mindössze egy kis kitérőt tett erre, amikor nyúltápok enzimes kezelésére vállalkozott.

5.5.2.1 Takarmányok tápértékének javítása amilázokkal és cellulázokkal

(24. cikk)

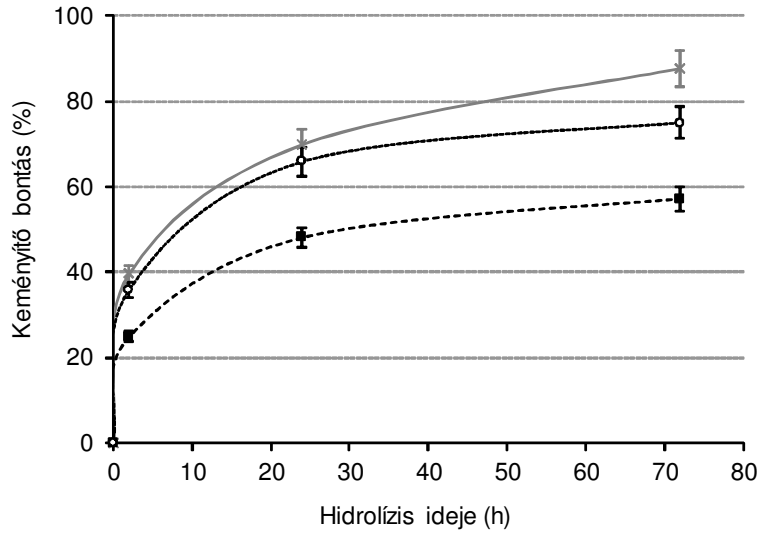
A nagy nyúlhús előállító országokban (Spanyolország, Olaszország, Franciaország) egyre több kísérlet és gyakorlati próbálkozás irányul a nyúl korai, 21-23 napos életkori elválasztására. Az intenzívebb szaporítási ritmus mellett a módszer előnye, hogy az anyát megkímélik a túlzott igénybevételtől (egyidejű vemhesség és szoptatás), a rövidebb idejű közös elhelyezés miatt csökken az anyáról az utódokra terjedő betegségek kialakulásának esélye és megoldható, hogy a kicsinyek az igényüknek megfelelő takarmányt fogyasszanak. A vizsgálatot Gödöllőn, a KÁTKI és a LAB-NYÚL Kft. által üzemeltetett nyúltelepen végeztük. A celluláz-hemicelluláz aktivitású enzimkészítményt a *T. reesei* Rut C30 törzs felhasználásával fermentációs úton hullámpapír hulladék szénforrás felhasználásával (5.2.1.5. fejezet) állítottuk elő, amelyet permetezéssel (1 liter koncentrált fermentlé/100 kg takarmány) juttattunk a kereskedelmi nyúltáp felületére. A rápermetezett mennyiség 7040 FPU celluláz aktivitással rendelkezett. A nyulak a kezelt, illetve az ugyanazon összetételű, de enzimkiegészítés nélküli kontroll tápot, valamint szopókás önitatóból az ivóvizet tetszés szerint fogyaszthatták. Kísérletünk célja volt, hogy korai elválasztás (23. nap) mellett összehasonlítsuk a celluláz enzimmel kiegészített és a kezelés nélküli takarmányt fogyasztó nyulak jellemzőit. Eredményeink szerint a takarmánnyal bejuttatott celluláz-hemicelluláz enzimkomplex kedvező hatása elsősorban a választást követő két hétben jelentkezett. A kezelt állatok ugyanis 28%-kal kisebb takarmányfelvétellel és 24%-kal jobb takarmányértékesítéssel öt hetes korban közel hasonló testsúlyt értek el, mint a kontroll nyulak. Az enzimkiegészítés tehát elősegítette és javította a fiatal nyulakban a táplálóanyagok feltárását és hasznosulását.

5.5.3 Lignocellulóz komponensek alkalmazása bioműanyagok egyes tulajdonságának javításában

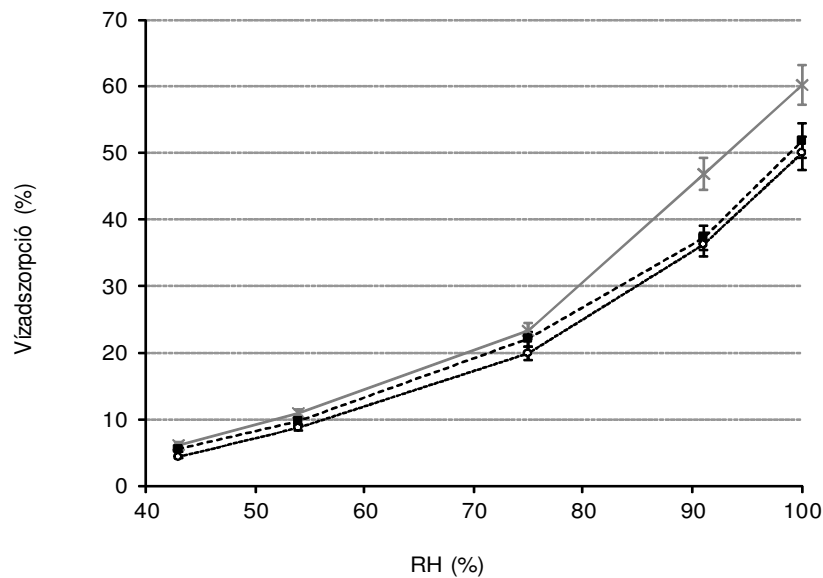
(24. cikk)

Munkánk során a biofinomítás szellemében, a kukoricarost lúgos előkezelésekor (5.1.2.1) keletkező CGF, a kukoricaszem nedves frakcionálásakor keletkező, főként zein tartalmú fehérjefrakció és a cellulóz képezték vizsgálódásunk tárgyát. A keményítő alapú bioműanyagok (TPS) két nagy problémája, a nagy vízfellevő képesség és a túl gyors biodegradáció, melyeket különböző adalékok (pl. polikaprolakton) alkalmazásával igyekeznek javítani (Bastioli, 1998). A TPS biodegradációját CFG adagolással sikerült késleltetnünk, s a 72 óra alatt elért keményítőlebomlás is szignifikánsan kisebb volt, mint az adalék nélküli kontrollé (57. ábra), egyidejűleg a TPS minta szakítószilárdságát növeltük (részletes adatok: Gáspár és mtsi., 2005).

Az adalékokkal kevert bioműanyag minták vízadszorpcióját 5 különböző páratartalmú légtérben vizsgáltuk. Egy adott páratartalom mellett az egyensúly beálltakor mért vízfelvételek a 58. ábrán láthatók.



57. ábra Az adalék nélküli (x, folytonos vonal), a fehérjével (o, pontvonal) és a hemicellulózzal (■, szaggatott vonal) töltött TPS minták keményítő tartalmának bontása



58. ábra Az adalék nélküli (x, folytonos vonal), a fehérjével (o, pontvonal), és a hemicellulózzal (■, szaggatott vonal) töltött TPS minták tömegnövekedése 14 nap után 43%, 54%, 75%, 91% és 100% páratartalmú légtérben

Mind hemicellulóz mind zein adagolásával, a pozitív kontrollként használt, polikaprolaktonnal készített TPS-hez hasonlóan a vízadszorpciót 44-100% relatív páratartalmú térben 20-30%-kal sikerült csökkentenünk az adalék nélküli TPS mintákhoz képest.

6 Összefoglalás

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 főtémeget cellulóz, hemicellulóz és lignin alkotja. Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a különböző melléktermékek (kukoricaszár, kukoricarost, cukorcirok bagasz, kenderpozdorja), esetenként főtémekek (fűzfa, fenyőfa, kender, energiafű), egyes esetekben hulladékok (papíriszap, 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.

6.1 A lignocellulózok előkezelése

A lignocellulózok előkezelésének értékelésekor elsősorban a kezelés hatására i) elérhető glükán konverziót (konverzió javulást), ii) a bekövetkező cellulóz és hemicellulóz elválasztást, valamint iii) cellulóz illetve hemicellulóz veszteséget vizsgáltuk és hasonlítottuk össze.

Kukoricaszár előkezelésekor a híg kénsavas előkezelés körülményeinek alkalmas megválasztásával (120°C, 90 perc 2% H₂SO₄) megoldottuk a hemicellulóz frakciónak a többi polimertől történő elválasztását - úgy, hogy a cellulóz csaknem 90%-a a szilárd frakcióban maradt - lehetőséget adva ezáltal az öt szénatomos cukrok külön felhasználására (green chemistry, platform chemistry). Megállapítottuk ugyanakkor, hogy a csaknem tökéletes (94%-os) hemicellulóz elválasztás nem eredményezett megfelelő bonthatóság javulást az előkezelt anyagban (18%-ról 46%-ra változott). Éppen ezért célszerű egy második előkezelési lépést alkalmazni a cellulóz frakció hidrolizálhatóságának javítása érdekében.

Híg lúgot és híg savat egymás után alkalmazva az elméleti maximumot megközelítő konverzió értéket sikerült elérnünk (96%). A módszer hátránya, hogy nem megoldott a vegyszeres felülúszók hasznosítása. Célszerű a kezelések sorrendjét felcserélni, mert akkor a savas felülúszóból a xilóz, a lúgos felülúszóból a lignin hidrolízis termékei hasznosíthatók.

Mind a gőzrobbantás, mind a nedves oxidáció alkalmasnak bizonyult kukoricaszár előkezelésére, segítségükkel a glükán konverziót három, illetve négyszeresre növeltük a kukoricaszár eredeti enzim bonthatóságához képest. Ezt gőzrobbantásnál 190°C-on 5 perc reakcióidővel 2%-os H_2SO_4 -val történő előáztatással sikerült elérnünk. A nedves oxidáció optimális körülményei 195°C, 15 perc reakcióidő, 12 bar O_2 , 2 g/l Na_2CO_3 . A gőzrobbantás során 13% volt a cellulóz és 36% a hemicellulóz veszteség, a nedves oxidációnál a cellulóz veszteség mindössze 9%, a hemicellulóz veszteség 40% volt.

A kukoricarostot mind savas (0,9% H_2SO_4 , 120°C, 2 óra), mind lúgos (120°C, 1 óra, 1 és 2% KOH, illetve NaOH) katalízissal kiválóan sikerült előkezelnünk (91%, ill. 85-90%-os glükán konverzió). A két módszer közötti lényeges különbség, hogy a savas + enzim kezelés után a maradékból kukoricarost olajat nyertünk ki jó hatásfokkal (miután annak koncentrációja az eredeti 2%-ról 45%-ra emelkedett a frakcionált mintában), míg a lúgos kezelés után a lúgos előkezelő oldatból izolált hemicellulózt eredményesen használtuk fel a termoplasztikus keményítő egyes tulajdonságainak javítására. Mikrohullámú reaktorban semleges körülmények között (180°C, 5 perc) a lúgos kezeléssel összemérhető molekulatömegű hemicellulózt sikerült izolálnunk. Kukorica csíra dara kezdeti 15%-os olajtartalmát többlépcsős frakcionálással (híg savas és enzim) 46%-ra növeltük, lehetővé téve ezáltal préselés alkalmazását a szerves oldószeres extrakció helyett a maradék olaj kinyerésére.

Cukorcirok bagasz gőzrobbantásos előkezelésével 190°C, 10 perc és 200°C, 5 perc reakció körülmények között, előzetes SO_2 -os impregnálás (0,04 g SO_2 /g sz.a.) után sikerült 89-92%-os glükán konverziót elérnünk minimális (4 illetve 6%) cellulóz veszteség és 35-40% hemicellulóz veszteség mellett.

Kender és kenderpozdorja kémiai előkezelései nem hoztak megfelelő eredményt, valószínűleg a kender kompakt szerkezete következtében.

Kenderkóró és kender szilázs gőzrobbantással történő előkezelésekor a 2% kén-dioxid előimpregnálást követő 210°C-on 5 perc tartózkodási idő mellett végzett előkezelés bizonyult a leghatékonyabbnak. Az előkezelés után meghatározott enzim bonthatóság kenderkóró esetében 83,1%, a szilázs esetében 89,3% volt, a cellulóz veszteség mindössze 5, illetve 7%, a hemicellulóz veszteség 38 illetve 42% volt. A pentózfrakció elválasztása SPHS esetében jelentősen, 33%-kal javította az SSF hatékonyságát.

Kenderpozdorja gőzrobbantásos előkezelése a legjobbnak talált körülmények között (210°C, 10 perc) 83%-os glükán konverziót eredményezett 11% cellulózveszteség és 70% hemicellulóz veszteség mellett. Így ez az előkezelés nem tekinthető kielégítőnek, a továbbiakban vagy katalizátort és rövidebb reakcióidőt, vagy kétlépcsős előkezelést kell alkalmazni a hemicellulóz veszteség csökkentése érdekében.

Mindhárom nyersanyagból sikerült etanolt előállítani gőzrobbantás utáni SSF folyamatban: 17,1 g etanol/100 g kender sz.a.; 16,3 g etanol/100 g kenderszilázs sz.a.; 14,1 g etanol/100 g kenderpozdorja sz.a. hozammal.

Balatoni nád nedves oxidációs előkezelésének hatására az enzim hidrolizálhatóságot közel négyszeresére emeltük, de a jó bonthatóságot biztosító körülmények alkalmazásakor a cellulóz közel 30%-a elbomlott, a módszer így nem javasolható a balatoni nád előkezelésére. Híg kénsavas előkezeléssel sikerült az *energiafü* hemicellulóz frakcióját elválasztani, de ez nem eredményezett kielégítő konverzió javulást a maradékban. Mindkét nyersanyagnál meg kell vizsgálni a kétlépcsős előkezelés lehetőségét a kisebb veszteség és a jobb enzim cellulózhidrolízis érdekében.

6.2 Enzimfermentáció

Enzimfermentációs kísérleteink során mellett, hogy Trichoderma reesei Rut C30 enzintermelését tanulmányoztuk a „lignocellulózból etanol” technológia különböző köztitermékeinek felhasználásával, foglalkoztunk a pH és az enzimlokalizáció, valamint az indukció kérdésével is. Emellett néhány rekombináns törzs celluláz termelését, valamint jó BGL termelő Aspergillusok szaporítását is vizsgáltuk.

Gőzrobbantott fűzfa (SPW), ennek ligninmentesített változata és a gőzrobbantott fűzfa enzim hidrolízise után kapott nagy lignintartalmú maradék egyaránt jó szénforrásnak bizonyult *T. reesei* Rut C30 fermentációjához. A gőzrobbantással történő előkezelés során keletkező zagy elválasztásával nyert folyadékfrakció (hemicellulóz hidrolizátum, pentózfrakció) bepárlásával nyert sűrítmenyt, mely az élesztők számára toxikusnak bizonyult, a *T. reesei* Rut C30 szénforrásként tudta hasznosítani, úgy, hogy az ecetsavat elfogyasztotta és a ligninből származó fenolos inhibitorok koncentrációját jelentős mértékben (30%) csökkentette. Amellett, hogy az általunk elsőként alkalmazott biológiai detoxifikálás hatásosnak bizonyult az inhibitorok koncentrációjának csökkentésére, alternatív felhasználási lehetőséget nyújtott a pentóz cukrok hasznosítására. A tizedére besűrített pentózfrakció felhasználásával a fermentáció szénforrása (SPW) 50%-ban volt helyettesíthető, a hozam közel 30%-os növekedése mellett. A sűrítetlen pentóz frakció csak korlátozottan volt alkalmas enzimfermentáció szénforrásának, a SPW 20%-át az alkalmazott pH-tól és a keveréstől függetlenül helyettesíthettük vele; 50%-ban történő alkalmazásakor csak a pH 6,0-on lefuttatott kísérlet volt sikeres (300 fordulat/perc rázatás), alacsonyabb pH-n, vagy kisebb rázatási fordulatszámnál nem volt enzintermelés. A 80%-ban a pentóz frakcióból származó szénforrás semmilyen körülmények között nem volt alkalmas a gomba szaporításához, valószínű, hogy az inhibitorok együttes hatása volt toxikus.

Gőzrobbantott lucfenyő felhasználásával is sikerült celluláz enzimet termelnünk mosott rostfrakción és olyan táptalajon is, ahol a szénforrás 50%-át a hemicellulóz frakcióból biztosítottuk. A legnagyobb celluláz enzimaktivitást (0,79 FPU/ml) a mosott rost szénforrás alkalmazásával, a legkisebbet az 50%-ban hemicellulóz hidrolizátumból származó szénhidrátot tartalmazó táptalajon érték el.

Hullámpapír hulladékot és papírsapot is sikeresen használtunk enzimfermentáció szénforrásként, az előállított enzimet nyúltáp kezelésére használtuk. Gőzrobbantással előkezelt kukoricaszár és laktóz alkalmasak a SF helyettesítésére, laktóz szénforrás alkalmazásakor a BGL aktivitás kétszerese, az FPA viszont csak fele volt a SF-on elértnek. Nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár hemicellulóz hidrolizátuma alkalmas a fermentáció során a víz 75%-ban történő helyettesítésére. Alk-185-5 előkezeléssel nyert HH alkalmazása esetén a térfogati aktivitás csaknem 40%-kal, a hozam pedig 10%-kal volt jobb, mint a kontrollnál.

Ráztatott lombikos kísérletek során gondot okozó naponkénti pH állítás kiküszöbölése érdekében lefolytatott pH állítási kísérleteink sikeresek voltak, s találtunk két alkalmazható puffer rendszert a pH stabilizálására. 6,0-os pH-n a maleát és trisz-maleát puffer rendszer is alkalmas volt a ráztatott tenyészetek pH-jának állandó értéken tartására. A 0,1 M-os trisz-maleát puffer alkalmazásakor a BGL aktivitás 30-50%-kal nagyobbak adódott, mint a nem pufferolt rendszerekben.

Solka Floc szénforráson a *T. reesei* Rut C30 teljes enzintermelése, azaz az intra- és az extracelluláris aktivitások összessége (szuperkritikus CO₂-ban feltárva, 100 bar, 40°C, 15 perc) kiegyensúlyozott volt. A gomba a hatékony enzim hidrolízishez elegendő BGL-t

szintetizált, viszont az csak 35%-ban jelent meg oldottan a fermentlében, a fermentlé felülúszó az enzimes hidrolízisben alkalmazva, így BGL deficitessnek bizonyult.

T. reesei Rut C30 növekedési dinamikájának vizsgálatakor megállapítottuk, hogy pillanatszerűen képes metabolizmusát glükóz hasznosításról cellulóz hasznosítására átkapcsolni, mellyel együttjár az intenzív celluláztermelés. Ennek a kétlépcsős technikának akkor lehet gyakorlati jelentősége, amikor az előkezelés után elválasztott pentóz cukrokat használjuk fel a gomba szaporítására, majd impulzusszerű cellulóz adagolással biztosítjuk az enzim termelés indukciót.

Genetikailag módosított *T. reesei* QM9414 törzsekkel rázatott lombikos fermentációban *T. reesei* teljes Cel7B endoglukanázt, ill. Cel7B katalitikus alegységet jó hozammal tudtunk szelektíven előállítani. *T. reesei* QM9414 Cel7B-t termelő mutánsának rátáplálásos fermentációjában megnövelt szerves N-tartalomnál az enzim mellett nagy mennyiségben szintetizálódott egy kis molekulasúlyú fehérje, melyet szerin proteáznak azonosítottunk. Ennek jelenlétével magyarázható, hogy a rekombináns törzssel a megnövelt N-tartalom alkalmazásakor csak a CBD nélküli Cel7B-t tudtuk előállítani.

Thermoascus aurantiacus heterológ CBH I termelését, fermentálhatóságát és stabilitását a *Trichoderma reesei* Rut C30 szaporításával megegyező körülmények között vizsgáltuk, így lehetőség nyílt a szülő és a módosított törzs a *T. reesei* RF6026 összehasonlítására. SF, laktóz, gőzrobbantott kukoricaszár szénforráson a két törzs enzimtermelése FPA, BGL és EG aktivitások tekintetében megegyezett. A heterológ CBH I enzimtermelés sikerességét a 70°C-on végzett enzimaktivitás méréssel igazoltuk.

Optimalizált körülmények között végrehajtott glutáraldehydes kezeléssel sikerült jelentősen megnövelni a BGL tartalmú mikrobiális pelletek stabilitását. Tíz egymást követő hidrolízis (2196 óra) során a kezdeti hidrolízis sebesség nem csökkent szignifikánsan. A *Trichoderma*kkal ellentétben az *Aspergillus*ok mindenféle megkötés nélkül jól növekedtek a SPW eredetű hemicellulóz hidrolizátum szénforráson, a BGL termelés meghaladta a kontroll szénforráson (glükóz) elért értékeket. *Aspergillus niger* BGL tartalmú fermentlevének felülúszóját polietilén-glikol (PEG)-dextrán vizes kétfázisú rendszerben 700-szorosra sikerült töményíteni. A BGL visszanyerése 85-95%, a tisztulása 2-3-szoros volt.

6.3 Az enzimes hidrolízis vizsgálata

Néhány *Trichoderma* illetve *Melanocarpus* eredetű egyedi enzimkomponens hatását vizsgáltuk lignocellulózokon, illetve kristályos és amorf cellulózon. Emellett SF, laktóz, SPCS szénforrásokon termelt saját fermentlevék hidrolizáló képességét hasonlítottuk össze különböző szubsztrátokon. PEG adagolásának hatását vizsgáltuk az enzimes hidrolízisre és az enzimadszorpcióra.

Mindkét *Melanocarpus albomyces* eredetű celluláz aktívnak mutatkozott a két vizsgált szubsztráttal szemben. Az amorf cellulóz jobb hidrolizálhatósága egyértelmű (22-38%), Avicel szubsztráton egyik kísérleti beállításnál sem értük el a 10%-os konverziót. A CBH eredetű CBM minden esetben javította az enzimek teljesítőképességét, amely hatás Avicel szubsztráton hangsúlyosabb volt. Mikrokristályos szubsztráton egyértelműen jobb hatásfokot mutatott a vizsgált CBH, míg amorf szubsztráton nem volt éles különbség a kétféle enzimkomponens teljesítménye között.

Egyedi *Trichoderma* enzimkomponensekből (CBH I, CBH II és EG II) és *Aspergillus* eredetű β -glükózidázból készített „enzimkóktállal” végzett hidrolízisekben tisztított xiloglukanáz kiegészítést alkalmazva a glükán konverzió a nagy xilán tartalmú szubsztrátoknál (xilán

tartalom>9,5%) az SPW (190°C) kivételével növekedést mutatott. A konverzió XL és XL+XG segítő enzimek alkalmazásának hatására jelentősen nőtt, a javulás mértéke összefüggött a szubsztrát xilán tartalmával.

SPCS, SPS, SF és Avicel hidrolízisének, azonos FPA dózis alkalmazásakor a fermentlevek jobban teljesítettek, mint az ipari enzim (Celluclast 1.5L), ez a különbség gőzrobbantott kukoricaszár esetében volt a legkifejezettebb, Avicel hidrolízisekor a legkevésbé jelentős. A fermentlevek hidrolizáló képességét vizsgálva megállapítottuk, hogy hemicellulózt is tartalmazó SF hidrolízisekor nagyobb a jelentősége az enzimkomplex összetételének, míg a nehezen bontható Avicel bontásakor a cellulázok aktivitása a sebesség meghatározó.

Gőzrobbantással előkezelt fenyőfa (SPS) hidrolízisekor PEG 4000 adagolásával (2,5 mg/ml koncentrációban) a glükán konverzió 15-20%-kal volt javítható. Ezalatt a hidrolízis végén (72 óra) mérhető enzimadszorpciót (FPA) a kontroll (PEG nélküli) minta 95%-os értékéről 45%-ra csökkentettük, megteremtve ezáltal a részleges enzimrecirkuláció lehetőségét.

Az SPS mellett SPSSB, SPCS, SPH, SPW és SPWS szubsztrátok hidrolízisekor is vizsgáltuk az FPA és a BGL aktivitások alakulását PEG adagolással, illetve anélkül. A különböző szubsztrátok nagyon eltérően viselkedtek, a PEG enzimadszorpciót (FPA) csökkentő hatása a SPS esetében volt a legjelentősebb, míg SPSSB esetében egyáltalán nem jelentkezett. Nagy különbséget találtunk a különböző eredelű BGL adszorpciók tulajdonságaiban. A *Trichoderma* eredetű BGL esetében mind az enzimadszorpció, mind a PEG hatás lényegesen erőteljesebb, mint az *Aspergillus* eredetűnél.

6.4 Biohidrogén és etanol előállítása

A biohidrogén előállítással csak érintőlegesen, az etanolfermentációval széles körben foglalkoztunk, egyrészt az előkezelések hatékonyságának, az inhibitorok hatásának tesztelésékor, másrészt az etanolkoncentráció növelése érdekében végzett fermentációs kísérleteink során.

A *Thermotoga elfii*, a *T. neapolitana* valamint a *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* képes volt a papíriszap hidrolizátumot szénforrásként hasznosítani és hidrogént termelni. A *C. saccharolyticus*-nak az előző kettővel ellentétben nem volt speciális só, nyomelem vagy élesztőextrakt igénye, így méretnövelési kísérleteinket ezzel a mikrobával végeztük. A *C. saccharolyticus* jól volt szaporítható papíriszap hidrolizátumon 2 literes bioreaktorban kontrollált körülmények között, az elért hozam összemérhető volt a kontrollal.

Gőzrobbantással előkezelt lucfenyő szénforrás SSF-ben történő alkalmazásakor az enzim felhasználás növelésével az etanol hozam emelkedett (miközben a túlzott emelésnek az enzim ára szab határt). 32 FPU/g cellulóz enzimdózis alkalmazásakor 5% szubsztrát koncentrációnál értük el a legnagyobb hozamot, ami a nyersanyagban jelenlévő potenciális szénhidrátra vonatkoztatva (glükán+mannán) 82%. Nagyobb szubsztrát koncentrációknál nem volt kielégítő a fermentáció, valószínűleg a nagyobb inhibitor koncentráció következtében, kisebb szubsztrát koncentrációnál (2%) jelentős volt a tejsavképződés.

S. cerevisiae ATCC 26602 inhibitor rezisztens törzzsel alacsony pH-jú fermentációban (pH 4,0), a gőzrobbantással előkezelt kukoricaszár HH-át (glükóz kiegészítéssel) hígítás nélkül, a SPW és SPS hemicellulóz hidrolizátumát 50-65%-ban alkalmazva tudtuk erjeszteni.

Az SSF produktivitásának javítása érdekében termotoleráns élesztőtörzseket teszteltünk. A vizsgált élesztőtörzsek nagy hőmérsékleten inhibitor érzékenyek bizonyultak. Gőzrobbantással előkezelt lucfenyő szűrleten és méregtelenített felülúszón a *Kluyveromyces marxianus* Y 00243 mutatta a legjobb cukorhasznosítást és etanoltermelést, viszont

gőzrobbantással előkezelt lucfenyő szubsztráttal végzett SSF kísérletekben csak 20 órán keresztül volt képes erjesztetni, a későbbiekben glükóz felhalmozódást mértünk állandó etanol koncentráció mellett. Papírgyári hulladékok (hulladékpapír, papírszap) egyidejű hidrolízisét és fermentációját vizsgálva megállapítottuk, hogy mindkét ipari hulladék az etanolfermentáció alkalmas szénforrása lehet, bár az elért 0,30-0,34 g etanol/g cellulóz az elméleti értéknek csupán 54-60%-a. A gyenge hozam alapján feltételezhető, hogy a *K. marxianus* Y 01070 nem valódi termotoleráns törzs. A *S. cerevisiae* ugyanolyan jól erjesztett 40°C-on, mint a *K. marxianus*.

Nagy szubsztrát koncentráció (12% sz.a.) többlépcsős biztosításával optimalizált körülmények között nedves oxidációval az eredeti kukoricaszár cellulóz tartalmára vonatkoztatva az elméleti etanol hozam 83%-át sikerült elérnünk. 120 órás SSF után az elért etanol koncentráció 52 g/l, mely meghaladja az 5% (V/V)-ot, melyet a gazdaságos etanolkoncentráció határaként ismerünk.

Első és második generációs etanol előállítás összekapcsolásával, hidrolizált búzadara és gőzrobbantással előkezelt búzaszalma felhasználásával meghaladtuk a fenti etanol határértéket. A maximális etanolkoncentrációt (56,5 g/l) akkor érték el, amikor a szénforrást fele-fele arányban biztosítottuk cellulóz illetve keményítő tartalmú nyersanyaggal.

6.5 Cellulázok és különböző lignocellulóz komponensek felhasználása egyéb iparokban

Ipari enzimeket, valamint fermentációval előállított speciális enzimkomponenseket szekunder rostok kezelésére, saját fermentálású Trichoderma enzimkomplexet takarmány kiegészítésre, a kukoricarost lúgos frakcionálásával előállított hemicellulóz frakciót, CFG-ot termoplasztikus keményítő tulajdonságainak javítására használtuk.

Azonos enzimdózis [g enzim/g S] mellett IndiAge Super L alkalmazásával, mely egy kötő domént nem tartalmazó endoglükánáz (EG III) enzimkészítmény, jelentősebb javulást értünk el az újrahasznosított rostok tulajdonságaiban (elsősorban a víztelenedésben, de emellett a rosthossz-eloszlásban, vízvisszatartásban, légáteresztésben is), mint az iparban általánosan alkalmazott, teljes celluláz enzimkomplext tartalmazó Pergalase A40 használatakor.

A saját fermentálású Cel7B és Cel7B core (katalitikus alegység) tartalmú fermenté felülűzők szignifikáns pozitív hatását tapasztaltuk a szekunder rostok víztelenedésére (16,0-16,6%). A próbalapok szilárdsági jellemzői csupán néhány %-os, egyik esetben sem szignifikáns eltérést mutattak a referencia mintákhoz képest. A teljes Cel7B (EG I) szignifikáns javulást (11,8%) okozott a légáteresztésben (zsákpapír esetén fontos tulajdonság), míg a Cel7B katalitikus doménje esetén tapasztalt javulás nem volt szignifikáns (4,3%).

Enzimesen kezelt nyúltápokkal végzett etetési kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a takarmánnyal bejuttatott celluláz-hemicelluláz enzimkomplex kedvező hatása elsősorban a választást követő két hétben jelentkezik. A kezelt állatok 28%-kal kisebb takarmány felvétellel és 24%-kal jobb takarmány értékesítéssel öt hetes korban közel hasonló testsúlyt értek el, mint a kontroll nyulak. Az enzimkiegészítés tehát elősegítette és javította a fiatal nyulakban a táplálóanyagok feltárását és hasznosulását.

Termoplasztikus keményítő (TPS) minták tulajdonságait kukoricarostból izolált CFG adagolással, mind tépőszilárdság, mind biodegradáció, illetve vízadszorpció tekintetében pozitívan sikerült megváltoztatnunk.

7 Tézisek

Legfontosabb tudományos eredményeimnek az alábbiakat tekintem:

7.1 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 nyersanyagokként részletezem a leglényegesebb eredményeinket.

7.1.1 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 (cukorbomlás) 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.

7.1.2 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).

7.1.3 Cukorcirok bagasz előkezelése

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

7.1.4 Kender és kenderpozdorja vizsgálata

- ♦ A mezőgazdasági melléktermékeknel sikeresen alkalmazott kémiai módszerekkel sem a kender, sem a kenderpozdorja nem tárható fel a kívánt mértékben, előkezelés tekintetében a fászszerű anyagokhoz hasonlítanak, melynek valószínű oka a zártabb struktúra (14).
- ♦ Gőzrobbantással mind a kenderkórót, mind a silózással tarósított kenderkórót hatékonyan lehet előkezelni. Kéndioxidos előimpregnálás után optimális körülmények között végzett előkezelés hatására a glükánvesztesség csekély, az enzimes 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).

7.1.5 Balatoni nád előkezelése

- ♦ Balatoni nád nedves oxidációs előkezelésének hatására az enzimes 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).

7.1.6 Energiafű előkezelése

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

7.2 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 újrapiapír gyártás során hulladékként keletkező papíriszapot mi használtuk először celluláz fermentáció szénforrásául. Új fermentációs és „downstream” technikák alkalmazásával (puffer rendszer alkalmazása, vízoldható 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 enzimermentáció területén elért leglényegesebb eredményeinket.

7.2.1 Szénforráskísérletek

- ◆ Gőzrobbantással előkezelt fűzfa minták lignin tartalmuktól függetlenül alkalmazhatók a cellulázfermentáció szénforrásaként (19).
- ◆ Fűzfa gőzrobbantásakor (SPW) keletkező pentózfrakció sűtítményen a *T. reesei* Rut C30 törzs képes a pentózok hasznosítására és a közeg biológiai detoxifikálására (20).
- ◆ A fermentáció szénforrása (SPW) fele részben helyettesíthető besűrített pentózfrakció (SPW) felhasználásával, 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 enzimermentáció szénforrásául (21).
- ◆ Gőzrobbantott lucfenyő (SPS) mosott rost, valamint annak fele részben a hemicellulóz frakcióval történő kiváltása is alkalmas szénforrást nyújt a celluláz fermentációhoz (22).
- ◆ Hullámpapír hulladék sikeresen használható enzimermentáció 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.

7.2.2 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 enzimtermeléshez 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 enzimtermelése, 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).

7.2.3 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 szerves N-tartalom alkalmazásakor a celluláz enzim mellett nagy mennyiségben szintetizálódik egy szerin proteáz. Ennek jelenlétével magyarázható, hogy a rekombináns törzzsel 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).

7.2.4 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 enzimkiáramlást (enzimvesztés) 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).

7.3 Az enzimes hidrolízis vizsgálata területén

Igazoltuk új, rekombinánsokkal előállított egyedi enzimkomponensek alkalmazhatóságát kristályos és amorf cellulóz szubsztrátokon. Előkezelt lignocellulózok tiszta enzimkomponensekkel végzett hidrolízisekor tisztítottuk a xilanáz és xiloglukanáz adagolás szerepét. Csak részben sikerült igazolnunk azt a hipotézisünket, hogy jobb konverziót érhetünk el, ha az enzimermentáció 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.

7.3.1 Tisztított enzimkomponensekkel végzett hidrolízis kísérletek

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

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

7.3.2 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 -glükózidáz 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 -glükózidáz, míg a xilánkonverzióra a β -glükózidáz mellett, a xilanáz aktivitásnak van szignifikáns hatása (39).

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

- ◆ Gőzrobbantott lucfenyő enzimes hidrolízisekor polimerek adagolásával a cellulázok nem-termék kötődése azáltal csökkenthető, hogy az adagolt PEG adszorbeálódik a lignin felületén ezáltal a celluláz (FPA) mintegy fele 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.

7.4 Etanol és biohidrogén előállítása területén

Igazoltuk különböző lignocellulóz nyersanyagok alkalmazhatóságát hidrogén és etanol fermentáció szénforrásként. Kidolgoztuk az etanol koncentráció növelésének technológiáját lignocellulóz szubsztrátokon. Megállapítottuk, hogy az enzimes hidrolízishez közelítő hőmérsékleteken, valós szubsztrátokon 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.

7.4.1 Hidrogén anaerob fermentációval történő előállítása

- ◆ Igazoltuk, hogy a különböző termofil hidrogéntermelők közül (*Thermotoga elfii*, *Thermotoga neapolitana*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*), amelyek mind képesek a papírszap 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 papírszap hidrolizátumon (42).

7.4.2 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 (SSF) során 5% szubsztrát koncentrációnál érhető el a legnagyobb hozam. Nagyobb szubsztrát koncentrációknál 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 szubsztát 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).

7.5 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 (CFG) adagolás pozitív hatását a tépőszilárdságra, a biodegradációra és a vízadszorpcióra keményítő alapú bioműanyagoknál (TPS).

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

7.5.1 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).

7.5.2 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.

7.5.3 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 vízadszorpciója 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.

8 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., Ståhlbrand, 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) Energiafü 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., Ståhlbrand, 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., Hägglund, P., Tjerneld, F., Lidén, G., Réczey, K., Ståhlbrand, 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 hydrolisate 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. Sziártó, 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.

9 Irodalomjegyzék

- Acebal, C., Castillon, M.P., Estrada, P., Mata, I., Costa, E., Aguado, J., Romero, D., Lacaba, F. (1985) Cellulase production by *Trichoderma reesei* on wheat straw. *Biochemical Society Transactions*, 13:453–455.
- Adsul, M.G., Ghule, J.E., Singh, R., Shaikh, H., Bastawde, K.B., Gokhale, D.V., Varma, A.J. (2004) Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*, 57:67–72.
- Alkasrawi, M., Rudolf, A., Lidén, G., Zacchi, G. (2006) Influence of strain and cultivation procedure in the performance of simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology*, 38:279-286.
- Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T.I., Dale, B.E. (2004) Ammonia fiber explosion treatment of corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 115:951-964.
- Allen, S.G., Schulman, D., Lichwa, J., Antal, M.J. (2001) A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. *Industrial Engineering Chemical Research*, 40:2934-2941.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101:4851–4861.
- Antonopoulou, G., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Angelopoulos, K., Lyberatos, G. (2008) Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology*, 99:110-119.
- Awafo, V.A., Chahal, D.S., Simpson, B.K. (2000) Evaluation of combination treatments of sodium hydroxide and steam explosion for the production of cellulase-system by two *T. reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresource Technology*, 73:235-245.
- Bacovsky, D., Ludwicek, N., Sonnleitner, A., Wörgetter, M. (2011) Biofuels demoplants, <http://demoplants.bioenergy2020.eu>
- Bai, A., Lakner, Z., Marosvölgyi, B., Nábrádi, A. (2002) A biomassza felhasználása, Szaktudás Kiadó Ház, Budapest.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K. (1992) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23:257-270.
- Bailey, M.J., Buchert, J., Viikari, L. (1993) Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40:224-229.
- Bailey, M.J., Linko, M. (1990) Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in submerged bioreactor cultivation. *Journal of Biotechnology*, 16:57-66.
- Bailey, M.J., Tähtiharju, J. (2003) Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continous cultivation on lactose medium with computer controlled-feeding strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62:156-162.

- Bailey, M.J., Nevalainen, H. (1981) Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 3:153-157.
- Bals, B., Wedding, C., Balan, V., Sendich, E., Dale, B.E. (2011) Evaluating the impact of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment conditions on the cost of ethanol production. *Bioresource Technology*, 102:1277-1283.
- Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R., McHale, A.P. (1998) Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations, Part I – Yeasts in general. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14:809-821.
- Barron, N., Marchant, R., McHale, L., McHale, A.P. (1995) Studies on the use of a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* in simultaneous saccharification and ethanol formation from cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43:518-520.
- Bastioli, C. (1998) Properties and applications of Mater-Bi starch based materials. *Polymer Degradation and Stability*, 59:263-272.
- Belayachi, L., Delmas, M. (1997) Sweet sorghum bagasse: A raw material for the production of chemical paper pulp. *Industrial Crops and Products*, 6:229-232.
- Benkő, Zs., 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.
- Berghem, L.E.R., Pettersson, G. (1974) The mechanism of enzymatic cellulose degradation. *European Journal of Biochemistry*, 46:295-305.
- Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S., Saddler, J. (2006) Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology*, 125:198-209.
- Berlin, A., Gilkes, N., Kilburn, D., Bura, R., Markov, A., Skomarovsky, A., Okunev, O., Gusakov, A., Maximenko, V., Gregg, D., Sinitsyn, A., Saddler, J. (2005) Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyse softwood substrates - evidence for the role of accessory enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 37:175-184.
- Bhat, M.K., Bhat, S. (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15:583-620.
- Biely, P. (1990) Artificial substrates for cellulolytic glycanases and their use for the differentiation of *Trichoderma* enzymes. In: Kubicek, C.P., Eveleigh, D.E., Esterbauer, H., Steiner, W., Kubicek-Pranz, E.M.: *Trichoderma reesei* cellulases, biochemistry, genetics, physiology and application. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 30-46.
- Biely, P., MacKenzie, C.R., Schneider, H. (1988) Production of acetyl xylan esterase by *Trichoderma reesei* and *Schizophyllum commune*. *Canadian Journal of Microbiology*, 34:767-772.
- Bollók, M., Réczey, K. (2000) Cellulase enzyme production by various fungal strains on different carbon sources. *Acta Alimentaria*, 29:155-168.
- Börjesson, J., Engqvist, M., Sipos, B., Tjerneld, F. (2007) Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 41:186-195.

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bindings. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Chahal, P.S., Chahal, D.S., Le, G.B.B. (1996) Production of cellulase in solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* MCG80 on wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57-58:433-442.
- Chaudhuri, B.K.; Sahai, V. (1993) Production of cellulase using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on lactose in batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39:194-196.
- Chen, S., Wayman, M. (1991) Cellulase production induced by carbon sources derived from waste newspaper. *Process Biochemistry*, 26:93-100.
- Chernoglazov, V.M.O., Ermolova, E., Klyosov, A.A. (1988) Adsorption of high purity endo-1,4- β -glucanases from *Trichoderma reesei* on components of lignocellulosic materials: cellulases, lignin and xylan. *Enzyme and Microbial Technology*, 10:503-507.
- Christiernin, M. (2006) Structure of lignins in developing xylem of Norway spruce. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44:693-699.
- Claassen, P.A.M., van Lier, J.B., Lopez Contreras, A.M., van Niel, E.W.J., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., de Vries, S.S., Weuthuis, R.A. (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Biotechnology and Biotechnology*, 52:741-755.
- Collén, A., Ward, M., Tjerneld, F., Ståbrand, H. (2001) Genetically engineered peptide fusions for improved protein partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A*, 910:275-284.
- Cox, P.W., Paul, G.C., Thomas, C.R. (1998) Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology* 144:817-827.
- Dadi, A.P., Varanasi, S., Schall, C.A. (2006) Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnology and Bioengineering*, 95: 904–910.
- Datta, R. (1981) Energy-requirements for lignocellulose pretreatment processes. *Process Biochemistry*, 16:16–19.
- Dekker, R.F.H (1987) The utilization of autohydrolysis-exploded hardwood (*Eucalyptus regnans*) and softwood (*Pinus radiata*) sawdust for the production of cellulolytic enzymes and fermentable substrates. *Biocatalysis*, 1:63-75.
- Desrochers, M., Jurasek, L., Paice, M.G. (1981) High production of β -glucosidase in *Schizophyllum commune*: Isolation of the enzyme and effect of culture filtrate on cellulose hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology* 41:222-228.
- Destexhe, A, Peckous, L., Picart, L. (2004) Using enzymes in ethanol production. *Novozymes A/S*.
- Dolciotti, I., Mambelli, S., Grandi, S., Venturi, G. (1998) Comparison of two Sorghum genotypes for sugar and fiber production. *Industrial Crops and Products*, 7:265-272.
- Domingues, F.C., Queiroz, J.A., Cabral, J.M.S., Fonseca, L.P. (2001) Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. *Biotechnology Letters*, 23:771-775.

- Doner, L.W., Chau, H.K., Fishman, M.L., Hicks, K.B. (1998) An improved process for isolation of corn fiber gum. *Cereal Chemistry*, 75:408-411.
- Doner, L.W., Hicks, K.B. (1997) Isolation of hemicellulose from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction. *Cereal Chemistry*, 74:176-181.
- Doppelbauer, R., Esterbauer, H., Steiner, W., Lafferty, R.M., Steinmüller, H. (1987) The use of lignocellulosic wastes for production of cellulases by *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26:485-494.
- Duff, S.J.B., Cooper, D.G., Fuller, O.M. (1987) Effect of media composition and growth conditions on production of cellulase and β -glucosidase by a mixed fungal fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 9:47-52.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., Heinze, T. (2005) Hemicellulose. *Advances in Polymer Science*, 186:1-67.
- Eklund, R. (1994) Ethanol from wood. An experimental study of steam pretreatment, enzymatic hydrolysis and enzyme recovery, PhD thesis, Department of Chemical Engineering I, University of Lund.
- Eklund, R., Galbe, M., Zacchi, G. (1994) The influence of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of willow prior to steam pretreatment. *Bioresource Engineering*, 52:225-229.
- Energiatermelés biomasszából, <http://www.biomasszaeromuvek.hu/energiatermeles/> altalanos (2007. november).
- Eriksson, T., Karlsson, J., Tjerneld, F. (2002a) A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (*Cel7A*) and endoglucanase I (*Cel7B*) of *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 101:41-60.
- Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F. (2002b) Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31:353-364.
- Eriksson, T., Stals, I., Collén, A., Tjerneld, F., Claeysens, M., Ståbrand, H., Brumer, H. (2004) Heterogeneity of homologously expressed *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) Cel7B catalytic module. *European Journal of Biochemistry*, 271:1266-1276.
- Esterbauer, H.S., Steiner, W., Labudova, W., Hermann, I., Hayn, A. (1991) Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*, 36:51-65.
- Fehér, A., Gyalai-Korpos, M., Réczey, K. (2010) Online fermentáció monitoring rendszer analitikai jellemzőinek meghatározása. Szakdolgozat, BME.
- Flachner, B., Brumbauer, A., Réczey, K. (1999) Stabilization of β -glucosidase in *Aspergillus phoenicis* QM 329 pellets. *Enzyme and Microbial Technology*, 24:362-367.
- Foreman, P.K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., DunnColeman, N.S., Goedegebuur, F., Houfek, T.D., England, G.J., Kelley, A.S., Meerman, H.J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares, H.A., Teunissen, P.J.M., Yao, J., Ward, M. (2003) Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:31988-31997.
- Fowler, T., Brown, R.D. (1992) The *bgl1* gene encoding extracellular beta-glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex. *Molecular Microbiology*, 6:3225-3235.

- Friedrich, J., Cimerman, A., Perdih, A. (1987) Mixed culture of *Aspergillus awamori* and *Trichoderma reesei* for bioconversion of apple distillery waste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26:299-303.
- Galbe, M., Sassner, P., Wingren, A., Zacchi, G. (2007) Process engineering economics of bioethanol production. In *Biofuels* Ed.:Olsson, L, Springer Berlin/Heidelberg, 303-327.
- Galbe, M., Zacchi, G. (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:618–628.
- Galbe, M., Zacchi, G. (2007) Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Biofuels*, 108:41–65.
- Gamerith, G., Groicher, R., Zeilinger, S., Herzog, P., Kubicek, C.P. (1992) Cellulase-poor xylanases produced by *Trichoderma reesei* RUT C-30 on hemicellulose substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38:315-322.
- Garcia-Jaldon, C., Dupeyre, D., Vignon, M.R. (1998) Fibers from semi-retted hemp bundles by steam explosion treatment. *Biomass and Bioenergy*, 14:251-260.
- Garcia-Kirchner, O., Munoz-Aguilar, M., Perez-Villalva, R., Huitron-Vargas, C. (2002) Mixed submerged fermentation with two filamentous fungi for cellulolytic and xylanolytic enzyme production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100:1105-1114.
- Garlock, R.J., Chundawat, S.P.S., Balan, V., Dale, B.E. (2009) Optimizing harvest of corn stover fractions based on overall sugar yields following ammonia fiber expansion pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*, 2:29.
- 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.
- Gáspár, M., Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K. (2005) Fractionation and utilization of corn fibre carbohydrates. *Process Biochemistry*, 40:1183-1188.
- Gerber, P.J., Joyce, T.W., Heitmann, J.A. (1997) Adsorption of *Trichoderma reesei* endoglucanase and cellobiohydrolase onto bleached kraft fibres. *Cellulose*, 4:255-268.
- Goering, H.K., van Soest, P.J. (1970) in *Agricultural Handbook* no. 379, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Washington DC, 1-20.
- Gomes, I., Gomes, J., Gomes, D.J., Steiner, W. (2000) Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and beta-glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53:461-468.
- Grajek, W. (1987) Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 26:126-129.
- Grishutin, S.G., Gusakov, A.V., Markov, A.V., Ustinov, B.B., Semenova, M.V., Sinitsyn, A.P. (2004) Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674:268-281.
- Grohman, K., Bothast, R.J. (1997) Saccharification of corn fibre by combined treatment with dilute acid and enzymes. *Process Biochemistry*, 32:405-415.
- Gutierrez-Correa, M., Portal, L., Moreno, P., Tengerdy, R.P. (1999) Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*. 68:173-178.

- Gyalai-Korpos, M., Feczák, J., Réczey, K. (2008) Sweet sorghumjuice and bagasse as a possible feedstock for bioethanol production. *Hungarian Journal of Industrial Chemistry*, 36:43-48.
- Haakana, H., Miettinen-Oinonen, A., Joutsjoki, V., Mäntylä, A., Souminen, P., Vehmaanperä, J. (2004) Cloning of cellulase genes from *Melanocarpus albomyces* and their efficient expression in *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34:159-167.
- Haapala, R., Parkkinen, E., Suominen, P., Linko, S. (1996) Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase with nylon-web immobilized and free *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, 18:495-501.
- Hägglund, E. (1951) Chemistry of wood, New York, Academic Press.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G. (2006) Bioethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24:549-556.
- Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R. (2002) Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27:1185-1193.
- Harkki, A., Mäntylä, A., Penttilä, M., Mutttilainen, S., Bühler, R., Suominen, P., Knowles, J., Nevalainen, H. (1991) Genetic engineering of *Trichoderma* to produce strains with novel cellulase profiles. *Enzyme and Microbial Technology*, 13:229-233.
- Harris, P.V., Welner, D., McFarland, K.C., Re, E., Navarro Poulsen, J-C., Brown, K., Salbo, R., Ding, H., Vlasenko, E., Merino, S., Xu, F., Cherry, J., Larsen, S., Lo Leggio, L. (2010) Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry*, 49:3305-3316.
- Hayward, T.K., Hamilton, J., Templeton, D., Jennings, E., Ruth, M., Tholudur, A., McMillan, J.D., Tucker, M., Mohagheghi, A. (1999) Enzyme production, growth, and adaptation of *T. reesei* strains QM 9414, L-27, RL-P37, and Rut C-30 to conditioned yellow poplar sawdust hydrolysate - Scientific note. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77:293-309.
- Hayward, T.K., Hamilton, J., Tholudur, A., McMillan, J.D. (2000) Improvements in titer, productivity, and yield using Solka floc for cellulase production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86: 859-874.
- Helle, S.S., Duff, S.J.B., Cooper, D.G. (1993) Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 42:611-617.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100:10-18.
- Hendy, N.A., Wilke, C.R., Blanch, H.W. (1984) Enhanced cellulase production in fedbatch culture of *Trichoderma reesei* RUT C30. *Enzyme and Microbial Technology*, 6:73-77.
- Hespell, R.B. (1998) Extraction and characterization of hemicellulose from the corn fiber produced by corn wet-milling processes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46:2615-2619.
- Himmel, M.E., Ding S-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D. (2007) Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315:804-807.

- Hogan, C.M., Mes-Hartree, M. (1990) Recycle of cellulases and the use of lignocellulosic residue for enzyme production after hydrolysis of steam-pretreated aspen wood. *Journal of Industrial Microbiology*, 6:253-262.
- Ike, M., Park, J., Tabuse, M., Tokuyasu, K. (2010) Cellulase production on glucose-based media by the UV-irradiated mutants of *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87:2059–2066.
- Ilmén, M., Saloheimo, A., Onnela, M-L., Penttilä, M.E. (1997) Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:1298-1306.
- Ilmén, M., Thrane, C., Penttilä, M. (1996) The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Molecular and General Genetics*, 251:451-460.
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59:257-268.
- Iwashita, K. (2002) Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. Review. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94:530-535.
- Johansson, G., Réczey K. (1998) Concentration and purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger* by using aqueous two-phase partitioning. *Journal of Chromatography B*, 711:161-172.
- John, M., Schmidt, J., Wandrey, C., Sahm, H. (1982) Gel chromatography of oligosaccharides up to DP 60. *Journal of Chromatography*, 247:281–288.
- Ju, L., Afolabi, O. (1999) Wastepaper hydrolysate as soluble inducing substrate for cellulase production in continuous culture of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology Progress*, 15: 91-97.
- Juhász, T., Kozma, K., Szengyel, Z., Réczey, K. (2003) Production of β -glucosidase in mixed culture of *Aspergillus niger* BKMFI 1305 and *Trichoderma reesei* Rut C30. *Food Technology and Biotechnology*, 41:49-53.
- Kaar, W.E., Holtzapple, M. (1998) Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover. *Biotechnology and Bioengineering*, 59:419–427.
- Kabel, M.A., Bos, G., Zeevalking, J., Voragen, A.G.J., Schols, H.A. (2007) Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource Technology*, 98:2034-2042.
- Kadam, K.L., Keutzer, W.J. (1995) Enhancement in cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT-C30 due to citric acid. *Biotechnology Letters*, 17:1111-1114.
- Kádár, Z., De Vrije, T., van Noordon, 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*, 113-116:497-508.
- Kádár, Z., de Vrije, T., Budde, M.A.W., Szengyel, Z., Réczey, K., Claassen, P.A.M. (2003) Hydrogen production from paper sludge hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105-108:557-566.
- Kálmán, G., Réczey, K. (2008) Consecutive aqueous extractions of wet-milled corn germ cake. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22:221-226.

- Kalogeris, E., Iniotaki, F., Topakas, E., Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B.J. (2003) Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Bioresource Technology*, 86:207-213.
- Kansoh, A.L., Essam, S.A., Zeinat, A.N. (1999) Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. *Polymer Degradation and Stability*, 63:273-278.
- Kawamori, M., Morikawa, Y., Ado, Y., Takasawa, S. (1986) Production of cellulases from alkali-treated bagasse in *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24:454-458.
- Kaya, F., Heitmann Jr., J.A., Joyce, T.W. (1995) Influence of surfactants on the enzymatic hydrolysis of xylan and cellulose. *Tappi Journal*, 78:150-157.
- Keller, A., Leupin, M., Mediavilla, V., Wintermantel, E. (2001) Influence of the growth stage of industrial hemp on chemical and physical properties of the fibres. *Industrial Crops and Products*, 13:35-48.
- Kerns, G., Dalchow, E., Klappach, G., Meyer, D. (1986) Formation and release of β -glucosidase by *Aspergillus niger* ZIMET 43746 in correlation to process operations. *Acta Biotechnologica*, 6:355-359.
- Kerns, G., Okunev, O.N., Ananin, V.M., Golovlev, E.L. (1987) Enhanced formation of β -glucosidase by *Aspergillus niger* VKMF-2092 in fed-batch operation with frequently intermittent glucose addition. *Acta Biotechnologica*, 7:535-545.
- Khan, A.W., Lamb, K.A. (1984) Use of pretreated lignocellulose for the production of cellulases. *Biotechnology Letters*, 6:663-666.
- Kirk, T.K., Jeffries, T.W. (1996) Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. *ACS Symposium Series*, 655:2-14.
- Kim, M.H., Lee, S.B., Ryu, D.D.Y. (1982) Surface deactivation of cellulase and its prevention. *Enzyme and Microbial Technology*, 4:99-103.
- Kim, S., Dale, B.E. (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 26:361-375.
- Kim, S., Holtzapple, M.T. (2005) Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*, 96:1994-2006.
- Kim, S.W., Kang, S.W., Lee, J.S. (1997) Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Bioresource Technology*, 59:63-67.
- Kim, T.H., Kim, J.S., Sunwoo, C., Lee, Y.Y. (2003) Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresource Technology*, 90:39-47.
- Kim, T.H., Lee, Y.Y. (2005) Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process. *Bioresource Technology*, 96:207-213.
- Kim, T.H., Lee, Y.Y. (2006) Fractionation of corn stover by hot-water and aqueous ammonia treatment. *Bioresource Technology*, 97:224-232.
- Kipper, K., Våljamäe, P., Johansson, G. (2005) Processive action of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is revealed as „burst” kinetics on fluorescent polymeric model substrates. *Biochemical Journal*, 385:527-535.
- Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B.K. (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66:10-26.

- Kovács, K., Megyeri, L., Szakács, G., Kubicek, C.P., Galbe, M., Zacchi, G. (2008) *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and beta-glucosidase on pretreated willow. *Enzyme and Microbial Technology*, 43:48–55.
- Kristensen, J.B., Börjesson, J., Bruun, M.H., Tjerneld, F., Jorgensen, H. (2007) Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:888-895.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdahl, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G. (1999) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microbial Technology*, 24:151-159.
- Lemaresquier, H. (1987) Inter-relationships between strains of *Saccharomyces cerevisiae* from the Champagne area and lactic acid bacteria. *Letter of Applied Microbiology*, 4:91-94.
- Levy, I., Shani, Z., Shoseyov, O. (2002) Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4- β -glucanase and cellulose-binding domains. *Biomolecular Engineering*, 19:17-30.
- Li, C., Cheng, G., Balan, V., Kent, M.S., Ong, M., Chundawat, S.P.S., Sousa, L.C., Melnichenko, Y.B., Dale, B.E., Simmons, B.A., Singh, S. (2011) Influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility of ionic liquid and AFEX pretreated corn stover. *Bioresource Technology*, 102:6928-6936.
- Li, X-L., Dien, B.S., Cotta, M.A., Wu, Y.V., Saha, B.C. (2005) Profile of enzyme production by *Trichoderma reesei* grown on corn fiber fractions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124:321-334.
- Lin, Y., Tanaka, S. (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69:627-642.
- Linde, M., Jakobsson, E-L., Galbe, M., Zacchi, G. (2008) Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 32:326-332.
- Linden, J.C. (1982) Immobilized β -D-galactosidase in the sugar beet industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 4:130-136.
- Linder, M., Teeri, T.T. (1997) The roles and function of cellulose binding domains. *Journal of Biotechnology*, 57:15-28.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurements with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.
- Lu, Y., Yang, B., Gregg, D., Saddler, J.N., Mansfield, S. (2002) Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98–100:641-654.
- Lu-Kwang, J., Afolabi, O.A. (1999) Wastepaper hydrolysate as soluble inducing substrate for cellulase production in continuous culture of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology Progress*, 15:91-97.
- Lundqvist, J., Jacobs, A., Palm, M., Zacchi, G., Dahlman, O., Stålbrand, H. (2003) Characterization of galactoglucomannan extracted from spruce (*Picea abies*) by heat-fractionation at different conditions. *Carbohydrate polymers*, 51:203-211.
- Lundqvist, J., Teleman, A., Junel, L., Zacchi, G., Dahlman, O., Tjerneld, F., Stålbrand, H. (2002) Isolation and characterization of galactoglucomannan from spruce (*Picea abies*). *Carbohydrate Polymers*, 48:29-39.

- Lynd, L.R. (1996) Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy. *Annual Review of Energy and the Environment*, 21:403–465.
- Lynd, L.R., Lyford, K., South, C.R., Levenson, K. (2001) Evaluation of paper sludge for amenability to enzymatic hydrolysis and conversion to ethanol. *TAPPI Journal*, 84:50-55.
- Lynd, L.R., Wyman, C.E., Gerngross, T.U. (1999) Biocommodity engineering. *Biotechnology Progress*, 15:777-793.
- Mach, R.L., Zeilinger, S. (2003) Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60:515-522.
- Maheswari, D.K., Jahan, H., Paul, J., Varma, A. (1993) Wheat straw, a potential substrate for cellulase production using *Trichoderma reesei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9:120–121.
- Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C. (1976) Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6:21-33.
- Mandels, M. (1975) Microbial sources of cellulase. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 5:81-105.
- Mandels, M., Weber, J. (1969) The production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*, 95:391-414.
- Mansfield, S.D., Mooney, C., Saddler, J.N. (1999) Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*, 15:804–816.
- Mansfield, S.D., Wong, K.K.Y. (1999) Improving the physical properties of linerboard via cellulolytic treatment of the recycled paper component. *Progress in Paper Recycling*, 9:20–29.
- Margolles-Clark, E., Ilmén, M., Penttilä, M. (1997) Expression patterns of the hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Journal of Biotechnology*, 57:167-179.
- Markov, A.V., Gusakov, A.V., Kondratyeva, E.G., Okunev, O.N., Bekkarevich, A.O., Sinitsyn, A.P. (2005) New effective method for analysis of the component composition of enzyme complexes from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry*, 70:657-663.
- Marten, M.R., Velkovska, S., Khan, S.A., Ollis, D.F. (1996) Rheological, mass transfer and mixing characterization of cellulase producing *Trichoderma reesei* suspensions. *Biotechnology Progress*, 12:602-611.
- Martino, A., Pifferi, P.G., Spagna, G. (1994) Production of β -glucosidase by *Aspergillus niger* using carbon source derived from agricultural wastes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 60:247-252.
- McMillan, J.D. (1994) Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P.: Enzymatic conversion of biomass for fuels production. American Chemical Society, Washington, DC, 292-324.
- Medve, J., Karlsson, J., Lee, D., Tjerneld, F. (1998) Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: Adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 59:621-634.

- Merivuori, H., Tornkvist, M., Sands, J.A. (1990) Different temperature profiles of enzyme secretion by two common strains of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology Letters*, 12:117-120.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428.
- Miller, G.L. (1963) Cellodextrins. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 3:134-139.
- Montenecourt, B.S., Eveleigh, D.E. (1979) Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. *Advances in Chemistry Series, American Chemical Society*, 181:289-301.
- Monti, A., Di Virgilio, N., Venturi, G. (2008) Mineral composition and ash content of six major energy crops. *Biomass and Bioenergy*, 32:216-223.
- Monti, A., Venturi, G. (2003) Comparison of the energy performance of fibre sorghum, sweet sorghum and wheat monocultures in northern Italy. *European Journal of Agronomy*, 19:35-43.
- Morikawa, Y., Takasawa, S., Masunaga, I., Takayama, K. (1985) Ethanol production from D-xylose and cellobiose by *Kluyveromyces cellobiovorus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 27:509-513.
- Moxley, G., Zhu, Z., Zhang, Y.-H.P. (2008) Efficient sugar release by the cellulose solvent-based lignocellulose fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:7885-7890.
- Mukhopadhyay, S., Nandi, B. (1999) Optimization of cellulase production by *Trichoderma reesei* ATCC 26921 using a simplified medium on water hyacinth biomass. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 58:107-111.
- Narendranath, N.V., Hynes, S.H., Thomas, K.C., Ingledew, W.M. (1997) Effects of lactobacilli on yeast-catalysed ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:4158-4163.
- Negro, M.J., Solano, M.L., Ciria, P., Carrasco, J. (1999) Composting of sweet sorghum bagasse with other wastes. *Bioresource Technology*, 67:89-92.
- Nghiem, N.P., Montani, J., Johnston, D. (2009) Production of Astaxanthin from corn fiber as a value-added co-product of fuel ethanol fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 154:48-58.
- Nguyen, O.A., Saddler, J.N. (1991) An integrated model for the technical and economical evaluation of an enzymatic biomass conversion process. *Bioresource Technology*, 35:275-282.
- Nilsson, U., Barron, N., McHale, A.P. (1995) The effects of phosphoric acid pretreatment on conversion of cellulose to ethanol at 45°C using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Biotechnology Letters*, 17:985-988.
- Nykter, M., Kymäläinen, H.-R., Thomsen, A.B., Lilholt, H., Koponen, H., Sjöberg, A.-M., Thygesen, A. (2008) Effects of thermal and enzymatic treatments and harvesting time on the microbial quality and chemical composition of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). *Biomass and Bioenergy*, 32:392-399.
- Oksanen, T., Pere, J., Buchert, J., Viikari, L. (1997) The effect of cellulases and hemicellulases on the paper properties of never-dried bleached kraft pulp. *Cellulose*, 4:329-339.

- Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G. (2008) A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1:1-14.
- Olsson, L., Christensen, T.M.I.E., Hansen, K.P., Palmqvist, E.A. (2003) Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, 33:612-619.
- Öhgren, K. (2006) Fuel ethanol production from corn stover – Optimization of steam pretreatment and improvement of simultaneous saccharification and fermentation, PhD thesis, Department of Chemical Engineering, Lund University, Lund, Svédország.
- Öhgren, K., Bengtsson, O., Gorwa-Grauslund, M.F., Galbe, M., Hahn-Hägerdal, B., Zacchi, G. (2006a) Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology*, 126:488-498.
- Öhgren, K., Bura, R., Saddler, J., Zacchi, G. (2007a) Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology*, 98:2503-2510.
- Öhgren, K., Galbe, M., Zacchi, G. (2005) Optimization of steam pretreatment of SO₂-impregnated corn stover for fuel ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124:1055-1067.
- Öhgren, K., Rudolf, A., Galbe, M., Zacchi, G. (2006b) Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass and Bioenergy*, 30:863-869.
- Öhgren, K., Vehmaanperä, J., Siika-aho, M., Galbe, M., Viikari, L., Zacchi, G. (2007b) High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:607-613.
- Palm, M., Zacchi, G. (2003) Extraction of hemicellulosic oligosaccharides from spruce using microwave oven or steam treatment. *Biomacromolecules*, 4:617-623.
- Palmqvist, E. (1996) The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 19:470-476.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000a) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I.: inhibition and detoxification. *Bioresource Tehnology*, 74:17-24.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000b) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II.: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Tehnology*, 74:25-33.
- 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.
- Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., Tenkanen, M. (2004) Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *Journal of Biotechnology*, 107:65-72.
- Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P. (2003) Production of cellulytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium osysporum* grow on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 18:37-45.

- Penttilä, M., Lehtovaara, P., Nevalainen, H., Bhikhabhai, R., Knowles, J. (1986) Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene*, 45:252-263.
- Pere, J., Siika-aho, M., Buchert, J., Viikari, L. (1995) Effects of purified *Trichoderma reesei* cellulases on the fiber properties of kraft pulp. *Tappi Journal*, 78:71-78.
- Persson, I., Tjerneld, F., Hahn-Hägerdal, B. (1991) Fungal cellulolytic enzyme-production - A review. *Process Biochemistry*, 26:65-74.
- Poutanen, K., Puls, J. (1988) Characteristics of *Trichoderma reesei* β -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28:42-432.
- Poutanen, K., Rättö, M., Puls, J., Viikari, L. (1987) Evaluation of different microbial xylanolytic systems. *Journal of Biotechnology*, 6:49-60.
- Poutanen, K., Sundberg, M., Korte, H., Puls, J. (1990) Deacetylation of xylans by acetyl esterases of *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33:506-510.
- Puls, J., Poutanen, K., Kürner, H-U., Viikari, L. (1985) Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22:416-423.
- Puri, V.P., Mamers, H. (1983) Explosive pretreatment of lignocellulosics residues with high pressure carbon dioxide for the production of fermentation substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 25:3149-3161.
- Pushalkar, S., Rao, K.K., Menon, K. (1995) Production of β -glucosidase by *Aspergillus terreus*. *Current Microbiology*, 30:255-258.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H., Boerjan, W. (2004) Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews*, 3:29-60.
- Ramos, L.P. (2003) The chemistry involved in the steam pretreatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26:863-871.
- Rao, R.S., Jyothi, Ch.P., Prakasham, R.S., Sarma, P.N., Rao, L.V. (2006) Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. *Bioresource Technology*, 97:1974-1978.
- Réczey, K., Persson, I., Tjerneld, F., Hahn-Hägerdal, B. (1989) In situ immobilized β -glucosidase from *Aspergillus phoenicis* QM 329. *Biotechnology Techniques* 3:205-210.
- Réczey, K., Stålbrand, H., Persson, I., Hahn-Hägerdal, B., Tjerneld, F. (1990) Continuous cellobiose hydrolysis using self-immobilized β -glucosidase from *Aspergillus phoenicis* QM 329 in fluidized-bed reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24:637-649.
- Reese, E.T. (1980) Inactivation of cellulase by shaking and its prevention by surfactants. *Journal of Applied Biochemistry*, 2:36-39.
- Roche, N., Berna, P., Desgranges, C., Durand, A. (1995) Substrate use and production of α -L-arabinofuranosidase during solid-state culture of *Trichoderma reesei* on sugar beet pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 935-941.
- Rutenberg, M.W., Herbst, W. (1957) Process for extraction of hemicellulose. U.S. patent 2,801,955.
- Ryu, D.D.Y., Mandels, M. (1980) Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 2:91-102.

- Saddler, J.N. (1982) Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase enzyme system. *Enzyme and Microbial Technology*, 4:414-418.
- Saddler, J.N., Brownell, H.H., Clermont, L.P., Levitin, N. (1982) Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. *Biotechnology and Bioengineering*, 24:1389-1402.
- Saddler, J.N., Ramos, L.P., Breuil, C. (1993) Steam pretreatment of lignocellulosic residues. In: Bioconversion of forest and agricultural plant residues. CAB International, Wallingford, UK, Chapter 3, 73-92.
- Saloheimo, A., Henrissat, B., Hoffrén, A-M., Teleman, O., Penttilä, M. (1994) A novel, small endoglucanase gene, egI5, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. *Molecular Microbiology*, 13:219-228.
- Saloheimo, M., Lehtovaara, P., Penttilä, M., Teeri, T.T., Ståhlberg, J., Johansson, G., Pettersson, G., Claeyssens, M., Tomme, P., Knowles, J.K.C. (1988) EG III, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme. *Gene*, 63:11-21.
- Saloheimo, M., Nakari-Setälä, T., Tenkanen, M., Penttilä, M. (1997) cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. *European Journal of Biochemistry*, 249:584-591.
- Sandgren, M., Stahlberg, J., Mitchinson, C. (2005) Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 89:246-291
- Sassner, P., Galbe, M., Zacchi, G. (2005) Steam pretreatment of *Salix* with and without SO₂ impregnation for production of bioethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124:1101-1117.
- Saulnier, L., Marot, C., Chanliaud, E., Thibault, J.F. (1995) Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. *Carbohydrate Polymers*, 26:279-287.
- Schell, D.J., Walter, P.J., Johnson, D.K. (1992) Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover at high solids concentrations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 34-35:659-665.
- Schmidt, A.S., Thomsen, A.B. (1998) Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. *Bioresource Technology*, 64:139-151.
- Schmoll, M., Kubicek, C.P. (2003) Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus. A review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 50:125-140.
- Schultz, T.P., Biermann, C.J., McGinnis, G.D. (1983) Steam explosion of mixed hardwood chips as a biomass pretreatment. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, 22:344-348.
- Schulze, E. (1891) Information regarding chemical composition of plant cell membrane. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 24:2277-2287.
- SciDAC review, <http://www.scidacreview.org/0905/html/biofuel.html> (2009)
- Selig, M.J., Knoshaug, E.P., Adney, W.S., Himmel, M.E., Decker, S.R. (2008) Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. *Bioresource Technology*, 99:4997-5005.

- Sen, D.C. (1989) Ethanol fermentation, In: Kitani, O., Hall, C.W., eds Biomass Handbook, New York, Gordon and Breach Science Publishers, 254-270. Anyagok és módszerekénél!
- Sendelius, J. (2005) Steam pretreatment optimisation for sugarcane bagasse in bioethanol production. Department of Chemical Engineering, Lund, Sweden. Master of Science Thesis.
- Shaker, H.S., Farid, M.A., El-Diwany, A.I. (1984) Optimalization of the composition of the nutrient medium for cellulase and protein biosynthesis by thermophilic *Aspergillus fumigatus* NRC 272. *Enzyme and Microbial Technology*, 6:212-216.
- Shin, C.S., Lee, J.P., Lee, J.S., Park, S.C. (2000) Enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 on various lignocellulosic substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86:237-245.
- Shin, S-J, Sung, Y.J. (2008) Improving enzymatic hydrolysis of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by electron beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 77:1034-1038.
- Shoemaker, S., Schweickart, V., Ladner, M., Gelfand, D., Kwok, S., Myambo, K., Innis, M. (1983) Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/Technology*, 1:691-696.
- Singh, V., Johnston, D.B., Moreau, R.A., Hicks, K.B., Dien, B.S., Bothast, R.J. (2003) Pretreatment of wet-milled corn fiber to improve recovery of corn fiber oil and phytosterols. *Cereal Chemistry*, 80:118-122.
- Sipos, B., Szilágyi, M., Sebestyén, Z., Perazzini, R., Dienes, D., Jakab, E., Crestini, C., Réczey, K. (2011) Mechanism of the positive effect of poly(ethylene-glycol) addition in enzymatic hydrolysis of steam pretreated lignocelluloses. *Comptes Rendus Biologies*, 334:812-823.
- Skory, C.D., Freer, S.N., Bothast, R.J. (1996) Properties of an intracellular beta-glucosidase purified from the cellobiose-fermenting yeast *Candida wickerhamii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46:353-359.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. (2008) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomasse. Laboratory Analytical Procedure NREL/TP-510-42618, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.
- Smits, J.P., Rinzema, A., Tramper, J., Sonsbeek, H.M.V., Knol, W. (1996) Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46:489-496.
- Soós, N., Szengyel, Z., Réczey, K. (2004) Energiafű felhasználása alternatív energiaforrásként. *Műszaki Kémiai Napok'04, Veszprém, Konferencia kiadvány*, 148-152.
- Sørensen, H.R., Pedersen, S., Meyer, A.S. (2007) Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:908-918.
- Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M., Zacchi, G. (2003) Combined use of H₂SO₄ and SO₂ for steam pretreatment of spruce in ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105-108:127-140.
- Spagna, G., Barbagello, R., Palmeri, R., Restuccia, C., Giudici, P. (2002) Properties of endogenous β -glucosidase of *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme and Microbial Technology*, 31:1036-1041.

- Spindler, D., Wyman, C.E., Grohman, K. (1990) Evaluation of pretreated herbaceous crops for simultaneous saccharification and fermentation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24-25:275-286.
- Spindler, D., Wyman, C.E., Grohman, K., Mohagheghi, A. (1989) Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol with selected yeast strains and β -glucosidase supplementation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 20-21:529-540.
- Sree, N.K., Sridhar, M., Rao, L.V., Pandey, A. (1999) Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast. *Process Biochemistry*, 34:115-119.
- Srivastava, S.K., Gopalkrishnan, K.S., Ramachandran, K.B. (1987) The Production of β -glucosidase in shake-flasks by *Aspergillus wentii*. *Journal of Fermentation Technology*, 65:95-99.
- Ståhlberg, J., Johansson, G., Pettersson, G. (1991) A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose based on the 2-domain structure of cellobiohydrolase I. *Biotechnology*, 9:286-290.
- Stålbrand, H., Siika-aho, M., Tenkanen, M., Viikari, L. (1993) Purification and characterisation of two β -mannanase from *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 29:229-242.
- Stenberg, K. (2000) Ethanol from softwood. Process development based on steam pretreatment and SSF. PhD thesis, Lund University.
- Stenberg, 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.
- Stenberg, K., Tenborg, C., Galbe, M., Zacchi, G. (1998) Optimisation of steam pretreatment of SO₂ impregnated mixed softwoods for ethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 71:299-308.
- Sternberg, D. (1976) Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6:35-53.
- Sternberg, D., Mandels, G.R. (1979) Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *Journal of Bacteriology*, 139:761-769.
- Sternberg, D., Vijayakumar, P., Reese, E.T. (1977) Beta-glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Canadian Journal of Microbiology*, 23:139-147.
- Struik, P.C., Amaducci, S., Bullard, M.J., Stutterheim, N.C., Venturi, G., Cromack, H.T.H. (2000) Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe. *Industrial Crops and Products*, 11:107-118.
- Subramanian, S., Prema, P. (2002) Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22:33-64.
- Suhas, S.P.J.M.C., Carrott, R.M.M.L. (2007) Lignin - from natural adsorbent to activated carbon: A review. *Bioresource Technology*, 98:2301-2312.
- Sun, Y., Cheng, J.Y. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology*, 83:1-11.

- Sutcliffe, R., Saddler, J.N. (1986) The role of lignin in the adsorption of cellulases during enzymatic treatment of lignocellulosic material. *Biotechnology and Bioengineering Symposium Series*, 17:749-762.
- Suto, M., Tomita, F. (2001) Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. Review. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92:305-311.
- Suurnäkki, A., Tenkanen, M., Siika-aho, M., Niku-Paavola, M-L., Viikari, L., Buchert, J. (2000) *Trichoderma reesei* cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp. *Cellulose*, 7:189-209.
- Szakács, G. Tengerdy, R.P. (1996) Production of cellulase and xylanase with selected filamentous fungi by solid substrate fermentation. In: *Enzymes for Pulp and Paper Processing* (Eds. Jeffries, T.W., Viikari, L.), ACS Symposium Series 655, American Chemical Society, Washington, D.C., 13:175-182.
- Szengyel, Z., Zacchi, G. (2000) Effect of acetic acid and furfural on cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C30. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 89:31-42.
- Szjártó, 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.
- Tabka, M.G., Herpoël-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M., Sigoillot, J.C. (2006) Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:897-902.
- Taherzadeh, M.J., Niklasson, C., Lidén, G. (1997) Acetic acid- friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*? *Chemical Engineering Science*, 52:2653-2659.
- Takács, E., Wojnarovits, L., Földváry, C., Hargittai, P., Borsa, J., Sajó, I. (2000) Effect of combined gamma-irradiation and alkali treatment on cotton-cellulose. *Radiation Physics and Chemistry*, 57:399-403.
- Tangu, K.S., Blanch, H.W., Charles, R.W. (1981) Enhanced production of cellulase, hemicellulase, and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* (Rut C-30). *Biotechnology and Bioengineering*, 23:1837-1849.
- Teeri, T., Lehtovaara, P., Kauppinen, S., Salovuori, I., Knowles, J. (1987) Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene*, 51:43-52.
- Teeri, T., Salovuori, I., Knowles, J. (1983) The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology*, 1:696-699.
- Tenborg, C., Stenberg, K., Galbe, M., Zacchi, G., Larsson, S., Palmquist, E., Hahn-Hägerdal, B. (1998) Comparison of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72:3-15.
- Tengborg, C., Galbe, M., Zacchi, G. (2001) Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Biotechnology Progress*, 17:110-117.
- Teymouri, F., Laureano-Péres, L., Alizadeh, H., Dale, B.E. (2005) Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*, 96:2014-2018.

- Torget, R., Walter, P., Himmel, M., Grohmann, K. (1991) Dilute-acid pretreatment of corn residues and short rotation woody crops. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28-29:75-86.
- Tran, A.V., Chambers, R. (1985) Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stibitis* CBS 5776. *Enzyme and Microbial Technology*, 8:439-444.
- Tu, M., Zhang, M., Paice, McFarlane, P., Saddler, J.N. (2009) The potential of enzyme recycling during the hydrolysis of mixed softwood feedstock. *Bioresource Technology*, 100:6407-6415.
- Valanskova, V., Snajdr, J., Bittner, B., Cajthaml, T., Merhautova, V., Hofrichter, M., Baldrian, P. (2007) Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. *Soil Biology & Biochemistry*, 39:2651-60.
- van Walsum, G.P., Allen, S.G., Spencer, M.J., Laser, M.S., Antal, M.J., Lynd, L.R. (1996) Conversion of lignocelluloses pretreated with liquid hot water to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57-58:157-170.
- 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.
- Veiga, M.C., Soto, M., Méndez, R., Lema, J.M. (1990) A new device for measurement and control of gas production by bench scale anaerobic digesters. *Water Research*, 24:1551-1554.
- Vignon, M., Garcia-Jaldon, C., Dupeyre, D. (1995) Steam explosion of woody hemp chenevotte. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17:395-404.
- Vincken, J.P., Beldman, G., Voragen, A.G.J. (1997) Substrate specificity of endoglucanases: What determines xyloglucanase activity? *Carbohydrate Research*, 298:299-310.
- Vlaev, S.D., Djejeva, G., Raykovska, V., Schügerl, K. (1997) Cellulase production by *Trichoderma* sp. grown on corn fibre substrate. *Process Biochemistry*, 32: 561-565.
- Walseth, C.S. (1952) Occurrence of cellulases in enzyme preparations from microorganisms. *TAPPI Journal*, 35:228-233.
- Ward, M., Wu, S., Dauberman, J., Weiss, G., Larenas, E., Bower, B., Clarkson, K., Bott, R. (1993) Cloning, sequence and preliminary structural analysis of a small, high pI endoglucanase (EG III) from *Trichoderma reesei*. In: Proceedings of the second TRIEL symposium on *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases. Espoo, Finland. 153-158.
- Wase, D.A.J., Raymahasay, S., Wang, C.W. (1985) Production of β -D-glucosidase, endo-1,4- β -D-glucanase and D-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI 255091. *Enzyme and Microbial Technology*, 7:225-229.
- Watson, M.E., Galliher, T.L. (2001) Comparison of Dumas and Kjeldahl methods with automatic analysers on agricultural samples under routine rapid analysis conditions. *Communications in soil science and plant analysis*, 32:2007-2019.
- Watson, S.A., Williams, C.B. (1959) Process for extracting hemicellulose from corn coarse fiber. U.S. patent 2,868,778.
- Wayman, M., Chen, S. (1992) Cellulase production by *Trichoderma reesei* using whole wheat flour as carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 14:825-831.

- Whittaker, R.H., Likens, G.E. (1975) The biosphere and man. In: Leith, H., Whittaker, R.H.: Primary productivity of the biosphere. Springer-Verlag, Berlin, Ecological Studies, 14:305-328.
- Wood, T.M. (1997) Preparation of crystalline, amorphous and dyed cellulase substrates. *Methods in Enzymology*, 160:19-25.
- Wyman, C.E. (1996) Ethanol production from lignocellulosic biomass: Overview. In: Wyman C.E.: Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor and Francis, Bristol, PA, 1-18.
- Wyman, C.E. (2007) What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology*, 25:153-157.
- Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y. (2005) Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96:1959-1966.
- Wyman, C.E., Spindler, D.D., Grohmann, K. (1992) Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 3:301-307.
- Xia, L., Cen, P. (1999) Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry*, 34:909-912.
- Xin, Z., Yinbo, Q., Peiji, G. (1993) Acceleration of ethanol-production from paper-mill waste fiber by supplementation with beta-glucosidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 15:62-65.
- Xiao-Bin, Y., Yun, H.S., Koo, Y.M. (1998) Production of cellulase by *Trichoderma reesei* RUT C30 in wheat bran containing media. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8:208-213.
- Yang, B., Wyman, C.E. (2006) BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 94:611-617.
- Yang, B., Wyman, C.E. (2008) Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 2:26-40.
- Yu, J., Zhang, X., Tan, T. (2007) A novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *Journal of Biotechnology*, 129:415-420.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., Olsson, L. (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56:17-34.
- Zeilinger, S., Kristufek, D., Aristan-Atac, I., Hodits, R., Kubicek, C.P. (1993) Conditions of formation, purification and characterization of an α -galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C30. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:1347-1353.
- Zhang, Y.H.P. (2008) Reviving the carbohydrate economy via multiproduct biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35:367-375.
- Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R. (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88:797-824.

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zhang, X., Wang, C., Yu, F., Jin, S. (2006) Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. *Process Biochemistry*, 41:869-873.

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zhang, X., Wang, C., Yu, F., Jin, S., Zhao, Y., Tu, S., Xue, Y. (2005) Simultaneous saccharification and fermentation of microwave / alkali pre-treated rice straw to ethanol. *Biosystems Engineering*, 92:229-235.