



SZÉNHIDRÁTTARTALMÚ HULLADÉKOK ENZIMES BONTÁSA

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Készítette:

FILUS ERIK

SPROCH RÓBERT

Biomérnök BSc hallgató

Konzulens:

Prof. Dr. Hodúr Cecilia *egyetemi tanár*

2012

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	4
2. CÉLKITŰZÉS	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
3.1. Biomassza	7
3.2. Bio-hajtóanyagok	10
3.2.1 Bioetanol előállítása	11
3.3 Cukorrépa.....	13
3.4 Cellulóz.....	14
3.5. Enzimek	14
3.5.1 Cellulóz-bontó szervezetek	15
3.5.2 Cellulóz-bontó enzimek	16
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
4.1. Felhasznált alapanyag	18
4.2. Bioreaktor	19
4.3. Alkalmazott enzimek	20
4.4. Cukrosítási eljárás	21
4.5. Cukor tartalom mérése.....	22
4.6 Mikrohullámú készülék	22

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK.....	24
5.1 Enzimes lebontás vizsgálata	24
5.2 Enzim mennyiség hatásának vizsgálata	26
5.3 Enzimarány hatásának vizsgálata	26
5.4. Részecskeméret hatása	28
5.5 Mikrohullámú előkezelés vizsgálata	30
5.6 Együttes hatás vizsgálata	31
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	32
IRODALOMJEGYZÉK	34
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	36

BEVEZETÉS

A világ, az emberiség energiafogyasztása erőteljesen növekszik. A növekedő igények alapvetően két fő okra vezethetők vissza. Az egyik az, hogy a fejlődő országok jelenleg a világ teljes energiafelhasználásából csak mintegy 20-25%-ban részesednek, de népességük a világ népességének 75-80%-át teszi ki, így a fejlődésükhöz - részesedésük arányában - egyre több energiára van és lesz szükségük. A következő számot tevő probléma pedig az, hogy a világ népessége 50 év alatt - vélhetően – megduplázódhat, ez a növekedés várhatóan a fejlődő országokban megy végbe nagyobb mértékben. Az ilyen mértékű fejlődés a szükséges energiaigényeket jelentősen növeli. (Halász, Hannus és Kiricsi, 2007)

Az emberi civilizáció nagymértékben függ az energia-ellátottságtól, állandó energia-utánpótlásra van szükség, hiszen a nagyvárosok, a közlekedési hálózatok, az ipari és mezőgazdasági létesítmények energia nélkül megbénulnának. Az igények és a lélekszám növekedésével az energiatermelés és felhasználás környezetünk elszennyeződésével jár, így minden egyes energiahordozó használatakor figyelembe kell vennünk azok környezeti hatásait is.

A legfőbb probléma tehát az, hogy miképpen egyeztethetők össze a véges energiaforrások iránti egyre növekvő igények és a környezetvédelmi követelmények. „A fenntarthatóság az emberiség jelen szükségleteinek kielégítése, a környezetnek és a természeti erőforrásoknak a jövő generációk számára történő megőrzésével egyidejűleg.” (Átmenet a fenntarthatóságba: A Világ Tudományos Akadémiáinak Deklarációja, Tokió, 2000)

Az emberiség energiaproblémáját nem az jelenti, hogy az eddig elhasznált energiamennyiség túl nagy lenne, hiszen a Föld energiamérlegét tekintve az általunk felhasznált energiakészletek mennyisége elhanyagolható a beérkező illetve távozó energiákhoz képest. Ebben az esetben a problémát az jelenti, hogy a gazdaságosan felhasználható, megfelelő sűrűségű energiakészletek vannak fogytán. Ez kiegészül azzal, hogy bármilyen kitermelés általi környezetbe való beavatkozás környezetszennyezéssel jár, ezért törekedni kell a készletek célszerű és gazdaságos felhasználására, ezen kívül pedig új, alternatív energiaforrások bevezetésére, alkalmazására. „A kőkorszak sem azért ért véget, mert elfogyott a kő, az olajkorszaknak sem azért lesz vége, mert elfogy a kőolaj!” (Sheik Yamani, volt olajminiszter, Szaúd-Arábia)

A fosszilis tüzelőanyagoktól eltérő, gazdaságilag hasznosítható energiafajtákat tekintjük alternatív energiaforrásoknak. Ilyen a nap-, szél-, vízenergia, a foto-elektromos energiatermelés, a geotermikus energia, az atomenergia és a biomassza energetikai hasznosítása is. Ezek között is

megkülönböztetünk megújuló és kimerülő (hasadóképes nukleáris anyagok, geotermikus hőraktárak) energiaforrásokat. (Halász, Hannus és Kiricsi, 2007)

A megújuló energiaforrások között az egyik legjelentősebb a biomassza felhasználása lehet, alkalmazhatósága mindenesetre igen sokrétű. Egyes becslések szerint a Földön évente keletkező biomassza tömege meghaladja a 165 milliárd tonnát, ennek energiatartalma közel 3000 exajoule. Ez kb. tízszerese a világ jelenlegi energiaigényének. A fejlődési lehetőségeket mutatja, hogy ennek a hatalmas mennyiségnek csupán 1%-át használják energiatermelésre, és másik 1%-át élelmezésre. Az energianyerés történhet közvetlen tüzeléssel, száraz tüzelőanyag formában, elgázosítás útján gáz tüzelőanyagként használható fel, és bizonyos fizikai-kémiai, illetve biokémiai átalakítások útján állíthatunk elő biomasszából folyékony tüzelőanyagot, üzemanyagokat, melyek helyettesíthetik a fosszilis üzemanyagokat. Az ily módon előállított bio-üzemanyagok elégetésénél is történik szén-dioxid kibocsátás, ugyanúgy, mint a fosszilis hajtóanyagoknál, de csak annyi szén-dioxid szabadul fel az égés során, amely mennyiséget az a növény felvett a környezetéből, amelyikből a kiindulási biomassza keletkezett. Tehát ilyen értelemben környezetbarát a folyamat. (Tóth és Sembery, 2004)

A meglevő fosszilis üzemanyag mellett illetve helyett bio-üzemanyagok használata nem új keletű módja a különböző gépjárművek, ipari berendezések hajtásának. Magyarországon már 1927 körül alkalmaztak fermentációval készített alkoholt motorhajtóanyagként (20% alkoholt keverték a benzinnel). Azonban az akkoriban még olcsó és stabil kőolajárak mellett, a költséges fermentációs eljárást nem részesítették előnyben az európai országok, így 1942-ben hazánkban is befejezték az értékesítését. Majd az 1973-as energiaválságot követően kerülhetett újra előtérbe az etanol alkalmazása, köszönhetően az addig továbbfejlődött fermentációs technológiának. A szintetikus előállításnál már gazdaságilag is kifizetődőbb volt fermentációval etanolt készíteni. (Bai, 2002)

2. CÉLKITŰZÉS

Bioetanolt előállíthatunk minden szénhidrát tartalmú anyagból, így pl. cukortartalmú növényekből (cukorrépa, cukorcirok, kukorica), keményítő tartalmú terményekből (kukorica, búza) és lignocellulóz tartalmú anyagokból (fás szárú növények, ipari melléktermékek) is.

A kísérleteink során, az Újvidéki Egyetemen (University of Novi Sad, Faculty of Technology) folytatott közös munka alapján, alapanyagként cukorrépa pelletet alkalmaztunk. A felhasznált alapanyag a cukorgyáraknál keletkező melléktermékből készül, és alkalmas más cellulóz tartalmú hulladékok modellezésére.

A kísérleteink fő célja az volt, hogy a cukorgyártás melléktermékeként keletkező hulladék, lignocellulóz alapanyagból, egy, a bioetanol gyártáshoz kellően tömény cukoroldatot állítsunk elő, lehetőleg minél kevesebb energia-befektetéssel, az ehhez szükséges optimális paramétereket meghatározzuk úgy, hogy mindez gazdasági szempontból is kedvező legyen.

Kísérleteink során a cellulóztartalmú alapanyag enzim hidrolízisét végeztük celluláz és cellobiáz enzimek segítségével, eközben a bontás során keletkező cukor oldat koncentrációjának növekedését, és a cukrosodás mértékét követtük nyomon.

Az első szakaszban készített cukros oldatokkal részben enzim visszanyerés, részben töményítés céljából további kísérleteket folytattunk. Ez a két kutatási folyamat tehát szorosan összefügg, céljuk egyaránt a bioetanol előállítás gazdaságosabb formájának megtalálása még a fermentáció előtti előkészítő lépések fejlesztésével.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Biomassza

A hatalmas mennyiségekben jelen lévő biomassza megújuló energiaforrásnak számít, mivel a növények fotoszintézise útján keletkezik, ami napsugárzás hatására megy végbe. A biomassza fogalmát más-más tudomány területeken más-más módon fogalmazzák meg és értelmezik. A következőkben két definíciót ismertetünk, az elsőben egy természettudós által megfogalmazott, környezetvédelmi szempontból történő megközelítést, amely a Környezetvédelmi Lexikonban található meg, majd Dr. Giber János, energetikai szakember, definícióját mutatjuk be.

„A biomassza biológiai eredetű szervesanyag-tömeg, egy biocönózisban vagy biomban, a szárazföldön és vízben található élő és nemrég elhalt szervezetek (növények, állatok, mikroorganizmusok) testtömege; biotechnológiai iparok termékei; és a különböző transzformálók (ember, állatok, feldolgozó iparok stb.) összes biológiai eredetű terméke, hulladéka, mellékterméke. Az ember testtömegét nem szokás a biomassza fogalmába vonni. A növényi biomassza a fitomassza, az állati biomassza a zoomassza.”

„A termelési-felhasználási láncban elfoglalt helyük alapján a biomassza lehet elsődleges, másodlagos és harmadlagos. Az elsődleges biomassza a természetes vegetáció, szántóföldi növények, erdő, legelő, kertészeti növények, vízben élő növények. A másodlagos biomassza az állatvilág, gazdasági haszonállatok összessége, továbbá az állattenyésztés fő termékei, melléktermékei, hulladékai. A harmadlagos biomassza a biológiai eredetű anyagokat felhasználó iparok termékei, melléktermékei, hulladékai, emberi települések szerves eredetű szerves hulladékai.” (Környezetvédelmi Lexikon)

Hazánkban évente szárazanyagban kb. 53 millió tonnát termelnek a vadon élő és gazdasági növények, amelynek több mint a fele melléktermék, illetve hulladék. Ezek hasznosítására igen sok lehetőség kínálkozik: talajjavítás, trágyázás, energianyerés, takarmányozás, biotechnológiai hasznosítás, kémiai átalakítás (ipari nyersanyagként) stb. ezek jobb kiaknázása a következő időszak kulcsfontosságú feladatai közé tartozik. (Környezetvédelmi Lexikon)

A biomassza fogalmának második értelmezése szerint a fotoszintézis által évenként újratermelt szerves anyagokat (fa, bozót, fű, agrártermékek stb.), ezek másodlagos termékeit (hulladék, szerves szemét, csatornaiszap, az ipar, például papíripar szerves melléktermékei), illetve az ezekből előállított biogázt, bioalkoholt, biodízelértjük.

Energetikai hasznosítás lehetősége és fontossága sorrendjében pedig a következőképpen csoportosíthatóak: erdőgazdálkodásba bevont erdők fanövekménye; energiaerdő telepítések favagyona; csatorna-, trágya-, szeméttelpek biogáztermelésre alkalmas iszapanyaga; energianövények bioalkohol-, biodízel gyártása; egyéb alternatív biomassa [pl. szalma, energiafű (-pellet), fű, útszéli lombanyag és háztartásokban, farmokon felgyűlt és helyben biogázzá alakítható háztartási szemét és trágya]. (Giber, 2005)

A Föld biomassa-vagyona nem egyenletes eloszlású. A szárazföldi biomassa 40%-a az erdőkben, a többi tundrákon, szavannaterületeken, mocsarakban, füves vidékeken található. A mezőgazdasági területek a biomassa-vagyon kb. 9%-át adják. A teljes élő biomassa csaknem egésze a szántóföldön található, mert az óceánok növényi planktonjai rövid ideig (csak 2-3 hónapig) „élnek”. (Gyulai, 2006)

A Magyarországon termelődő biomassa a megújuló energiaforrások domináns tényezője, a növekedési lehetőség egyik alappillére. Az ország teljes biomassa készlete 350-360 millió tonnára becsülhető, ebből 105-110 millió tonna elsődleges biomassa évente újratermelődik, amelynek nagy része felhasználásra is kerül.

1. táblázat: Magyarországon termelődő biomassza mennyisége 1999-2003 évek átlagadatai

Jelmagyarázat: *szalma illetve víz hozzáadása nélkül

Primer produkció	Millió tonna	Szekunder produkció	Ezer db	Ezer tonna	Tercier produkció	Millió tonna
Gabonaféle	13,7	szarvasmarha	800	640	szilárd szerves	5
ebből búza	5,2	sertés	4900	560	kommunális szennyvíz	17
ebből kukorica	6,5	juh	1100	80	veszélyes hulladék	0,5
Olajnövények	1	baromfi-féle	19400	80	élelm. ipari melléktermék	1
Egyéb ipari	3,3	ló	70	60		
Szálatakarmányok	7		26300	1420		
Zöldség	2			710		
Gyümölcs	1	trágya*		7000-8000		
Melléktermék	28-30	almos trágya*		3900		
Gyökérmaradvány	8-10	hígtrágya*		4000-5000		
Gyep, nádas	3	állati termékek		3000-3500		
Erdő	9					
Összesen	75-77			10000-11000		23,5

Teljes élőfa készlet	250
Összes primer produkció	350-360

Forrás: KSH, FAO(Göggös, 2005)

A magyarországi energiafelhasználásának jelenleg mindössze 3,2-3,6%-át (34-38PJ/év) adják a megújuló energiák, ebből a növényi eredetű biomassza mintegy 2,8%-ot tesz ki, amelynek a túlnyomó részét az erdeinkből kitermelt tűzifa adja. (Göggös, 2005)

3.2. Bio-hajtóanyagok

A mezőgazdasági eredetű alapanyagokból előállított bio-eredetűnek tekintett motorhajtóanyagok jelentősége az elmúlt években növekedett, és a következő évtizedekben vélhetően még jelentősen növekedni fog. Ennek okai a környezetvédelmi igények növekedése és a motorizáció folyamatos bővülése. Időközben a fosszilis alapú alapanyagkészletek még gazdaságosan kitermelhető mennyisége egyre csökken és kitermelésük is visszafogottabb, nem utolsósorban a magasabb árak és nagyobb profit érdekében. Így a biotechnológiai és biomérnöki technológiák fejlődésének köszönhetően előtérbe kerülhetnek a bio-hajtóanyagok, amelyek immáron gazdaságilag is kedvező megoldást jelentenek. Környezetvédelmi szempontból, a globális éghajlatváltozások miatt csökkenteni kellene a szén-dioxid kibocsátást, mérsékelnünk kell az ún. üvegházhatást okozó gázok (heteroatomos molekulák: pl. CO₂) légkörbe jutását. Ha közvetlenül a bioetanol felhasználását tekintjük, üzemanyaghoz keverve segíti annak tökéletesebb elégését, aminek következtében a széndioxid kibocsátása 10-15%-kal csökken a tisztán benzinüzemű járművekhez képest. Ez az arány már 10% bekeverési mutatónál is megmutatkozhat. (Hancsók, 2007)

A bio-hajtóanyagokat eddig három csoportra oszthatjuk, első-, második-, harmadik-generációs bio-üzemanyagokra, aszerint, hogy miből készülnek. Az első generációs üzemanyagok közé hagyományosan a cukor- és keményítő-tartalmú anyagokra alapozott bioetanolt, valamint a szántóföldi növényekből és állati eredetű melléktermékekből készített biodízelt sorolják. Az ilyen, élelmezési célra is felhasználható alapanyagokból előállítható bio-üzemanyagok termelése azonban behatárolt, és erkölcsileg is megkérdőjelezhető. Előállításukkal csak néhány százalékkal lehet növelni az energiaellátás biztonságát.

A második generációs bio-üzemanyagok lignines-cellulóz-s biomasszából készülnek, amit a növények fás részéből nyernek ki. Ezek az alapanyagok lehetnek mezőgazdasági, (élelmiszer)ipari, erdészeti és más melléktermékek is, amelyek rendelkeznek cellulóz-tartalommal. Ezzel a módszerrel kerülték el a versenyzést az élelmiszer-termeléssel. Ugyanakkor a második generációs bio-üzemanyagok előállítása költséges technológiákat igényel – előkezelés, speciális enzimekkel történő erjesztés –, így előállításukkal kapcsolatban fejlesztésekre és kutatásokra van szükség.

Egyesek úgy vélik, hogy az ún. harmadik generációs bio-üzemanyag előállításának alapanyagai az algák lehetnek, melyek a föld leghatékonyabb organizmusai, magas az olajtartalmuk és egyes fajták egy nap alatt akár meg is kétszerezik biomassza tartalmukat.

Különböző bio-hajtóanyagokat különböztetünk meg előállításuk és kiindulási anyagaik szerint. Ilyen a bioetanol, a biodízel, a különböző biogázolajok, a bio-paraffinok és a biohidrogén. Ezek közül szeretném kiemelni a bioetanolt, amelynek előállításával kapcsolatosan végeztük kutatásainkat. Benzinhez történő adagolásakor az etanol nagyobb párolgáshője miatt a hajtóanyag nem párolog el a szívóütemben, hanem a párolgás még a nyomóütemben is folytatódik. Ez is hozzájárul a jobb hatásfokhoz, így a kevesebb szén-dioxid kibocsátáshoz. Viszont az etanol-benzin elegyeknél problémát jelenthet az, hogy a hosszabb ideig történő tárolás esetén az szétválhat, ezért az etanolt közvetlenül a töltőállomáshoz való szállítás előtt kell bekeverni. Nagyarányú etanol felhasználás esetén pedig speciális motort kell alkalmazni. (Neményi, 2008)

3.2.1 Bioetanol előállítása

A növényi fotoszintézis folyamán keletkezett szénhidrátokból vagy zsírsavakból megfelelő eljárásokkal üzemanyagok állíthatók elő. A bio- előtag használata arra utal, hogy ezek az üzemanyagok mezőgazdasági termékek felhasználásával készültek. A folyékony ún. bioüzemanyagok két fontosabb csoportját különböztetjük meg. A növényi eredetű nyersanyagokból alkoholt (bioetanolt) és a növényi olajokból észterezéssel nyert biodízelt. A világon ma legnagyobb mennyiségben előállított bio-üzemanyag a bioetanol, ami egy szerves vegyület: az etil-alkohol, kémiai képlete: C_2H_5OH . (Hancsók, 2007)

A bioetanolt napjainkban egyszerű cukrok erjesztésével állítják elő pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) segítségével annak érdekében, hogy benzint helyettesítő, vagy annak adalékként szolgáló motor-üzemanyagot kapjanak. Az első generációs bioetanol gyártási technológiákban magas cukortartalmú növényekből préseléssel kinyert cukrokat vagy magas keményítőtartalmú növények hidrolízisével előállított cukorszirupot alakítják át etanollá. Az erjesztés után visszamaradó szilád fázis a DDGS (dry distillers grounds and solublers), mely magas fehérje és rost tartalmú melléktermék, állati takarmányként vagy szilárd tüzelőanyagként hasznosítható. Magyarországon keményítő tartalmú termények között bioetanol gyártás szempontjából első sorban a kukorica (*Zea mays*) és a búza (*Triticum aestivum*) jön számításba, de egyéb gabonafélék (árpa, rozs, zab, tritikálé), illetve burgonyakeményítőből is lehet etanolt gyártani.

Cukorból az alkohol előállítás technológiája viszonylag egyszerű folyamat, s ha úgy tetszik évezredek óta ismert. Egy kg cukorból elméletileg 51,1% etanol nyerhető, a gyakorlatban ez a legkedvezőbb esetben 48% körüli érték, kiegészítve mintegy 1200 kJ/kg hőenergia fejlődésével.

Az eredmény a nyersanyagtól és annak előkészítésétől is függő, de alacsony alkoholtartalmú (10-18%), nagy víztartalmú és szilárd maradványanyagot is tartalmazó cefre. A cefréből az alkohol kivonása több fokozatú desztillációval történik. A desztilláció végterméke általában 95-96%-os alkohol, melyből többnyire molekulaszűrő segítségével érik el a 99,9%-os tisztaságot. A tiszta alkoholt a végfelhasználásnak megfelelően denaturálják vagy közvetlenül a benzinbe keverik. Ennél a gyártási folyamatnál a lepárlás után hátramaradó fontos melléktermék a lepárlási üledék. A maradványanyag a desztilláció utáni cefremaradvány szárazanyag tartalma. A szárazanyagot a vízből centrifugálással vonják ki, és/vagy bepárlással. Az így nyert, magas nedvességtartalmú (60-70% m/m) anyag, takarmányozásra használható ugyan, de nem tartható el néhány napnál hosszabb időn át. A hosszú idejű tárolás érdekében a nedvességtartalmat legalább 16% alá kell csökkenteni. Azonban közvetlenül is felhasználható szubsztrátumként biogáz-berendezésekben, így további energia nyerhető ki belőle (www.sterlingsih.com, 2011) (László, et al., (2007).

A második generációs bioetanol gyártási technológia cellulóz (illetve lignocellulóz) nyersanyagot hasznosítva állít elő etanolt, mezőgazdasági és faipari hulladékok illetve melléktermékek felhasználásával.

A lignocellulózt hasznosító technológia a keményítő alapú technológiával szemben több lépést foglal magába. Az első lépés az előkezelés, mely során a lignocellulóz komplex merev szerkezete fellazul, illetve részlegesen bomlik, ezáltal a poliszacharidok hozzáférhetővé válnak. Alapvetően a folyamat többféle módon valósítható meg: fizikai, kémiai, biológiai vagy ezek kombinációjával létrehozott fiziko-kémiai és bio-kémiai kezelésekkel, ami a leggyakrabban használt technikai megoldás. Ezeknél a kémiai katalizátor alkalmazása mellett a fizikai paraméterek extrém megválasztásával vagy változtatásával növelik a kezelés hatékonyságát. A legismertebbek az ammóniás robbantás (AFEX), a nedves oxidáció és a gőzrobbantás.

Az előkezelést követő lépés az enzimes hidrolízis. A kereskedelmi forgalomban lévő celluláz enzimmészítmények (Novozymes A/S, Genencor Inc., Iogen Corp.) mellett a helyben történő enzimtermelés lehetőségével is számolni kell. A jelenleg ismert optimális paraméterek mellett (50°C, pH=5) az enzimes bontás folyamata az előkezelési lépésektől függően 24-72 óra alatt kb. 60-90%-os hatékonysággal végbemegy. A hat szénatomos cukrokat ebben az esetben is rendszerint pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) segítségével erjesztik etanollá. (Demirbas, 2005)

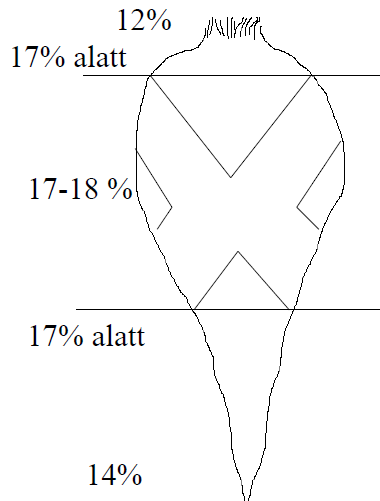
Az energetikai számítások azt mutatják, hogy 4-5 V/V% etanol koncentrációtól már gazdaságosan működhet a desztilláció. Az alkohol vízzel azeotrópos elegyet képez, ezért hagyományos technológiával a második generációs technikánál is csak 96 V/V%-ra töményíthető. Ezt nevezzük tisztaszesznek. Ha üzemanyag célra használjuk az alkoholt, benzin-alkohol keverékként, a maradék víztől is meg kell szabadulnunk, különben szételegyedés következhetne be,

ami az üzemanyag tulajdonságait jelentősen rontaná. Vízmentes alkoholt elő lehet állítani azeotróp desztillációval, vagy zeolittal töltött molekulaszűrő-oszlopon történő átvezetéssel. Az azeotróp desztilláció hátránya, hogy ennél a technológiánál egy harmadik szerves vegyület (többnyire benzol vagy ciklohexán) hozzáadásával desztillálják a tisztaszeszt, míg a molekulaszűrő oszlopok beruházási költsége igen magas. (Hodúr et al., 2008)

3.3 Cukorrépa

A cukorrépa (*Beta maritima* var. *saccharifera*) az európai tengerpartokon, különösen a Földközi-tenger partjain vadon termő burgundi répából nemesítés által kitenyésztett változat; megvastagodott gyökerében halmozódik fel a nádcukor. A kétévi növény gyökerének cukortartalma az első évi tenyészidő végén, ősszel a legmagasabb. Ilyenkor az invertcukor-mennyiség csak néhány század %-ot tesz ki, a nádcukortartalom pedig az éghajlat, talaj és egyéb tényezők szerint 12-24% között ingadozik. Hazánkban 13-20% a megszokott határok.

A cukorrépa növény ún. répatestét több részre oszthatjuk fel, ezek a részek eltérő mennyiségű cukrot tartalmaznak, amit százalékosan tudunk kifejezni (1. ábra).



1. ábra: A cukor százalékos megoszlása a cukorrépában

A cukorrépa kémiai összetétele:

- víz: 70-80 % (szárazanyag: 20-30 %),
- rost: 1,2 – 3,6 %,
- oldható szárazanyag: 18-26 %; ebből szacharóz: 13,5-20%,

- oldott nem-cukor anyagok 5-10 % (szerves 6%+szervetlen 1,5%).

Az oldott nem-cukor anyagokhoz soroljuk a szacharózon kívül az összes kémiai értelemben vett cukrot. Ilyen például a kristályosodást gátló invertcukor (glükóz és fruktóz elegye) vagy a raffinóz nevű triszacharid. A nem cukor anyagok főleg növényi savak sói, fehérjék, aminosavak, betain, továbbá glükozidok, zsír, gyantaanyagok, nyálkaanyagok, enzimek stb. (Varga, 2012)

3.4 Cellulóz

A Földön előforduló biopolimerek közül a legnagyobb mennyiségben megtalálható, a növények szerkezeti anyagának fő komponense, a cellulóz. Anselme Payen francia fizikus, vegyész és matematikus izolálta először fából és nevezte el 1835 körül. $4 \cdot 10^{10}$ tonnára becsülik éves termelődését, teljes mennyiségét pedig $7 \cdot 10^{11}$ tonnára, amely főleg a szárazföldi növényeknek köszönhető. A manapság óriási mennyiségben és léptékekben termelődő ún. másodlagos biomassza-források, mint pl. a mezőgazdasági, erdészeti, ipari és háztartási hulladékok, kb. 50 %-ban tartalmazznak cellulózt.

A cellulóz a növényi sejtfalban két másik biopolimerrel, a hemicellulózzal és a ligninnel komplexet alkotva van jelen. A cellulóz egyenes láncú cukropolimer, a hemicellulóz öt és hat szénatomos cukrokból felépülő elágazó heteropolimer, míg a lignin egy fenilpropán alegységekből felépülő térhálós polimer.

A cellulóz anhidro-glükóz monomerekből felépülő poliszacharid, az alapegységei β -1,4-es kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. A lineáris, elágazás nélküli polimerláncban az egyes cukor egységek egymáshoz képest 180° -kal elfordulva találhatók. Bár kémiai szempontból a cellulóz monomerje a glükóz, szerkezetét tekintve annak kisebb ismétlődő egysége a cellobióz. (Dienes, 2006)

3.5. Enzimek

Az enzimek katalitikus aktivitású fehérjék, felgyorsítják a kémiai reakciókat. A kémiai katalizátorokkal szemben számos előnnyel rendelkeznek: működésükhöz általában nem igényelnek magas hőmérsékletet és nyomást, ez energia-megtakarítást eredményezhet; általában az enzimek hatékonyabbak, mint kémiai megfelelőik; nem igényelnek toxikus oldószereket sem, ezért környezetszennyezésük elhanyagolható vagy kisebb mértékű; többségük meglehetősen specifikus, így jóval kevesebb melléktermék képződik; a biológiai katalizátorok felhasználhatóak olyan reakciókban, amelyek katalízise vegyi úton nem megoldható. Az enzimek ezen előnyös jellemzői, tulajdonságai a biotechnológiai folyamatokat környezetbaráttá teszik, a kémiai katalizátorokkal

szemben, de ahhoz, hogy azok gazdasági szempontból is versenyképesek legyenek, rengeteg kutatás-fejlesztésre van még szükség ebben a szektorban. (Dienes, 2006)

3.5.1 Cellulóz-bontó szervezetek

Az évente képződő óriási mennyiségű cellulóz tartalmú szerves anyag lebontását elsősorban a különféle mikroorganizmusok: baktériumok, gombák, protozoák végzik. Közöttük találhatunk aerobokat és anaerobokat, mezofileket és termofileket egyaránt. Léteznek köztük olyanok is, amelyek extrém környezetben (extrém hőmérsékleten, pH-n vagy nyomás alatt) élnek. A cellulotikus mikrobák megtalálhatóak a talajban, növényi hulladékokban, lápokban, mocsarakban, akár folyók, tavak, tengerek üledékében, szennyvíz-iszapban stb. egyaránt. Csak elenyésző mennyiségű állat rendelkezik saját cellulázzal (pl. csigák, kagylók, rákok, termeszek), másokat (pl. a kérődzők, egyes rovarok) a velük szimbiózisban élő mikrobák segítenek a cellulóz-tartalmú táplálék emésztésében. A cellulóz bontó enzimek a növényekben olyan fontos folyamatokban játszanak szerepet, amelyekben a sejtfal bontása elengedhetetlen, mint a magvak csírázása vagy a gyümölcsök érése. Ennek ellenére nincs szükségük nagy mennyiségű enzimre, jelentősebb mennyiségű cellulázt csak néhányan termelnek, ilyen pl. a vízijácint.

A cellulóz-bontásra képes mikroorganizmusok minden élőhelyen fellelhetők, ahol felhalmozódhat cellulóz-tartalmú hulladék. Általában ezek a mikrobák kevert populációkat alkotnak más fajokkal, melyek nem képesek cellulóz-bontásra. A cellulóz anaerob bontásából széndioxid, metán és víz, aerob lebomlásából pedig széndioxid és víz szabadul fel.

Bakteriális cellulázok

A baktériumok között mezofil és termofil aerob és anaerob baktériumok, valamint az aktinomicéták is termelnek aktív cellulázokat. Az általuk termelt cellulázok döntő többsége sejthez kötött enzim, így tanulmányozásuk nehézkes. A nagymértékben kristályos cellulózt is bontani képes anaerob baktériumok (mint a *C. thermocellum*) a szubsztrát felületén megtapadva bontják a cellulózt. Különböző cellulitikus komponenseik multienzim komplexet alkotnak (celluloszóma).

Celluláz termelő gombák

A gombafajok széles körére jellemző a cellulitikus enzim-termelés, ebben a körben különösen kiemelt helyet foglalnak el a *Trichoderma*, *Penicillium* és *Aspergillus* fajok.

Trichoderma reesei

Egy a talajban, ill. növényi hulladékon élő mezofil lágykorhasztó gomba, amely egyike a legjobb extracelluláris celluláz-termelőknek, ezért széles körben tanulmányozott cellulitikus szervezet.

A *Trichoderma* fonalas gombafajok a talaj domináns mikroorganizmusai szinte minden éghajlaton. Jellemzően mezőgazdasági területekről és erdei talajokból izolált törzseket ismerünk, melyek többsége Észak-Amerika és Európa területéről származik. A legtöbb *Trichoderma* törzs aszexuális spórákkal szaporodik.

Aspergillus niger

Az *Aspergillus niger* egy penész fajta, az *Aspergillus* nemzetség legerjedtebb tagja. Általánosan előfordul a talajokban, komposztban, de gyakran megtalálható a számára kedvező feltételeket biztosító beltéri környezetben, valamint zöldségek, gyümölcsök, és romlott ételek felszínén. Vöröshagyma héján gyakran megfigyelhetők fekete telepei.

A biotechnológiai iparban számos alkalmazása ismert. Szerves savak ipari előállításának általános módja cukor oldat fermentációja különböző gombafajokkal. Az *A. niger* segítségével citromsav és glukonsav állítható elő. A citromsav gyártásban a valódi citrom feldolgozását váltotta ki.

A feketepenész segítségével olyan enzimek is előállíthatók, mint az alfa-amiláz, a cellobiáz (β -glükózidáz), glükó-amiláz, glükóz-izomeráz, pektináz és az alfa-galaktozidáz.

3.5.2 Cellulóz-bontó enzimek

Az enzimek katalitikus aktivitású fehérjék, felgyorsítják a kémiai reakciókat. A kémiai katalizátorokkal szemben számos előnnyel rendelkeznek: működésükhöz általában nem igényelnek magas hőmérsékletet és nyomást, ez energia-megtakarítást eredményezhet; általában az enzimek hatékonyabbak, mint kémiai megfelelőik; nem igényelnek toxikus oldószereket sem, ezért környezetszennyezésük elhanyagolható vagy kisebb mértékű; többségük meglehetősen specifikus, így jóval kevesebb melléktermék képződik; a biológiai katalizátorok felhasználhatóak olyan reakciókban, amelyek katalízise vegyi úton nem megoldható. Az enzimek ezen előnyös jellemzői, tulajdonságai a biotechnológiai folyamatokat környezetbaráttá teszik, a kémiai katalizátorokkal

szemben, de ahhoz, hogy azok gazdasági szempontból is versenyképesek legyenek, rengeteg kutatás-fejlesztésre van még szükség ebben a szektorban. (Mandels, 1975)

A celluláz enzimek a cellulóz β -1,4-glikozidos kötéseit bontják. Kémiai szempontból a szubsztrát és annak hidrolízise egyszerű, hiszen egy homopolimerről és egyféle kötés hasításáról van szó. De a cellulotikus mikrobák mégis sokféle celluláz enzimet termelnek. Ennek oka a cellulóz változatos szerkezete. A polimerláncok a mikrofibrillák kristályos és amorf régióiban nagymértékben eltérő fizikai, térbeli elrendeződést mutathatnak. Az celluláznak kapcsolódnia kell a szubsztrátjához, lokalizálni és izolálnia kell a megfelelő cellulózláncokat. Ilyen potenciális támadási pontok az amorf ill. hibás kristályos részek. A szubsztrát szerkezeti különbségei miatt az egymást kiegészítő enzimkomponensek együttes hatására van szükség a teljes hidrolízishez.

A cellobiáz, vagy más néven β -glükózidáz enzim katalizálja a cellobióz két anhidro-glükóz egysége közötti kötés hasítását, valamint egy glükóz egység eltávolítását a cellooligoszacharidok nem-redukáló végéről. A cellobiáz ugyan inaktív a kristályos vagy amorf polimeren, de a cellulóz teljes hidrolíziséhez szükséges enzimkomponensként a cellulázok közé sorolják. A β -glükózidáz fontos szerepet játszik a cellobióz által okozott termék-inhibíció megszüntetésében (a glükóz a cellobiázt gátolja). (Dienes, 2006) (Gyalai-Korpos, 2012)

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Felhasznált alapanyag

A kísérletek elkészítéséhez, a cukorgyártás melléktermékeként keletkező, szárított cukorrépa szeletből előállított cukorrépa pelletet alkalmaztunk. A pellet olyan, nagy nyomáson préselt szálás, rostos anyag, amelyet vagy saját anyaga, vagy belekevert kötőanyag tart össze. Ezt a pelletet aprítottuk, majd különböző szemcseátmérőjű frakciókra osztottuk, annak érdekében, hogy a szemcseméret változásának hatásait is meg tudjuk vizsgálni a kísérleteink során.

Nyert frakciók:

- 0,2 mm,
- 0,25 mm,
- 0,315 mm,
- 0,4 mm,

- 0,5 mm,
- 0,63 mm,
- 0,8 mm,
- 1,0 mm.

4.2. Bioreaktor

A cukrosítási, hidrolizációs vizsgálatokat 2 db egyenként 2 l térfogatú laboratóriumi fermentációs egységben végeztük (Labfors Minifors, Belgium). A berendezésbe épített hőmérsékletérzékelő, elektrokémiai szenzorok és szabályozóegységek segítségével a fermentáció teljes ideje alatt a pH-t, a hőmérsékletet és a keverési fordulatszámot állandó értéken tudtuk tartani. A pH beállítását a berendezés folyamatosan és automatikusan, 0,5 n HCL és NaOH oldatokkal $\pm 0,1$ egység pontossággal tartja a beállított értéken. A méréseket pH=4,5 beállítás mellett végeztük.

A berendezés a hőmérséklet szabályozását pedig a beépített fűtőbetét valamint a hálózati vízzel működő hűtőegység működtetésével végzi. Minden kísérletnél 26 °C volt a beállított hőmérséklet, amit a berendezés kb. $\pm 0,1$ °C pontossággal tudott tartani.



2. ábra: Enzimreaktor

A hidrolíziseknél megszokott magasabb, kb. 50°C helyett azért választottuk ezt az alacsonyabb hőmérsékletet, hogy megtapasztaljuk az enzimes bontás hatékonyságát kevesebb energia-befektetés mellett, annak érdekében, hogy a későbbiekben energiatakarékosabb módon tudjuk használni az enzimes hidrolízist a bioetanol gyártási folyamatában.

4.3. Alkalmazott enzimek

A cukrosításhoz celluláz és cellobiáz enzimeket használtunk. Mindkét felhasznált enzimet a SIGMA-ALDRICH forgalmazza, a cellulázt *Trichoderma reesei* fonalas gomba segítségével állították elő, aktivitása: ≥ 700 units/g. A cellobiázt (β -glükozidáz) *Aspergillus niger* által termeltették, aktivitása: ≥ 250 units/g.



3. ábra: Az alkalmazott cellobiáz és celluláz enzim

Az enzimekezelések során egy előzetesen meghatározott kísérletterv alapján dolgoztunk. Az enzimek mennyiségét 100-tól 450 μ l-ig változtattuk az előzetes mérések és számítások alapján, amit az enzim aktivitása és a szubsztrát mennyiségének ismeretében végeztünk.

4.4. Cukrosítási eljárás

A használata előtt és után a biomérnök laborban található fertőtlenítő anyagokkal sterilizáltuk a berendezést és a kísérletek során használt egyéb eszközöket.

A mérésekhez desztillált vizet használtunk, minden kísérletnél 1 litert, ehhez 15g cukorrépa pelletet adtunk hozzá, majd folyamatos kevertetés mellett ($n=150$ 1/min) jutattuk a rendszerbe a két enzimet az előre meghatározott mennyiségekben és a beállított paraméterek (pH, hőmérséklet) mellett.

A cukrosítás folyamata közben időközönként, cc 24 óránként, mintákat vettünk a bioreaktorból (10-15ml), így folyamatosan nyomon tudtuk követni az enzimes bontás folyamatát, nem csak egy végső cukor tartalmat kaptunk a méréseknél, hanem teljes jelleggörbéket.

A paraméterek közül hármát, a két enzim mennyiségét és a szemcseméretet változtattuk a méréseink folyamán.

Kísérleteinket a 2. táblázatban összefoglalt kísérletterv alapján végeztük el.

2. táblázat: A cukrosítási kísérletterv

Mérések	pH	t [°C]	n [1/min]	Bemért darált pellet tömege [g]	Bemért darált pellet szemcsemérete [mm]	Deszt. víz menny. [l]	Bemért celluláz enzim konc. [μl]	Bemért cellobiáz enzim konc. [μl]
1-1	4,5	26	150	15	1	1	100	250
1-2	4,5	26	150	15	0,2	1	300	100
2-1	4,5	26	150	15	0,63	1	300	250
2-2	4,5	26	150	15	0,315	1	100	100
3-1	4,5	26	150	15	0,8	1	200	300
3-2	4,5	26	150	15	0,5	1	250	300
4-1	4,5	26	150	15	0,4	1	350	250
4-2	4,5	26	150	15	0,25	1	250	350
5-1	4,5	26	150	15	0,63	1	350	250
5-2	4,5	26	150	15	0,2	1	250	350
7-1	4,5	26	150	15	0,63	1	250	350
7-2	4,5	26	150	15	0,63	1	450	450

4.5. Cukor tartalom mérése

A minták cukortartalmát ún. DNSA-módszerrel határoztuk meg, melynek végén fotometriás mérés segítségével kaptuk meg az adott glükóz koncentrációt, az előre kimért és meghatározott kalibrációs egyenes felhasználásával.

DNSA-módszer:

- 3 cm³ mintához 3cm³ DNSA reagenst adunk hozzá,
- 10 percig 90°C-on melegítjük, majd jeges vízben lehűtjük,
- hozzáadunk a mintákhoz 1cm³ K-Na-tartarát oldatot,
- majd fotometráljuk 575 nm hullámhosszon.

DNSA-reagens készítése (1 liter):

- 10g 3,5-dinitro szalicilsav,
- 2g fenol,
- 0,5g Na-szulfid,
- desztillált vízzel jelleg kell feltölteni.

4.6 Mikrohullámú készülék

A vizsgálataimhoz egy Sharp R-23GT típusú mikrohullámú berendezést használtam. A berendezésben két egyenként 800W teljesítményű 2450MHz frekvencián üzemelő magnetron található, amelyekből a gerjesztett mikrohullámú sugárzást a csatoló-tápvonalakkal a berendezés alján, illetve tetején vezetik be a kerámiaborítású rezonátor részbe. A téreloszlás egyenletesebbé tételére a csatoló-tápvonalat beépített elektromos motorral mozgatják. A különböző oldalról történő becsatolás vizsgálata céljából a gyári készüléket úgy alakítottuk át, hogy a felső magnetron külön kapcsolható legyen.

A reaktorba szükséges pellet mennyiségből, 15 g, 500 g desztillált vízzel elkeverve szuszpenziót készítettünk, majd 3 perc időtartamban, 800 W energia bevitelt alkalmazva kezeltük a mikrohullámú készülékben (4. ábra).



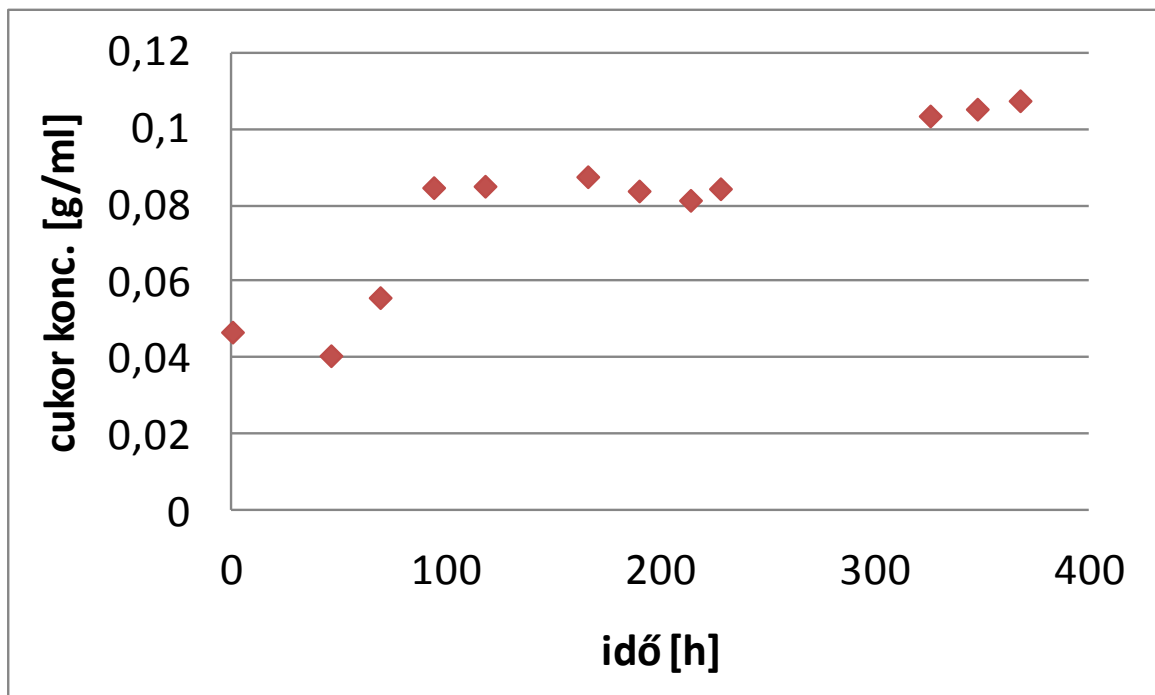
4. ábra: Sharp R-23GT típusú mikrohullámú készülék

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A kitűzött célunk, a cukorrépa pellet ligno-cellulóz tartalmának enzimmel történő lebontása, érdekében elvégzett kísérleteinket a főbb meghatározó paraméterek alapján csoportosítva mutatjuk be.

5.1 Enzimes lebontás vizsgálata

A cellulóz/lignocellulóz enzimes lebontásának vizsgálatához naponta vettünk mintát a fermentorból. A mintákból cukor meghatározást végeztünk, így követtük nyomon a cellulóz lebontás folyamatát. Az 5. ábrán egy tipikus cukor koncentráció – idő diagramot mutatunk be.



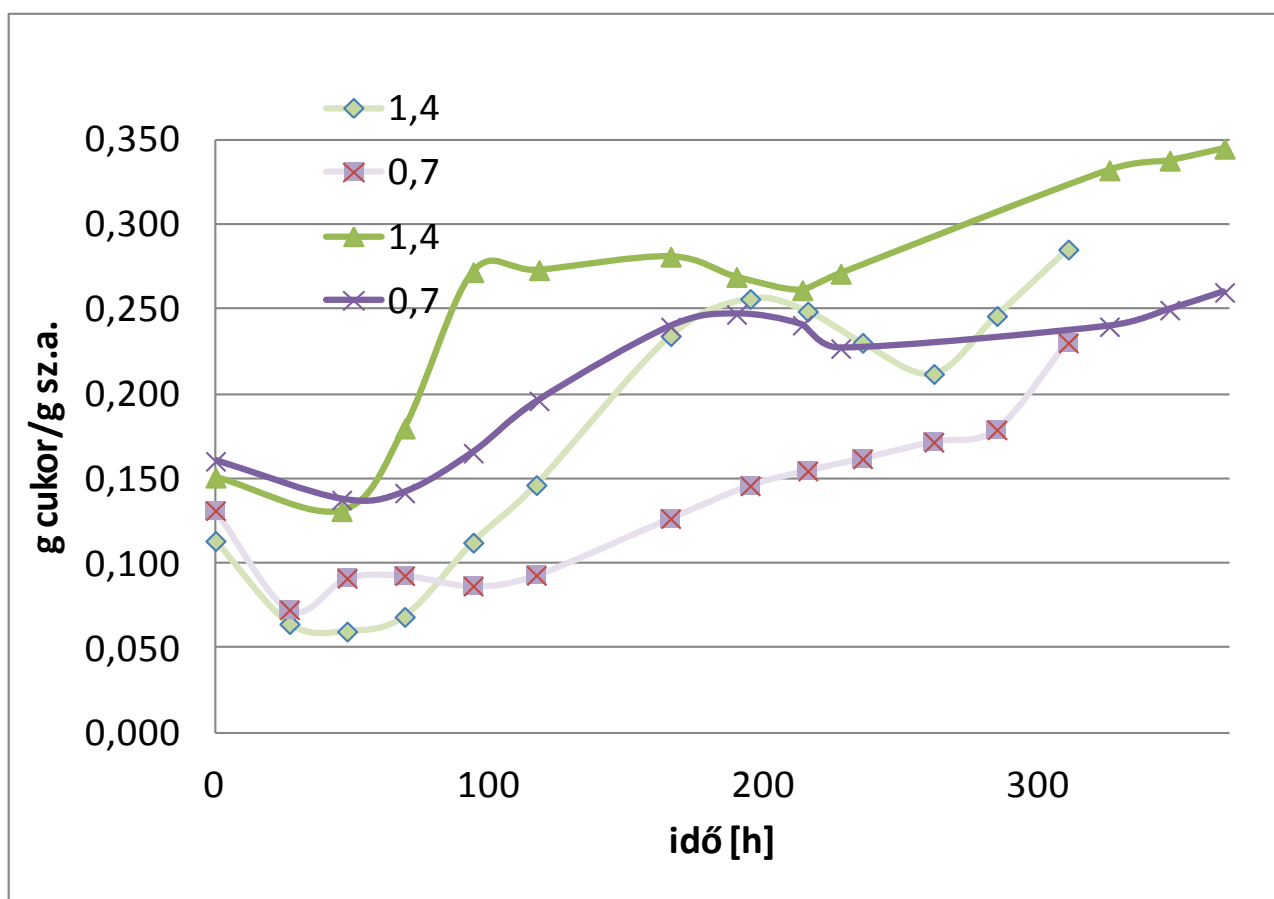
5. ábra: Cukorrépa pellet cellulóz tartalmának enzimes lebontása az idő függvényében (pellet méret: 0,63mm, pH:4,5, hőmérséklet:26 °C, CLA/CLB:1,4)

A kapott függvényen jól nyomon követhető a klasszikus enzimes lebontási mechanizmus főbb szakaszai. Az első kb. 50 óra a rendszer adaptációja miatt stagnáló szakasz, az igazi bomlás, lebontás még nem indul meg.

A második szakaszban megindul a lebomlás maga. Itt váltakozó sebességű szakaszokkal találkozunk, de ez a változó nagyságú sebesség egy folyamatosan növekvő cukortartalmat eredményez.

Természetesen az enzimatis leontás során termelőő cukor mennyisége változik az idő függvényében a kísérlet egyéb körülményeinek megfelelően.

A 6. ábrán különböző celluláz (CLA) és cellobiáz (CLB) enzim arány alkalmazása során termelőőtt cukor mennyiségének változását mutatjuk be az idő függvényében. A keletkezett cukor mennyiségét grammaban, 1 g szárazanyag mennyiségére vonatkoztatva adtuk meg.



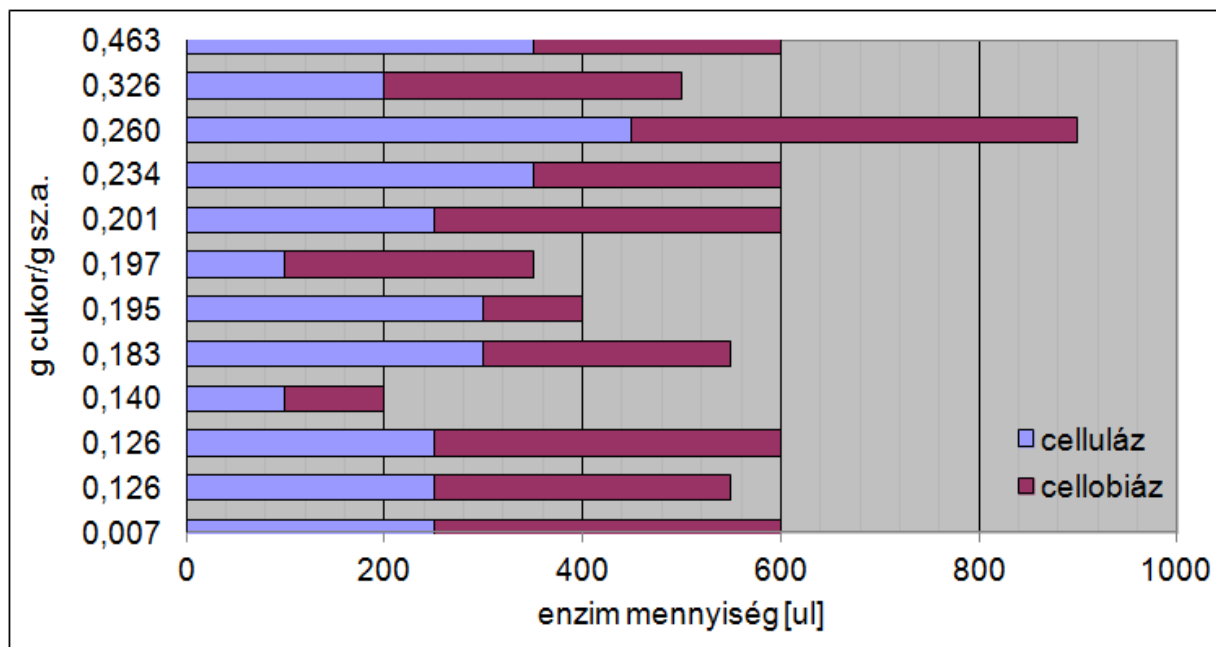
6. ábra: Cukorrépa pellet cellulóz tartalmának enzimatis leontása az idő függvényében (pH:4,5, hőmérséklet:26 °C, CLA/CLB:1,4, 0,7)

A két – két azonos enzimarány alkalmazása mellett felvett értékek esetében jól azonosíthatóan, közel egyforma növekedési sebességi ráta, növekedési meredekség tapasztalható.

Ezek a függvényértékek már előre vetítik következő mérési sorozatunkat, amikor is a pellet méretének valamint az alkalmazott enzimek összes mennyiségének és arányának a keletkező cukor mennyiségére gyakorolt hatását vizsgáltuk meg.

5.2 Enzim mennyiség hatásának vizsgálata

A 7. ábrán mutatjuk be az alkalmazott összes enzim mennyiségnek a termelődött cukor mennyiségére kifejtett hatását.



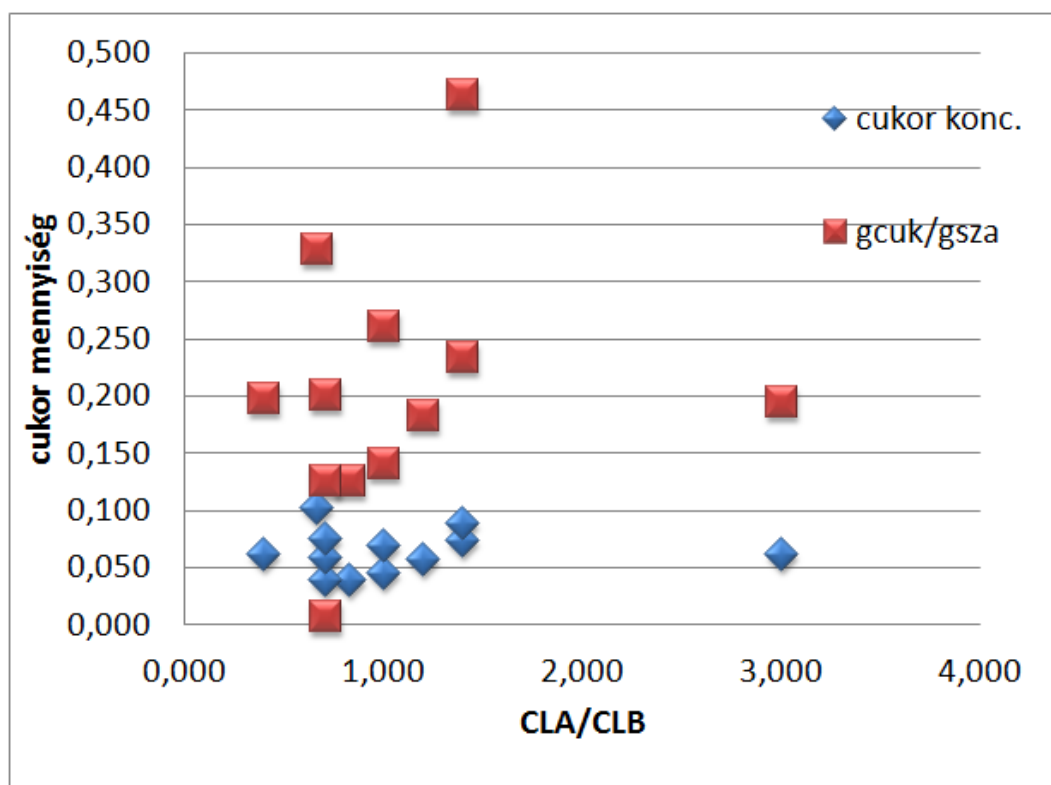
7. ábra: Cukorrépa pellet cellulóz tartalmának enzimes lebontása az alkalmazott összes enzim mennyiség függvényében

(pH:4,5, hőmérséklet:26 °C, fermentációs idő: 166 h)

A 7. ábrán jól látható, hogy az összes enzim mennyiségnek nincs egyértelműen rögzíthető hatása a termelődött enzim mennyiségére vonatkozóan. Jól példázza ezt az állítást az a tény pl., hogy ugyanakkora, mindösszesen 600 µl-nyi enzim mennyiség alkalmazása során mértük a legtöbb – 0,463 g/g sz.a – valamint a legkevesebb – 0,007 g/g sz.a. termelődött cukor mennyiséget is.

5.3 Enzimarány hatásának vizsgálata

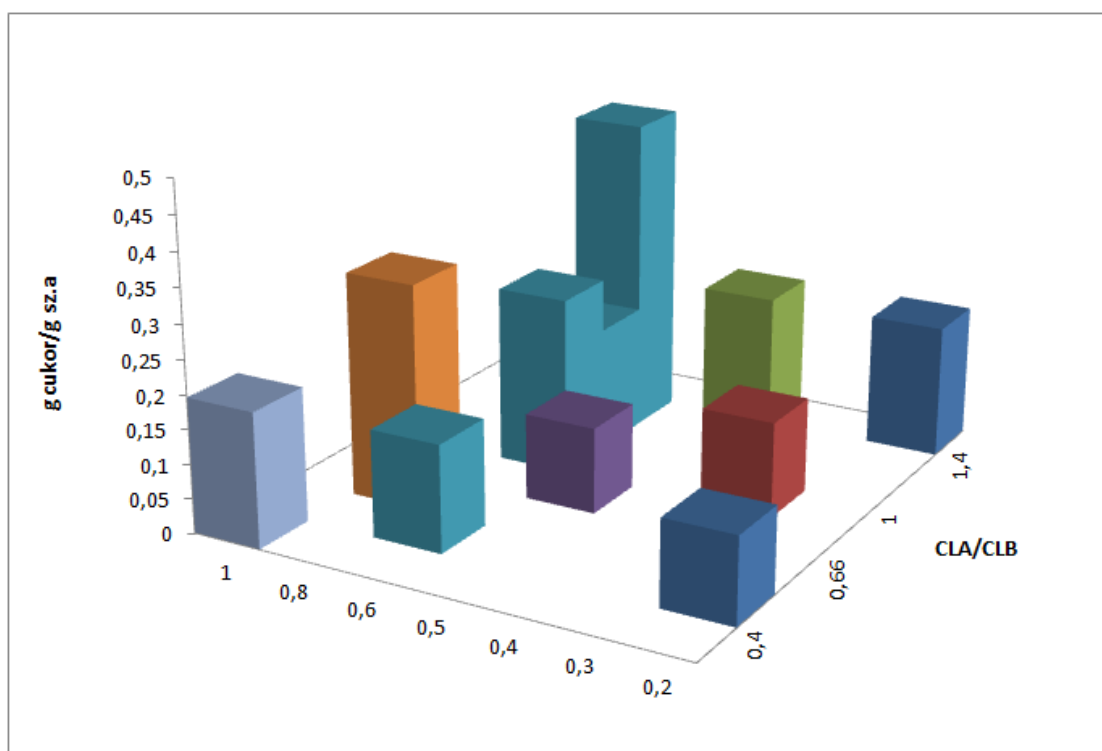
A 5.2 fejezetből egyértelműen kitűnik, hogy az alkalmazott enzim összes mennyisége nem hozható egyértelmű összefüggésbe a kinyert cukormennyiséggel. Ezért megvizsgáltuk a két enzim arányának a cellulózlebontásra kifejtett hatását (8. ábra).



8. ábra: Cukorrépa pellet cellulóz tartalmának enzimes lebontása az alkalmazott enzim arányok függvényében
(pH:4,5, hőmérséklet:26 °C, fermentációs idő: 166 h)

Az ábráról látható, hogy mind a fermentlében mért cukor koncentráció [g/ml], mind az 1 g szárazanyagra vonatkoztatott cukor mennyisége első közelítésben random összefüggést mutat az alkalmazott enzimarány függvényében. Még a szélsőségesen eltolt enzim arányok, i.e. CLA/CLB = 0,4 ill.: CLA/CLB = 3, alkalmazása sem mutatott kiugróan eltérő cukor mennyiséget.

Az enzim arány mellett a pellet méretét is figyelembe kell tehát vennünk, ezért megrajzoltuk az enzim arány – pelletméret együttes hatását bemutató ábrát.

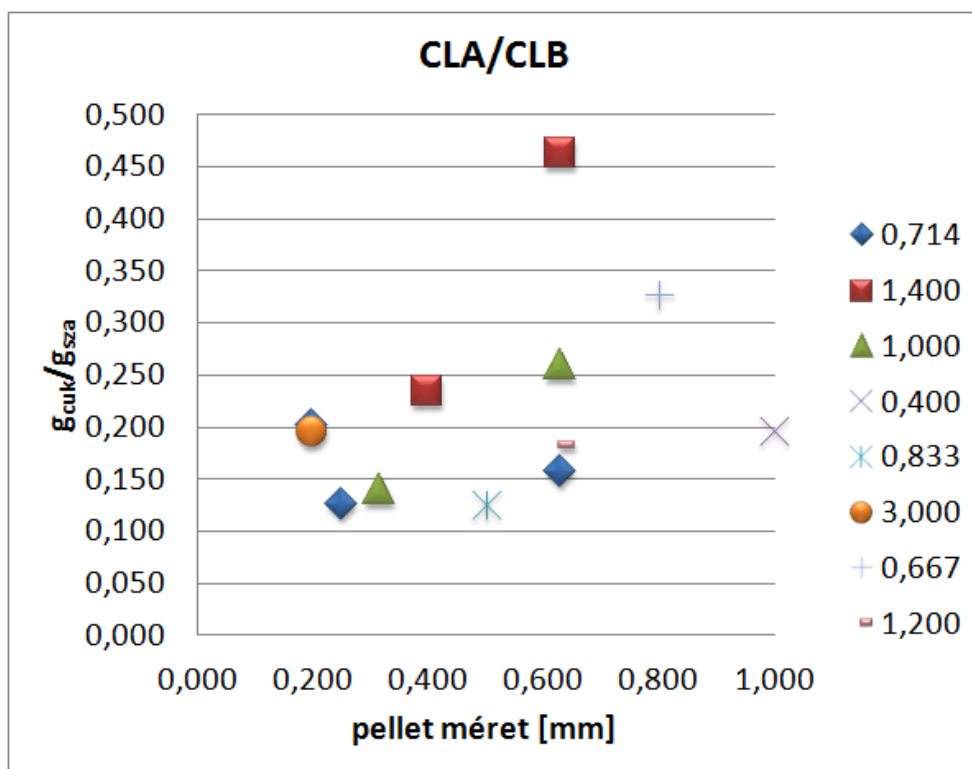


9. ábra: Pellet méret (0,2-1mm) valamint az alkalmazott enzim arány (CLA/CLB) hatása a termelődött cukor mennyiségére. (pH=4,5; hőmérséklet: 26°C; fermentációs idő: 166 h)

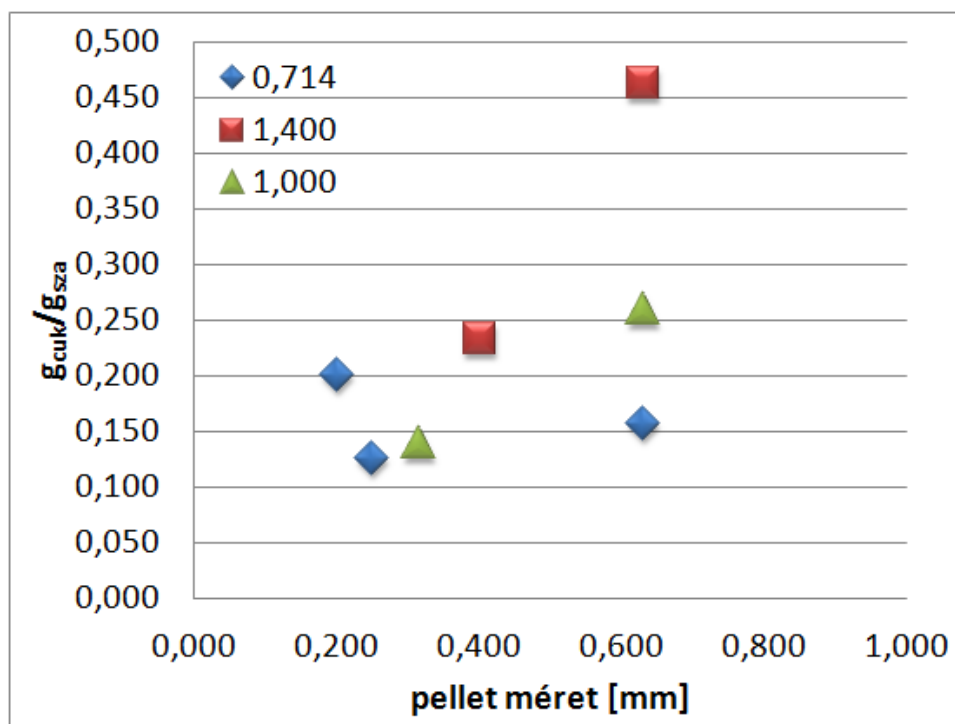
Összefoglaló ábránkról kitűnik, hogy érdemes részleteiben megvizsgálni az egyes paraméterek hatását.

5.4. Részecskeméret hatása

A különböző szemcseátmérőjű pellet frakciók segítségével megvizsgáltuk a szemcseméret változtatásának hatásait a cellulóz bontásra. De ehhez figyelembe kellett vennünk az előző fejezetben már vizsgált enzimarányt is, mivel a szemcseméretnek önmagukban nem mutattak jelentősebb tendenciát, de ha ugyanannál a szemcseméretnél figyeljük meg a cukor mennyiségét, akkor megállapíthatjuk, hogy nagyobb enzimarány jobb cukorkihozataalt eredményez. Ezt jól mutatja a 10. és a 11. ábra is. A 10. ábráról megállapítható, hogy a kisebb méreteknél, kb. 0,3 mm-ig nincs hatással az enzimarány a kihozatalra, de az egyre növekvő szemcseátmérő adott enzimaránnyal egyre nagyobb kihozataalt eredményez. A 11. ábrán külön kiemeltük a nagyobb enzimarányok mellett végzett kísérletünk eredményeit, és ezen az ábrán egyértelműen nyomon követhető, hogy a pellet szemcseátméretének növelésével a cukor mennyisége is nő; valamint az is leolvasható, hogy pl. a 0,6 mm szemcseátmérőjű pellet minták esetében a cukorkihozatal növekszik az enzimarány növelésével.



10. ábra: A pellet méret hatása a termelődött cukor mennyiségére eltérő enzimarányok mellett

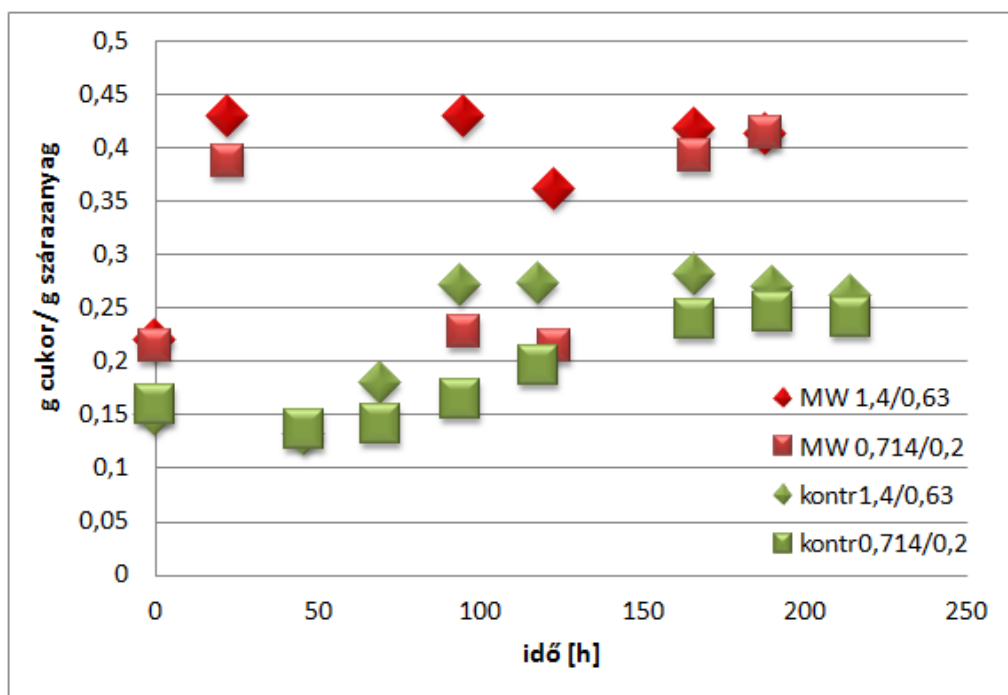


11. ábra: A cukorrépa pellet enzimes lebontásának vizsgálata a szemcseméret függvényében eltérő enzimarányok (CLA/CLB: 0,714 – 1,4) mellett (pH=4,5; hőmérséklet: 26°C; fermentációs idő: 166 h)

5.5 Mikrohullámú előkezelés vizsgálata

A mikrohullámú berendezést két céllal is alkalmaztuk. Egyik célunk az volt, hogy így csökkentsük a pellettel bevitt mikroorganizmusok, különösen gombák számát, melyek nagymértékben okolhatók a mintákban mért cukormennyiség ingadozásáért. Másrészt pedig a mikrohullámú hőközlés előkezelésként történő alkalmazásával az volt a célunk, hogy a mikrohullámú energia bevitel több szerző által kimutatott (Beszedes et.al., 2011), „non thermal” azaz nem termikus hatásával, elérjük a lignocellulóz/cellulóz molekulák közötti kötések felbontását, a szerkezet megbontását, lazítását és ez által hatékonyabbá tegyük a hidrolízist, az enzimek számára hozzáférhetőbbé tegyük a cellulóz molekulákat.

A 12. ábra a mikrohullámú kezelésen átesett, és az azonos méretű frakcióból, azonos körülmények között vizsgált kontroll minták enzimes bontásának görbáját mutatja.



12. ábra: A mikrohullámú előkezelésen átesett és a kontroll minták cellulóz tartalmának enzimes bontása az idő függvényében (CLA/CLB: 0,714 és 1,4, pH=4,5; hőmérséklet: 26°C; pellet méret: 0,2 mm és 0,63 mm)

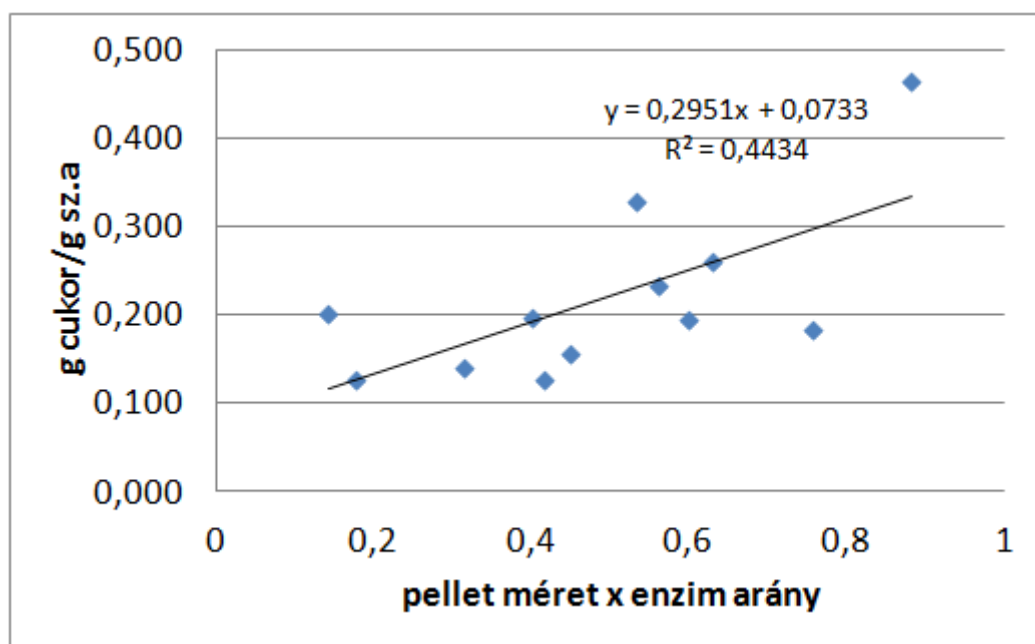
Az ábráról egyértelműen kitűnik, hogy a mikrohullámú kezelés már a kiindulási, kezdeti cukortartalmát is jelentősen megnöveli a fermentáléknak, de a fermentációs idő végén mért közel dupla akkora cukormennyiség nem ennek a kezdeti, magasabb cukortartalomnak, hanem a mikrohullámú energia bevitel nem termikus hatásának köszönhető.

Megfigyelhető még továbbá, hogy a cukorlebontási folyamat „felfutási” szakaszának hossza lényegesen lerövidült, további mérésekkel pontosan meghatározható majd, hogy egy mikrohullámú kezelést követően a cc. 160-180 órás fermentáció hány órával (80-90 h?) csökkenthető le, vagy akár a felére is csökkenthető?

5.6 Együttes hatás vizsgálata

Tekintettel arra, hogy az előző fejezetekben leírtak alapján bizonyítottnak látszik a pellet méretének és az alkalmazott enzimek arányának együttes, egymást erősítő hatása, ezért megvizsgáltuk, hogy szorzatuk értéke milyen összefüggéssel van a termelődött cukor mennyiségére.

A 13. ábrán látható a pellet méret és enzim arány szorzat függvényében az 1 g szubsztrátból keletkezett cukor mennyisége.



13. ábra: Keletkezett cukor mennyiségének összefüggése a paraméter szorzattal

Az összefüggés-vizsgálat alapján, a nem túl magas lineáris korrelációs koefficiens, $r = 0,6658$, és a determinációs együttható, $r^2 = 0,4434$, mindenképpen valamilyen fokú lineáris kapcsolatra enged következtetni, de egyben további mérésekre, ill. elemzésekre is sarkall.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatásunk célja egy élelmiszeriparban termelődő melléktermék, a cukorrépa pellet szénhidrát tartalmának enzimes hidrolízise volt, annak érdekében, hogy a biotechnológiai úton történő bioetanol gyártás előkészítő lépésének, a kiindulási cukros oldat kinyerésének, egy energetikai, ezzel együtt környezetvédelmi, és gazdasági szempontból is kedvező módját megtaláljuk.

A vizsgálatok során megfigyeltük a szubsztrát szemcseméret változásának a hatásait a cukrosítás mértékére, majd különböző enzimmennyiségekkel, illetve enzimarányokkal teszteltük a hidrolízist. Összesen tehát három paramétert változtattunk, a két enzim mennyiségét, arányukat, és a szemcseméretet. A többi paraméter, a hőmérséklet, a pH, a keverési sebesség, a bemért pellet tömege, a bemért desztillált víz tömege, változatlan maradt a kísérleteink során.

Az enzimek mennyiségének illetve arányának a változtatásával kívántuk meghatározni az optimális, és leghatékonyabb „enzim-komplex” összetételt, hiszen a technológia így lehet gyors, költségkímélő és környezetbarát is egyben. Ehhez az enzimmennyiséghez a legalkalmasabb szemcseméretet kerestük.

Mérési eredményeinkből, az alábbi következtetéseket tehetjük:

- ✚ A cukorrépa pellet cellulóztartalma alkalmas bioetanol gyártásához szükséges cukor előállítására
- ✚ Az enzimes lebontás sikeresen végezhető el a celluláz és cellobiáz enzimek együttes jelenlétében.
- ✚ A lebontási folyamatra mind az alkalmazott enzimek aránya, mind a pellet mérete hatással van.
- ✚ Azonos méretű pellet frakciók alkalmazása mellett a nagyobb CLA/CLB arány jobb cukorkihozatalt eredményez.
- ✚ cc. 0,3 mm átmérőjű pellet frakció felett az enzimarány növelése növeli a termelődött cukor mennyiségét.
- ✚ 0,3 mm pelletméret alatti mintáknál az enzimarány nincs hatással a kihozatalra.
- ✚ Azonos enzimarány mellett a nagyobb pelletméretnél kaptunk nagyobb cukorkoncentrációt a fermentáléban.

- ✚ A szubsztrát mikrohullámú kezelése jelentősen, közel duplájára növelte a cukor mennyiségét a fermentlében.
- ✚ A mikrohullámú kezeléssel a fermentációs idő jelentős mértékben csökkenthető.
- ✚ A korrelációs együttható értéke, ha nem is túl szoros, de lineáris összefüggésre utal a szubsztrát méret és enzim arány szorzatának értéke, valamint a mért cukormennyiség között.

A fentiek alapján elmondhatjuk, hogy a cukorgyártás folyamatánál keletkező melléktermék, a cukorrépa pellet alkalmas bioetanol gyártás alapanyagaként történő felhasználásra. A pellet szénhidrát tartalma sikeresen és kellően jó hatásfokkal bontható le erjeszthető cukorrá a celluláz és cellobiáz enzimek segítségével. A lebontás hatásfoka tovább növelhető és időtartama csökkenthető mikrohullámú előkezelés alkalmazásával.

A nyert fermentlé erjesztés előtti tisztítására, cukor koncentrációjának beállítására és az enzimek visszanyerésére a membránszeparáció alkalmas megoldást jelenthet, kísérleti munkánkat célszerűen ezzel a lehetőséggel bővítjük, ebbe az irányba folytatjuk.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ayhan Demirbas (2005): Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass, *Energy Sources*, 27:327-337
- Bai A., Lakner Z. (2002): *A biomassza felhasználása*, Szaktudás Kiadó Ház
- Balat M., Balat H., Öz C. (2008): Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. pp. 1-23.
- Beszédes S., László Zs., Horváth Zs., Szabó G., Hodúr C. (2011) : Comparison of the effects of microwave irradiation with different intensities on the biodegradability of sludge from the dairy and meat industry, *Bioresource Technology* 102 (2011) 814-824
- Cardona C.A., Sanchez A. J. (2007): Fuel ethanol production. Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technologies*. 98 pp. 2415-2457.
- Dienes D. (2006): Celluláz enzimek hatása a szekunder rostok tulajdonságaira, http://www.omikk.bme.hu/collections/phd/Vegyeszmernoki_es_Biomernoki_Kar/2006/Dienes_Dora/ertekezes.pdf
- Giber J. (2005): *Megújuló energiák szerepe az energiaellátásban*, B+V Kiadó
- Gyulai I. (2006): *A biomassza-dilemma*, Magyar Természetvédők Szövetsége, Budapest
- Tóth L., Sembery P. (2004): *Hagyományos és megújuló energiák*, Szaktudás Kiadó Ház
- Galbe, M., Zacchi, G., A review of the production of ethanol from softwood, *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 618-628, 2002
- Gan, Q., Allen S.J., Taylor G. (2002): Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis, *Biochemical Engineering Journal* 12, 223-229.
- Gögs Z. (2005): Biomassza potenciál és hasznosítása Magyarországon. In: „*Biomassza-energia a mezőgazdaságból*” – Hőenergia, villamos áram és hajtóanyag a szántóföldről Hármashatár konferencia magyar előadásai; Nyitra, Szlovák Köztársaság 2005. május 3-4.
- Gyalai-Korpos M. (2012): Betekintés a biomassza alapú etanol előállítás folyamatába, középpontban a *Trichoderma reesei* celluláz enzim termelésével, http://www.omikk.bme.hu/collections/phd/Vegyeszmernoki_es_Biomernoki_Kar/2012/Gyalai-Korpos_Miklos/tezis_hun.pdf
- Halász J., Hannus I., Kiricsi I. (2007): *Környezetvédelmi technológia*, JATEPress Kiadó

- Hancsók J., (2007): *Bio-hajtóanyag*. MKN 2007 Konferencia kiadványa. pp. 15-21
- Hodúr C., László Zs., Beszédes S., Kertész Sz., Kiricsi I., Szabó G (2008): Bioetanol előállítása lignocellulóz tartalmú alapanyagokból. *MTA AMB K+F Tanácskozás Konferencia Kiadványa*, Gödöllő, 2008.
- Juhász Á., Láng I., Nagy Z., Dobi I., Szépszó G., Horányi A., Blaskovics Gy., Mika J. (2009): *Megújuló energiák*, Sprinter Könyvkiadó, 44-52.
- Kantelinen, A., Jokinen, O., Pere, J., The mechanism of cellulase/hemicellulase treatment for improved drainage, *Biological Sciences Symposium*, 267-269, 1997
- Láng I. (1993): *Környezetvédelmi Lexikon*, Akadémia Kiadó, Budapest
- László Zs., Beszédes S., Kertész Sz., Hodúr C., Szabó G., Kiricsi I. (2007) : Bioethanol from sweet sorghum, *Hungarian Agricultural Engineering* 20. p. 15-17.
- Mabee, W.E., McFarlane, P.N., Saddler J.N., (2011): Biomass availability for lignocellulosic ethanol production, *Biomass and Bioenergy* 35, 4519-4529.
- Mamma, D., Christakopoulos, P., Koullas, D., Kekos, D., Macris, B.J., Koukios, E (1995): „An alternative approach to the biokonversion of sweet sorghum carbohydrates to ethanol” *Biomass and Bioenergy* 8(2) pp. 99-103.
- Mandels, M., Microbial sources of cellulase, *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 5, 81-105, 1975
- Menon, V., Rao, M., (2012): Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, *Progress in Energy and Combustion Science* 38, 522-550.
- Neményi M. (2008): *Növényi bio-hajtóanyagok*, Mosonmagyaróvár
- Varga Cs. (2012): Cukorrépa, *Élelmiszeripari alapismeretek*, <http://zeus.nyf.hu/~tkgt/okse/elista08/elis0806.pdf>
- <http://www.etanol.info.hu> (Magyar Bioetanol Szövetség)
- <http://www.nyf.hu/others/html/kornyezettud/megujulo/Biomassza/Biomassza.html#felhasznalasa>
- <http://www.sterlingsihi.com/cms/hu/home/cel-piacok/ipar/elelmiszer-es-italgyartas/biodizel-es-bioetanol-elallitasa/bioetanol-elallitasa.html>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni konzulensemnek Prof. Dr. Hodúr Cecilia egyetemi tanárnak, valamint Ábel Marietta PhD hallgatónak, hogy a munkám során szakmai útmutatást adott, továbbá a kísérletek tervezésében, kivitelezésében és értékelésében a segítségemre volt.

Továbbá köszönetemet fejezem ki a *TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005* azonosító számú, „Kutatóegyetemi Kiválósági Központ létrehozása a Szegedi Tudományegyetemen” című és a *TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012* „Az SZTE Kutatóegyetemi Kiválósági Központ tudásbázisának kiszélesítése és hosszú távú szakmai fenntarthatóságának megalapozása a kiváló tudományos utánpótlás biztosításával” című projektek támogatását, amelyek **az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósulnak meg**, és amelyek lehetővé tették, hogy kísérleti munkámat elvégezhessem.

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszachenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.