

Ionos folyadékok a mezőgazdasági hulladékok hasznosításában: úton az egylépéses előkezelés és cellulóz hidrolízis felé

OTDK-dolgozat

Készítette: Megyeri Gábor, Környezetmérnök MSc, I évfolyam

Témavezető: Dr. Nemestóthy Nándor, tudományos munkatárs

Pannon Egyetem; Mérnöki Kar; Biomérnöki, Membrántechnológiai és
Energetikai Kutató Intézet

2012

Tartalomjegyzék:

Tartalomjegyzék:	2
1. Bevezetés:.....	5
2. Cellulóz:	7
2.1. A cellulóz fő forrása:	7
2.2. A bontásban résztvevő enzimek:.....	10
2.3. A cellulózbontást befolyásoló tényezők a természetben:.....	11
2.4. Cellulóz előkezelése napjainkban:.....	11
3. Bioüzemanyagok:	13
3.1. Etanol:.....	13
3.2. Butanol:	14
3.2.1. Felhasználás:.....	15
3.2.2. Hagyományos előállítása:.....	16
3.2.3. Biológiai előállítás:.....	17
4. Ionos-folyadék:	19
4.1. Általános jellemző:	19
4.1.1. 1-n-butil-3-metil-imidazolium-klorid:.....	22
4.2. Előkezelés ionos folyadékban:.....	23
5. Céltitűzés:.....	26
6. Felhasznált anyagok és technikák:	27
6.1. Anyagok és eszközök:	27
6.1.1. Felhasznált anyagok:	27
6.1.2. Használt eszközök:.....	27
6.2. A mérés menete:	27
7. Eredmények és tárgyalásuk:.....	29
7.1. Tisztított cellulóz:	29
7.1.1. A tisztított cellulózzal kapott eredmények:.....	30
7.1.2. A Cellic HTec2 enzimmal végzett mérések eredményei:	31
7.1.3. A Cellic CTec2 enzimmal végzett mérések eredményei:	35

7.2. Kukorica:	40
7.2.1. A kukorica őrleménnyel kapott eredmények:	41
7.2.2. A Cellic HTec2 enzimmel végzett mérések eredményei:	42
7.2.3. A Cellic CTec2 enzimmel végzett mérések eredményei:	45
7.3. Összefoglalás:	50
Köszönetnyilvánítás:	55

Absztrakt:

Az olcsó, megújuló forrásból származó lignocellulóz tartalmú anyagok jelentik a bioüzemanyag gyártás jövőjét. A fa és a mezőgazdasági hulladékok (pl. szalma, kukoricaszár, stb.) képezik azt az étkezési célokra nem használható nyersanyagforrást, amiből a bioüzemanyagok egy része megtermelhető, ugyanakkor nem veszélyeztetik az élelmiszer ellátást.

A lignocellulóz három fő összetevője a cellulóz, a hemicellulóz és a lignin. A bioüzemanyag előállításából – ellentétben a szénhidrátokat (pl. glükóz és keményítő) felhasználó első generációs gyártással – három fő lépésben történik: 1) a nyersanyag aprítása és előkezelése, ami lignocellulóz tartalmú anyagokat alkalmassá teszi enzimes/mikrobiális/savas hidrolízis számára; 2) a cellulóz és hemicellulóz hidrolízise fermentálható redukáló cukrokká; 3) a cukrok fermentálása bioüzemanyagokká.

E lépések közül a napjainkban a leginkább vizsgált lépés az előkezelés, mert ennek elsődleges célja a lignocellulóz komplex feltárása, minek hatására az enzimek számára hozzáférhetővé, lebonthatóvá válik. A számos, eddig vizsgált fizikai, kémiai, biológiai vagy ezek kombinációjából álló eljárás mindegyike rendelkezik olyan hátrányokkal, melyek megakadályozták a gazdaságos használatot. Napjainkban előtérbe kerültek az ionos folyadékokban végzett előkezelések. Ezek hatására a cellulóz szerkezet olyan mértékben fellazul, hogy antizsolvens adagolás hatására nagy hozammal nyerhető ki az amorf, az enzimes hidrolízis számára alkalmas cellulóz.

Kísérleti munkám célja és újszerűsége, hogy az ionos folyadékos (1-n-butil-3-metil-imidazolium-klorid ([Bmim]Cl)) előkezelést úgy végezzem el, hogy ne legyen szükség az antizsolvens alkalmazására, hanem a hidrolízist, az ionos folyadékos oldatban tudjam elvégezni. Vizsgálataimhoz modell anyagként tisztított cellulózt használtam. Több paraméteres kísérlettervezéssel határoztam meg az előkezelésre és az enzimes hidrolízisre jelentős hatást gyakorló paramétereket és optimális értékeiket. Ezen adatok birtokában végeztem további kísérleteimet kukorica (*Zea mays*) levélnek és szárának a keverékével. Megállapítottam, hogy az ionos folyadékos kezelés hatására a cellulóz szerkezet olyan változáson esett át, hogy a NOVOZYMES (Dánia) cég által kifejlesztés alatt levő Cellic® CTec2 és Cellic® HTec2 enzimkomplexek hatására magas hozammal képződött a már fermentálható glükóz.

1. Bevezetés:

Napjainkban a fosszilis energiahordozók csökkenő mennyisége és az emberiség egyre növekvő energia igénye miatt egyre nagyobb igény mutatkozik az alternatív, megújuló energiaforrások iránt, amik könnyen beilleszthetők a már meglévő rendszerekbe, és nem igényelnek nagy átalakításokat. Ennek egyik megoldása lehet a biomassa, konkrétan a lignocellulóz tartalmú anyagok hidrolízise és a felszabaduló egyszerű cukrok tovább alakítása, fermentálása bioüzemanyagokká (Orozco, 2007). A biomassa előkezelése egy kulcs lépésnek is tekinthető az olcsó bioüzemanyagok felé, mivel képes átalakítani a lignocellulóz struktúráját, így megkönnyítve az enzimek munkáját és növelve a felszabaduló cukrok mennyiségét (Bahcegul, 2012). A lignocellulóz, így a cellulóz stabil, kristályos szerkezete ezt az átalakítást nagyon nehezíti és energia igényessé teszi. Ennek megkönnyítésére jelenthet alternatívát az ionos folyadékok alkalmazása. Cellulózból sokféle termék származik már ma is, mint például rostok, papír, membrán (Swatloski, 2002). Az előkezelés alkalmazásával kiszélesedhet a cellulóz tartalmú biomassa jelenlegi felhasználása (Shengdong, 2006) és alternatívát jelenthet a petróleum származékokkal szemben (Wang, 2010).

Az ionos folyadékok alkalmazása két fő zöld kémiai elvnek is eleget tesz, ezek a környezetbarát oldószerek és megújuló nyersanyag forrás használata (Shengdong, 2006). Előkezelésre való alkalmazásuk még korai fázisban van, (Auxenfans, 2012) de egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik irántuk (Bahcegul, 2012; Lozano 2011; Łuczak, 2008).

A biomassa szinte korlátlan mennyiségben áll rendelkezésünkre (Szentgyörgyi, 2011), megújuló nyersanyagforrásnak tekinthető (Lozano, 2011) és fenntartható módon termeszthető (Eylen, 2011). A mezőgazdasági hulladékok alkalmazása pedig nem jelent plusz földhasználatot (Eylen, 2011). Ennek alkalmazásával csökkenthető a nettó CO₂ kibocsátás (Szentgyörgyi, 2011), a fosszilis energiától való függőség és ez által az üvegházhatás. Mivel képződéséhez napenergiára is szükség van, ezért ez jó és fontos megújuló nyersanyagforrás (Aimaretti, 2012; Sánchez, 2008), és így a Földre érkező napenergia nagyobb részét tudnánk hasznosítani. Mivel a mezőgazdaságban keletkező hulladékot vagy az erre a célra telepített erdőket lehetne felhasználni ezért nem jelent veszélyt az élelmiszer ellátásra (Auxenfans, 2012; Graham-Rowe, 2011).

A kőolajhoz való ragaszkodásunk, a környezetbarát technológiák hiánya, a cellulóz átalakításának nehézségei és a kevés oldószert hátráltatták a cellulóz nagyobb mértékű kihasználását (Shengdong, 2006).

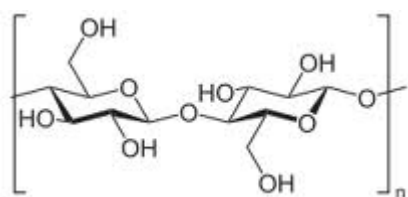
A bioüzemanyag gyártás fejlesztésének velejárója, hogy csökken az energia bevitel a gyártási folyamat során (Auxenfans, 2012).

2. Cellulóz:

2.1. A cellulóz fő forrása:

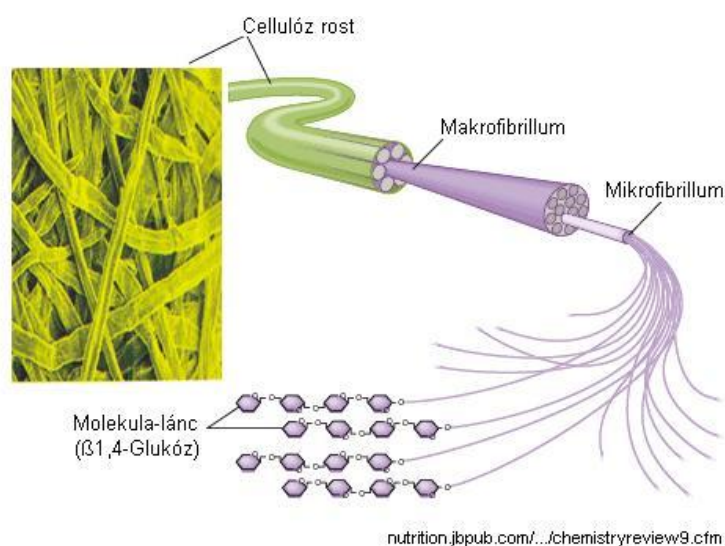
A lignocellulóz tartalmú anyagok három fő polimerből épülnek fel. Ezek a cellulóz, a lignin és a hemicellulóz.

A cellulóz (1. és 2. ábra) egy lineáris, rendkívül rendezett (gyakran kristályos) homopoliszaharid amely cellobiózból (D-glukopiranozil- β -1,4-D-glukopiranoz) épül fel (Eylen, 2011; Kumar, 2008). A cellobióz a cellulóz legkisebb ismétlődő egysége (Kumar, 2008). Ez a fa tömegének több mint 50%-át teszi ki.



1. ábra: A cellulóz általános szerkezete

„A polimer szálakat erős hidrogénkötések és Van der Waals kötőerők tartják össze.” (Szentgyörgyi, 2011; Swatloski, 2002) Egy szál akár 15000 egységből is állhat. (Szentgyörgyi, 2011)

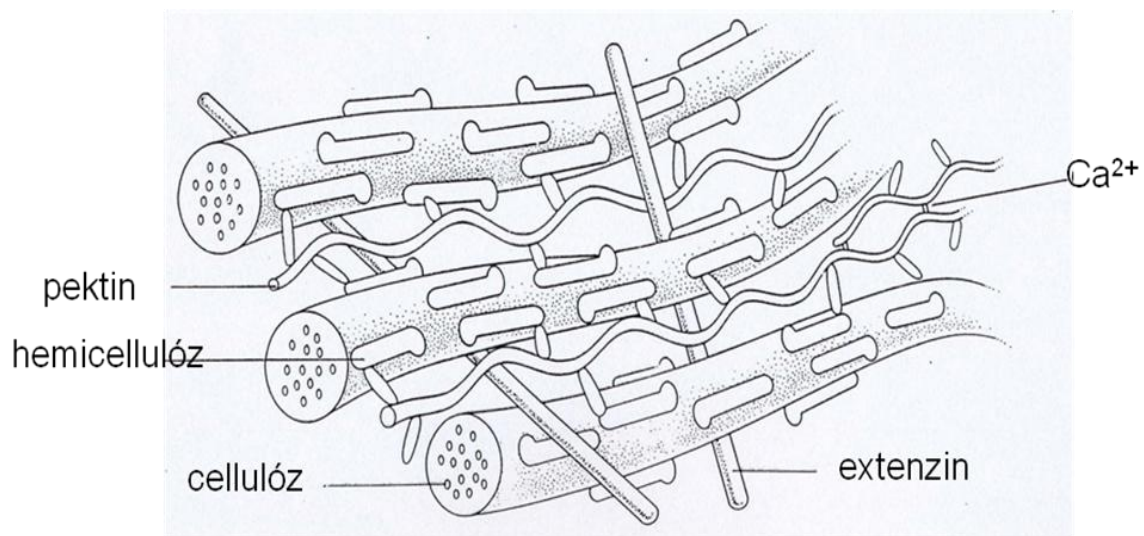


2. ábra: A cellulóz rost szerkezete

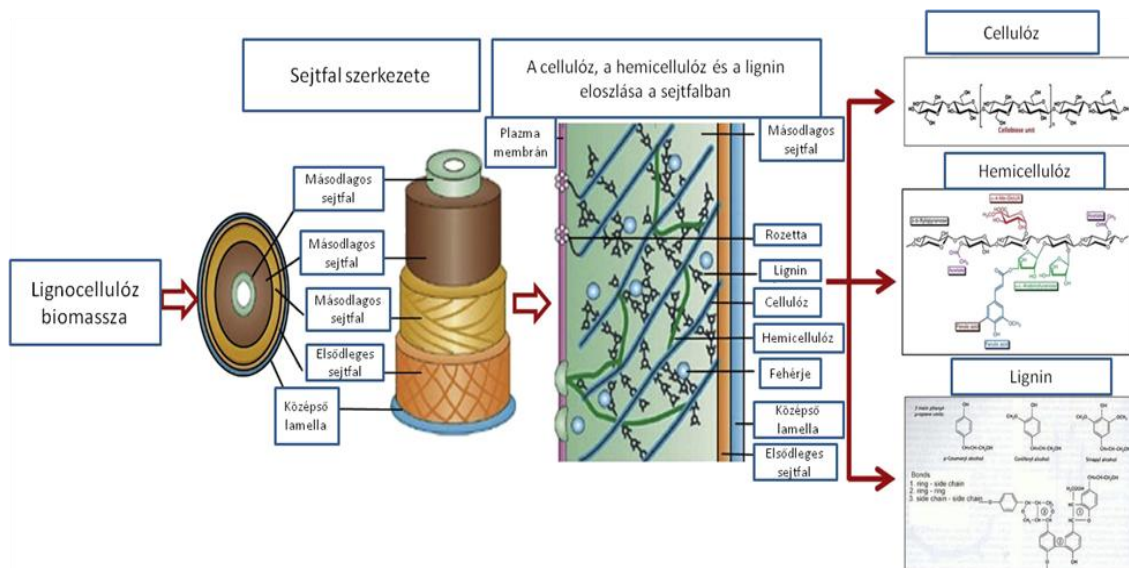
A lignin egy háromdimenziós hálózatot épít fel dimetoxil (S), monometoxilált (G) és nem-metoxilált (H) fenilpropanoid egységekből. Ezek p-hidroxi-fahéjalkoholokból származnak.

A lignin rendkívül ellenálló kémiai és biológiai bontásokkal szemben, így mechanikai védelmet biztosít. A középső lamellában található meg a legnagyobb mennyiségben, ahol a rostok között a cementhez hasonló kötő szerepe van. E mellett a külső rétegben is megtalálható (főleg a másodlagos sejtfalban). Itt a hemicellulózzal egy amorf mátrixot alkotnak, amibe beágyazódva találhatóak a cellulóz rostok, így védve őket meg a biológiai bontástól. A háromféle lignin arányának megfelelően (H:G:S) különbséget tehetünk a különböző növények között. A fás nyitvatermőkben (puhafák) van a legnagyobb lignin tartalom, és ez főleg a G alegységből épül fel. A fás zárvatermőkben (keményfák) az S és G alegységek dominálnak. A nem-fás zárvatermőkben mind a három alegység megtalálható. A lignin összetétel változhat a szövetek és a sejtfal rétegek között.

A hemicellulóznak közepes fokú szerepe van a felépítésben. Ez egy heterogén-polimer, amely különböző pentózokból (D-xilóz, D-arabinóz) és hexózokból (D-mannóz, D-glukóz, D-galaktóz) és glükóz savakból (Kumar, 2008) épül fel, amik gyakran acetiláltak és elágazó szénláncot tartalmaznak (Martínez, 2005). A puhafákban általában glukomannán, a keményfákban főleg xylán alkotja különböző százalékban galaktózzal, arabinózzal, rhamnózzal, és methilglukuron savval (Eylen, 2011; Huisman, 2000; Kumar, 2008; Martínez, 2005). A lignocellulóz biomasszában 25-35%-ban fordul elő, ezért bőséges megújuló biomassza (Kumar, 2008). Feladatuk a cellulóz szálakból álló sejtfalváz rögzítése a cellulózmolekulákhoz kapcsolódva (3. és 4. ábra). A rostok lényegesen rövidebbek, és a láncok gyakran elágazódást tartalmaznak. Kémiai ellenálló képességük kisebb, a cellulóznál.



3. ábra: A cellulóz és hemicellulóz egymáshoz viszonyított elhelyezkedése

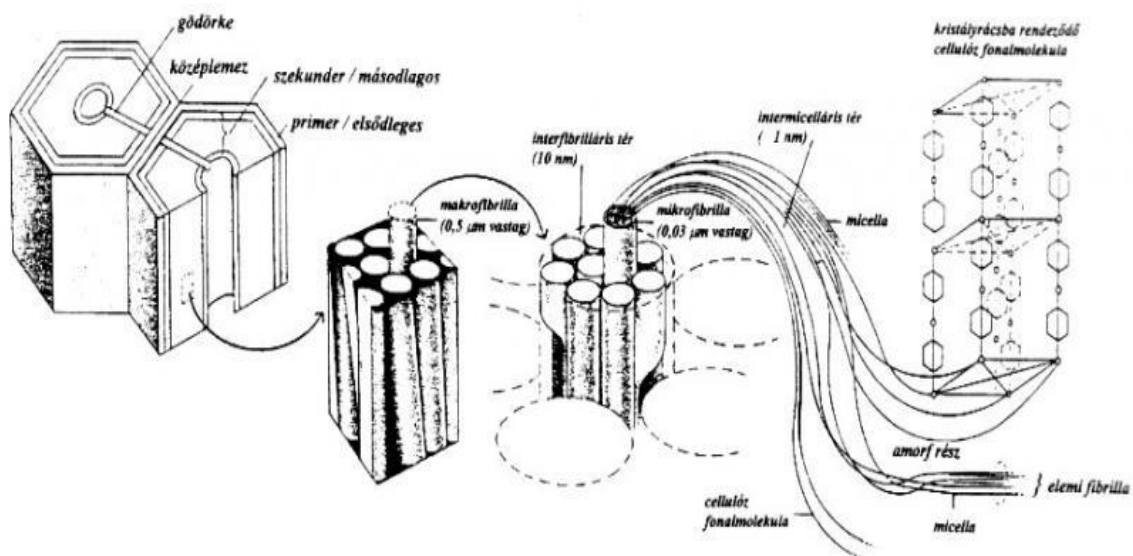


4. ábra: Lignocellulóz felépítése (Menon, 2012)

A további nem strukturális elemek között vannak extraktívumnak nevezett szerves oldatok, amik lehetnek polárosak (fenol, csersav) vagy nem-polárosak (zsírok, szterolok), vízzoldható vegyületek (cukrok, keményítő), fehérjék és hamu. Néhány puhafában ezek a fa száraz tömegének akár a 20%-át is kitehetik, de általában kevesebb, mint 5%-ban fordulnak elő (Martínez, 2005).

A cellulóz, hemicellulóz és lignin mint fő összetevők alakítják ki a növények három fő szöveti elemét. Ezek a rostok, a zárványok és a parenchyma sejtek. A parenchyma sugarak radiális helyzetűek. A csatornák nagy, hosszirányban rendezett sejtek, melyek a vizet és a tápanyagokat szállítják a növény szárában (Martínez, 2005).

A rostok is hosszirányban rendezettek. Az ezeket alkotó sejtek falvastagsága jellemző a növényre és ez támasztja a növényt (5. ábra).



5. ábra: A sejtfa szerkezete (Internet 1)

Ennek a bonyolult szerkezetnek köszönhetően a növényi részek nehezen bonthatóak, emészthetőek (Hayes, 2009; Wang, 2010) és nehéz kinyerni belőle a cellulózt. A víz és a cellulázok is csak nehezen férnek hozzá, ezért előkezelés szükséges, hogy a felszabaduló redukáló glükóz mennyiségét növelni, a reakció időt pedig csökkenteni lehessen (Szentgyörgyi, 2011).

2.2. A bontásban résztvevő enzimek:

Az 1980-as évek közepén fedezték fel a lignin-peroxidázt (LiP) és a mangán-peroxidázt (MnP) a *P. chrysosporium* törzsekben. Mind a kettő nagy redox pontenciállal rendelkezik, ezért, mint igazi ligninázokat írták le.

Újabban *Pleurotus*-ban és egyéb gombákban leírtak egy harmadik típusú lignolitikus peroxidázt: a sokoldalú peroxidázokat (VP). Ez kombinálja a többi peroxidáz tulajdonságait.

Egyéb extracelluláris enzimek: oxidázok, melyek hidrogén-peroxidot képeznek, és a micéliumhoz kötődő dehidrogenázok, melyek csökkentik a lignin származékokat.

Gombákban az aril-alkohol dehidrogenáz (AAD) és a kinon reduktáz (QR) is szerepet játszik a ligninbontásban (Martínez, 2005).

A cellulóz bontásában a cellulázok vesznek részt, melyek hidrolízissel bontják azt. Három fő fajtája van: endoglukanáz, exoglukanáz és a β -glukozidáz. Az endoglukanáz random hasítja a cellulóz láncot. Az exocelluláz a cellulóz lánc végéről hasít le cellobióz egységeket. A β -

glukozidáz glükóz monomerekre hasítja a cellobiózt. Több tanulmány is bizonyítja, hogy ezek indukálható enzimek (Kumar, 2008).

A hemicellulóz bontásában sokféle enzim vesz részt. A xilán bontásért például az endo-1,4- β -xilanáz, a β -xilozidáz, az α -glukuronidáz, az α -L-arabinofuranozidáz és az acetilxilán észteráz felelősek a természetben. A glukomannán bontásában a β -mannanáz és a β -mannozidáz vesznek részt (Kumar, 2008).

A baktériumokban a cellulázok egy nagy komplexet is alkothatnak, amit celluloszómának neveznek. Ez egy nagy molekula (2000 kDa), mely extracellulárisan kapcsolódik össze. A többféle alegység egymás munkáját segíti. Hatékonyan bontja a glikozidos kötéseket. Ez az enzim komplex a sejten kívül helyezkedik el, de horgonyzó fehérjék a sejthez kötik (Kumar, 2008).

2.3. A cellulózbontást befolyásoló tényezők a természetben:

- pH: baktériumtörzsenként eltérő, de átlag 5,5 az ideális.
- Hőmérséklet: a celluláz aktivitás 50-65⁰C között optimális.
- Szénforrás: megfigyelések szerint a szubsztrátot 12%-os koncentrációig növelve a cellulázok mennyisége is nő, e fölött viszont a mennyiségük csökken.
- Nitrogénforrás: számos kísérlet elvégzése után, a tapasztalatok szerint az ammónium szulfát 0,5g/l-es koncentrációja mellett maximális a cellulázok termelése
- Foszforforrás: a kálium-dihidrogén-foszfát a legkedveltebb foszforforrás a baktériumok számára; a DNS-ben betöltött szerepe mellett számos intermedierekben, enzimekben és koenzimekben van szerepe

2.4. Cellulóz előkezelése napjainkban:

Az előkezelés kiválasztása alapjaiban határozza meg a felszabaduló cukor mennyiségét, és ezáltal a képződő bioüzemanyag hozamot (Bahcegul, 2012). A cellulóz oldhatatlan vízben és a legtöbb hagyományos szerves oldószerben (Swatloski, 2002), ezért előkezelni kell (Wang, 2010). Az oldódás hatására homogén reakciófázis jön létre (Swatloski, 2002). A napjainkban használt eljárások (pl: réz-oxid és xantán eljárás) nehézkesek, drágák és a használt oldószerek komoly környezeti problémákat okoznak, mivel nem regenerálhatóak (Shengdong, 2006).

Attól függően, hogy milyen erők játszanak benne szerepet beszélünk biológiai, kémiai, fizikai és fizikai-kémiai előkezelésről (Chandra, 2007; Szentgyörgyi, 2011).

-A biológiai előkezelésben baktériumok és gombák vesznek részt, de a cellulózt nem tudják hatékonyan bontani, ezért a polimerizáció foka nem csökken jelentősen.

-A fizikai előkezelés során az őrlés és a darálás energiaigényes (Menon, 2012; Szentgyörgyi, 2011) ezért ipari alkalmazása kerülendő.

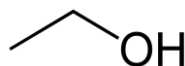
-A kémiai és fizikai-kémiai eljárások hátránya a vegyszer igény (pl: gőzrobbantás, SO₂-gőzrobbantás, savak, lúgok), ezek ára és az előkezelés során keletkező melléktermékek (alifás savak, furaldehid, aromás vegyületek), amik enzim inhibitorokként viselkednek (Auxenfans, 2012; Eyles, 2011; Szentgyörgyi, 2011; Martin, 2003; Menon, 2012).

Legújabbban N-methylmorpholin-N-oxidot (NMNO) és foszforsavat használnak, mert környezetbarátabb, származék nélküli oldószer (Swatloski, 2002).

3. Bioüzemanyagok:

3.1. Etanol:

Telített alkohol (C_2H_5OH), mely színtelen, jellegzetes szagú és ízű folyadék (6. ábra).



6. ábra: Az etanol sematikus ábrája

A molekulák másodrendű hidrogén-híd kötések kialakítására képesek, ezért viszonylag magas a forráspontja, illetve vízzel, éteres olajokkal korlátlan mértékben elegyedik. Jó oldószer, a gázok jobban oldódnak benne, mint a vízben. A természetben az erjedő gyümölcsökben, humuszban vagy a természetes vizekben található meg.

Erjesztéssel vagy fermentálással lehet előállítani glükóz tartalmú alapanyagokból (Escobar, 2009). Alkoholos italokban vagy fertőtlenítő szerekben lehet felhasználni, illetve benzinhoz keverve bioüzemanyagként (Internet 2).

Biomasszából ipari méretekben történő etanol előállításra három technológiát is kidolgoztak már (7. ábra). Mindhárom technológia gyenge pontja, buktatója a cellulóz hidrolízise.

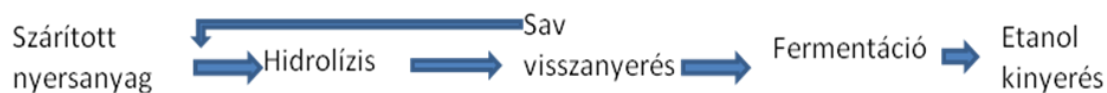
Az egylépcsős tömény savas hidrolízisnél (7. ábra: a) koncentrált savval (pl.: kénsav) történik a hidrolízis. A tömény sav miatt jó minőségű anyagokra van szükség, emiatt a beruházás drága. Egy másik hátránya, hogy a hemicellulóz gyorsabban bomlik, mint a cellulóz, így az abból származó cukrok tovább tartózkodnak a reakcióterben, emiatt tovább bomlanak, ami anyagvesztéshez vezet (Internet 3).

A kétlépcsős híg savas hidrolízisnél (7. ábra: b) a cellulózt és a hemicellulózt külön-külön kezelik. A hemicellulóz hidrolizátumot elválasztják az első hidrolízis után. Ezzel a módszerrel mindkét nyersanyag hidrolízise optimalizálható. A második lépcsőben magasabb hőmérsékletet alkalmaznak ($200^{\circ}C$ körül), így nagy mennyiségű glükóz és lignin degradációs termék is keletkezik (Internet 3).

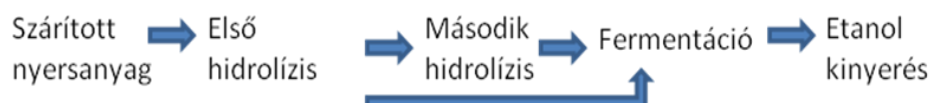
Az enzimés hidrolízisnél (7. ábra: c) először is a lignocellulóz biomasza méretét csökkentik, ezzel növelve a hozzáférhetőséget az enzimek számára. Az enzimés hidrolízis is egy kétlépcsős technika. A hemicellulóz hidrolízise után a cellulóz hidrolízise nem savval, hanem celluláz enzimek segítségével megy végbe. Az enyhébb körülmények miatt kevesebb melléktermék keletkezik, így jobb a glükóz felszabadulás. A cellulóz minél jobb átalakításához nagy mennyiségű enzim szükséges, ami költségessé teszi a lépést.

Gazdaságossá lehetne tenni a folyamatot, ha kevés enzim is elég lenne a konverzióhoz (Internet 3).

a) Egylépcsős tömény savas eljárás



b) Kétlépcsős híg savas eljárás



c) Enzimes eljárás



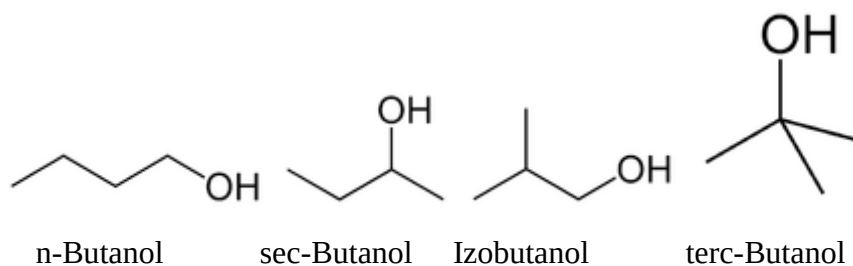
7. ábra: Biomassza előkezelés lehetőségei a: Egylépcsős tömény savas eljárás; b: Kétlépcsős híg savas eljárás; c: Enzimes eljárás

Az etanol hátrányai, hogy a benzinhez nagy mennyiségben keverve az autók motorjába egy átalakító egységet kell szerelni, és hideg időjárási körülmények között a keverési arányt csökkenteni kell, mert az etanol hajlamos kidermedni a benzintankban. Energiatartalma kisebb, mint a benziné, így a motorok vesztenek a teljesítményükből, e mellett fogyasztásuk is nő. Ezen hátrányok miatt nem hiszem, hogy ez a legjobb alternatív üzemanyag.

3.2. Butanol:

Butil-alkoholnak, vagy biobutanolnak (ha biológiai eredetű) is szokták nevezni. 4 szénatomos molekula, melynek 4 izomerje van. A butanol név az n-butanol (1-butanol) izomert takarja. Ez egy egyenes láncú molekula. Primer alkohol, mivel a hidroxil csoport az első szénatomhoz kapcsolódik (Internet 4). Színtelen, gyúlékony folyadék, amely közepesen illékony és banánhoz hasonló illata van (Internet 5). Alternatív üzemanyag, oldószer és kémiai

szintézisek intermediere. A butanol magasabb energiatartalommal rendelkezik, mint az etanol, és kevésbé oldódik vízben, ezért az iparban keresettebb. A 2-butanolban (sec-butanol) a hidroxil csoport a második szénatomon helyezkedik el. Az izobutanol (2-metil-1-propanol) tartalmaz egy elágazódást. A tercier-butanol (2-metil-2-propanol) egy „központi” szénatomot tartalmaz. (8. ábra)



8. ábra: Különböző butanol izomerek

A 2-butanol és a tercier-butanol jól oldódik vízben. Az n-butanol és az izobutanol oldhatósága korlátozott a hidroxil csoport polarizáló hatása miatt (Internet 4).

Az n-butanol lényegében nem mérgező a vízi élőlényekre és a madarakra. A természetben könnyen elbomlik (Internet 5). A vízben biodegradációval, a levegőben fotodegradációval bomlik (Internet 5).

Az emberi tevékenységen kívül természetes forrásokból is kikerülhet a természetbe. Ezek a források különböző növények (rozs, fű), fák (bükk, nyár, gyertyán), állati hulladék vagy mikrobák lehetnek (Internet 5).

3.2.1.Felhasználás:

Kozmetikumokban biztonságosan használhatóak a kis toxicitás miatt, de többszöri túlzott használat központi idegrendszeri problémákat okozhat, mint más rövid szénláncú alkoholok. Extrém esetben halált is okozhat. Szemfestékekben, alapozókban, rúzsokban, személyi higiéniai termékekben használják.

Bioüzemanyagként 85%-ig keverhető a jelenlegi üzemanyagokhoz. Így a motor semmilyen átalakításra nem szorul, ellentétben az etanol alkalmazásával (Internet 4). Energiasűrűsége a benzinéhez hasonló, ezért ez lehet a legjobb alternatív üzemanyagforrás.

Az iparban több helyen is használják:

- oldószer: festékek, bevonatok, lakkok, gyanták, gumik, viaszok
- lágyítószer

- bevonatok: önjavító lakkok
- intermediér vagy nyersanyag kémiai folyamatokban: biztonsági üveg, hidraulika folyadék
- textíliák: szövet bevonatok
- flotációs ágens
- tisztítószerekben
- padlófényezőkben
- gyógyszerekben, antibiotikumokban, hormon tartalmú készítményekben, vitaminokban
- adalékanyag a gázolajban
- fékfolyadék

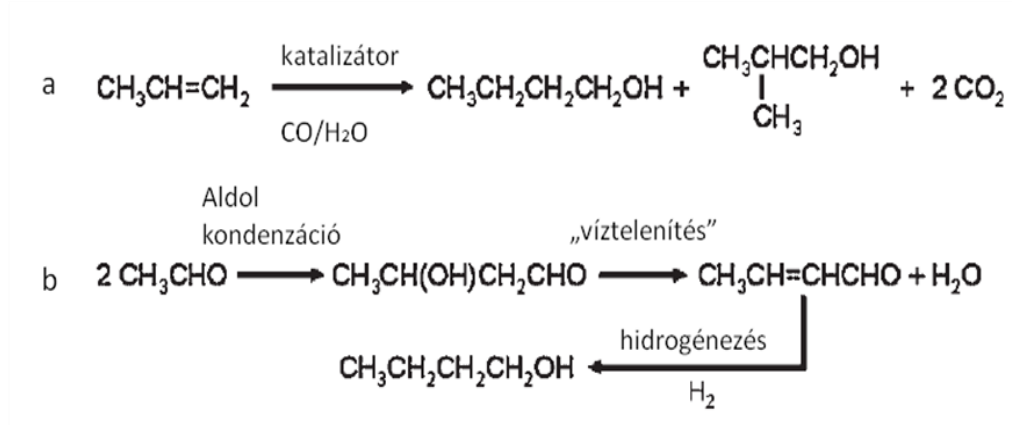
(Internet 4, Internet 5)

3.2.2.Hagyományos előállítása:

Három fontosabb eljárás ismert. Ezek az oxoszintézis (hidroformilezés), a Reppe szintézis és a krotonaldehid hidrogénezés.

A Reppe szintézis során propént, szén-monoxidot és vizet reagáltatnak katalizátor jelenlétében. Alacsony hőmérsékleten és nyomáson képződik a butanol. A technológia magas ára miatt nem terjedt el.

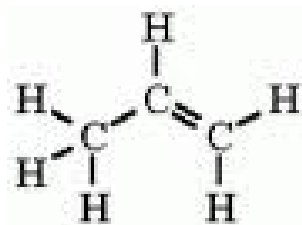
A krotonaldehid hidrogénezésnél aldol kondenzáció után a keletkező terméket „víztelenítik”, majd hidrogénezik (Sang, 2008), (9. ábra).



9. ábra: a: Reppe szintézis

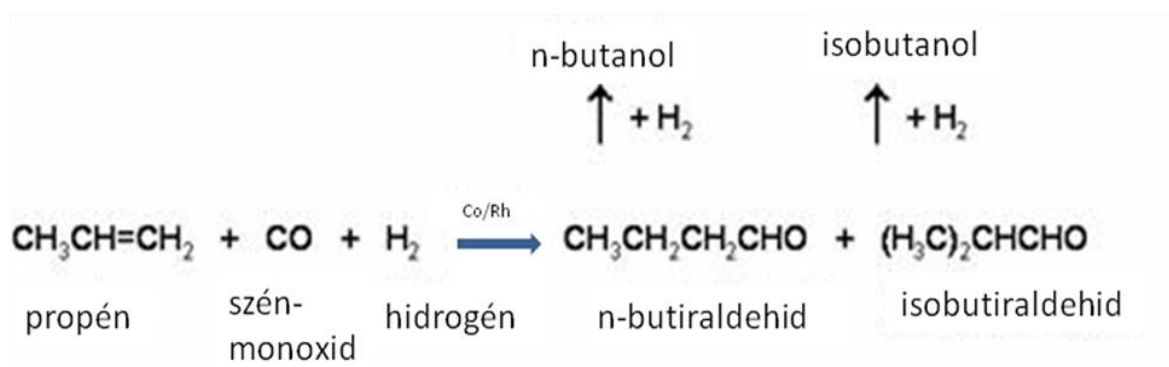
b: krotonaldehid hidrogénezés (Sang, 2008)

A legelterjedtebb az oxosintézis, mely során propénből állítják elő. A propén egy telítetlen szerves vegyület, mely az alkének közé tartozik és egy kettős kötést tartalmaz (10. ábra). Gáz halmazállapotú, színtelen, szagtalan és gyúlékony (Internet 6). Hő bontással állítják elő kőolaj és földgáz néhány frakciójából.



10.ábra: A propén szerkezete

Hidroformilezéssel butanalt állítanak elő, amit aztán hidrogénnel redukálnak, és 1-butanol vagy 2-butanol keletkezik (11. ábra). Szobahőmérsékleten gáz halmazállapotú, színtelen, szagtalan. Kőolajból vagy földgázból, kisebb mértékben szénből állítják elő. A kőolaj és földgáz finomítás egyik mellékterméke.



11. ábra: Butanol előállítása propénből (Internet 5)

A terminális szén-szén kettős kötéshez szén-monoxidot és hidrogént kapcsolnak. 8-10-szer több n-butiraldehyd keletkezik, mint izobutiraldehyd. Ezután az n-butiraldehydet hidrogénnel reagáltatják, így n-butanol keletkezik. Az izobutanol melléktermékként keletkezik (Internet 5).

3.2.3. Biológiai előállítás:

Az 1950-es évek óta *Clostridium acetobutylicum*-mal is előállítják a butanolt biomasszából, anaerob fermentációval. Ez a baktérium egy obligát anaerob, spórás prokarióta, ami oldószert

–butanol- termel, és az oldószertermeléshez kapcsoltn hidrogént is előállít. 1916-ban fedezték fel. Gram-pozitív baktérium, és csak néhány órát bír ki aerob körülmények között. A sejtek életciklusa három szakaszra osztható:

- acidogén: sejtek szaporodnak és savakat (acetát, butirát) termelnek;
- szolventogén: stacioner fázis, acetont, butanolt és etanolt termelnek;
- alkoholgén: butanol és etanol termelés folyik.

A folyamat minden lépésében keletkezik CO₂ és H₂.

A *Clostridium acetobutylicum* M5-ös törzsében az alkohol/aldehyd dehidrogenáz (AAD) felelős a butanol képződésért (Sillers, 2008). A baktérium sokféle szubsztráttal életképes, az egyszerű pentózoktól és hexózoktól kezdve a bonyolultabb poliszacharidokig.

Más vizsgálatok is bizonyították, hogy az anaerob, oldószertermelő klostridiák a szénforrás széles skáláját képesek átalakítani (pl: glükóz, galaktóz, cellobióz, mannóz, xylóz) butanollá, acetonná és etanollá (ABE). Sokféle enzimet választanak ki, (α -amiláz, α -glükozidáz, β -amiláz, β -glükozidáz, pullulanáz), amik a polimerek bontásában vesznek részt. A sokféle képződő monomer membránhoz kötött fehérjék segítségével jut a sejtbe, ez szükséges a hatékony szénfelhasználáshoz. Ennek a jelentősége abban áll, hogy így sokféle szubsztrátot fel tudnak használni. Számos szénforrást kipróbáltak a laboratóriumokban pl: keményítő, kukorica, melasz. De a klostridia nem képes eredményesen hidrolizálni a rostban gazdag mezőgazdasági termékeket, így azokat előkezelní kell. A kezelés során azonban mikrobiális inhibitorok jelennek meg. A szubsztrátok ára nagyban befolyásolja a képződő butanol árát (Chukwuemeka, 2007).

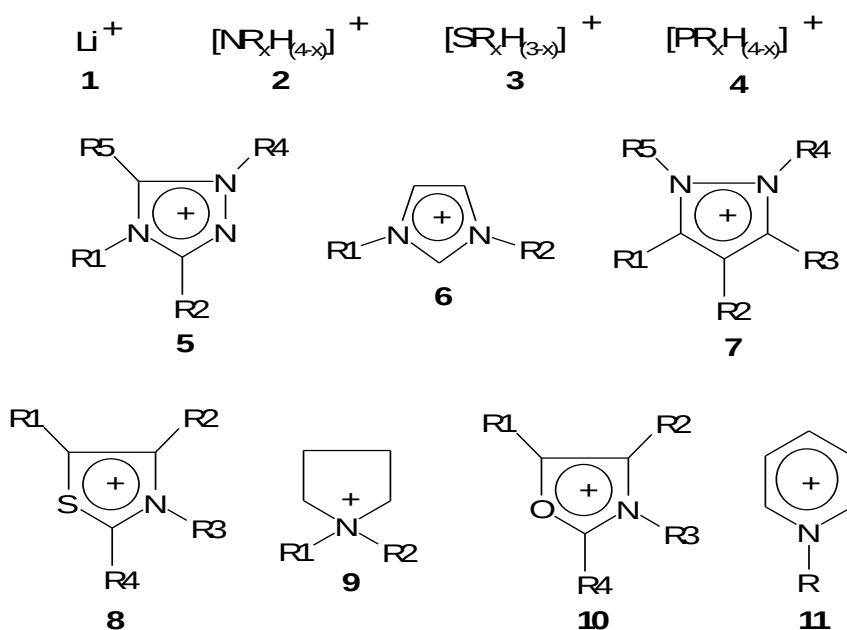
4. Ionos-folyadék:

4.1. Általános jellemző:

Az ionos folyadékok olyan alacsony olvadáspontú sók (Wang, 2010), melyek kizárólag ionokból állnak, magas hőmérsékleten sem párolognak, nem illékonyak, nem gyúlékonyak (Szentgyörgyi, 2011; Auxenfans, 2012; Łuczak, 2008; Lozano, 2011; Wang, 2010), hőstabilak és kémiaiilag is stabilak (Shengdong, 2006). Mindenféle folyadékkal jól elegyednek (Szentgyörgyi, 2011). Az alacsony olvadáspont az aszimmetrikus szerves kationnak köszönhető, mely csökkenti a rácsenergiát (Łuczak, 2008).

Ionos folyadékok szinte korlátlan variációban állíthatóak elő (Fehér, 2008; Swatloski, 2002), mivel a felépítő anionok és kationok száma nagy és tetszőlegesen kombinálhatóak.

Az 12. és 13. ábrákon, a teljesség igénye nélkül, feltüntettem néhány kation és anion szubsztituálási lehetőséget (Fehér, 2008).



12 ábra: Leggyakoribb kationok: 1. lítium-, 2. ammónium-, 3. szulfónium-, 4. foszfónium, 5. triazolium-, 6. imidazolium-, 7. pirazolium-, 8. thiazolium-, 9. pirrolidínium-, 10. oxazolium-, 11. piridínium-ionok különböző mértékben szubsztituálva, ahol R_x lehet: H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ ($n: 0, 1, 2, 3, \dots$), aril-, stb. (Fehér, 2008)

Nem vízzoldható		→	Vízzoldható
1	$[\text{PF}_6]^-$		9 $[\text{CF}_3\text{CO}_2]^-$
2	$[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$	6 $[\text{CF}_3\text{SO}_2]^-$	10 $[\text{CH}_3\text{CO}_2]^-$
3	$[\text{BR}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4]^-$	$\Rightarrow$ 7 $[\text{BF}_4]^-$	11 $[\text{NO}_3]^-$
4	$[\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3\text{SO}_2]^-$		12 $[\text{Al}_2\text{Cl}_7]^-$
		8 $[\text{N}(\text{CN})_2]^-$	13 $[\text{AlCl}_4]^-$
5	$[\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3\text{CO}_2]^-$		14 $[\text{Cl}]^-$
			15 $[\text{Br}]^-$

13. ábra: Az ionos folyadékok leggyakoribb anionjai csoportosítása vízzoldhatóságuk szerint (Fehér, 2008)

A nagyszámú kombinációs lehetőségnek köszönhetően az ionos folyadékok tulajdonságai alakíthatóak. Arra is van lehetőség, hogy modellező szoftverek segítségével kiválasszuk a valószínűleg legmegfelelőbb ionos folyadékok körét a feladatunk megoldásához (Fehér, 2008). Irodalmi adatok alapján a hosszú oldalláncot tartalmazó ionos-folyadékok kevésbé hatékonyan oldják a cellulózt valószínűleg a csökkent klorid koncentráció miatt, viszont ezek szobahőmérsékleten is folyékonyak. „A gyengén vagy nem koordináló anionokat tartalmazó ionos folyadékok nem oldják hatékonyan a cellulózt” (Szentgyörgyi, 2011). Cellulózoldásra alkalmas ionos-folyadékot e két tulajdonság figyelembe vételével érdemes választani (Swatloski, 2002).

Van olyan ionos folyadék, amelyik egyáltalán nem toxikus, nem károsítja a környezetet (Wang, 2010), így zöld oldószerként jól alkalmazható. Regenerálhatóak például ion-cserével, reverz ozmózissal (Shengdong, 2006) és újra felhasználhatóak (Shengdong, 2006, Auxenfans, 2012).

Az ionos-folyadékok alkalmazásainak lehetőségei:

Segédanyag:

Kenőanyag

Enantioszelektivitást növelő ko-szolvens

Szenzorok: CO_2 , NO_2

Katalizátor: észterezés, hidrogénezés

Oldószer:

Biokatalízis

Polimerizáció

Analitika:

MALDI-TOF MS Mátrix

RP-HPLC

NMR Reagens

Elektrolízis:

Üzemanyagcellák

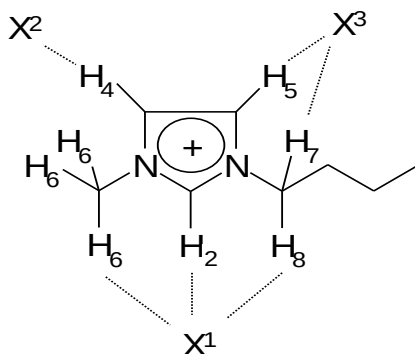
Elemek

Elválasztás:

Gázzeparáció

Extrakció

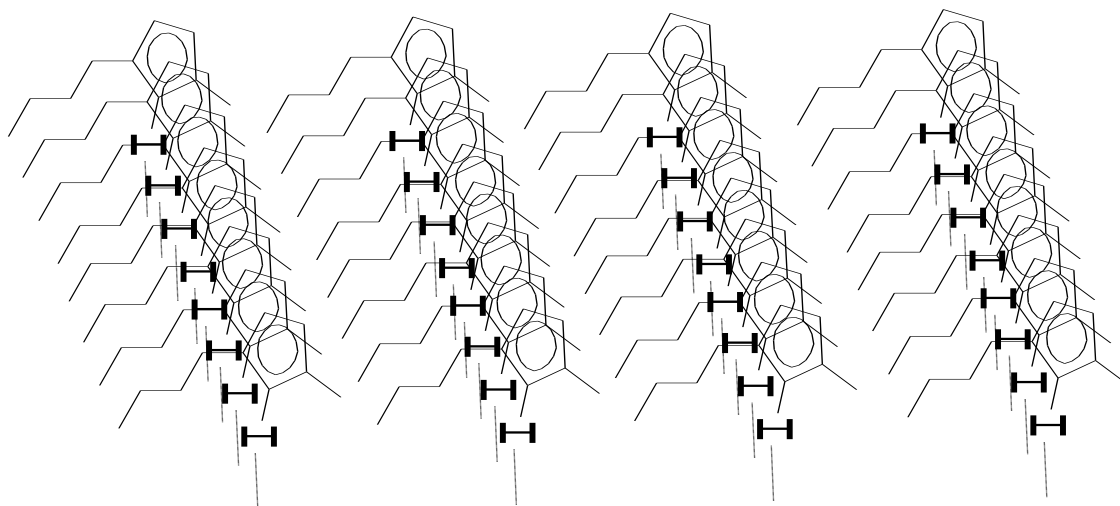
Az 1,3-dialkil-imidazolium típusú ionos folyadékok rendezett háromdimenziós szerkezettel rendelkeznek. Ezekben a kationok és anionok H-kötésekkel hálózatot alkotnak (Fehér, 2008). Ez kétdimenziós monomer egységekből épül fel úgy, hogy egy aniont minimum három kation vesz körül és fordítva. A N-atomok nagy elektronelszívó képessége miatt a gyűrű 2. pozícióján lesz legerősebb a H-kötés. Az elektronszívó hatásnak kevésbé kitett 4. és 5. pozícióban lévő H-atomok, és az N-alkil láncok H-atomjai közel azonos savassággal rendelkeznek (14. ábra).



14. ábra: Az imidazolium-kation szerkezete (Fehér, 2008)

Röntgen spektroszkópiás vizsgálatoknál azt találták, hogy az imidazolium gyűrűk láncot alkotnak az 1,3-dialkil-imidazolium típusú ionos folyadékokban. További vizsgálatok elvégzésekor kiderült, hogy sem az anionok, sem a kationok nem dúsulnak fel a felszínen és az imidazolium-ionok vízszintes helyzetben állnak (15. ábra) (Fehér, 2008). Az imidazolium-gyűrűk lapjukra elrendeződve, vízszintesen helyezkednek el. Az ábrán nincsen feltüntetve,

hogy a felszín létrehozásában Coulomb és van der Waals kölcsönhatások is részt vesznek (Fehér, 2008).

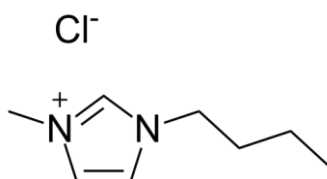


15. ábra: Visszaszórás spektroszkópiai eredmények az imidazolium-gyűrűk felszíni elhelyezkedéséről (Fehér, 2008).

Az 1-butil-3-metilimidazolium kationt tartalmazó ionos folyadékok sokféle anionnal lehetnek párban, a kicsi, hidrogénkötést elfogadótól (Cl^-) egészen a nagy, nem koordinálóig ($[\text{PF}_6]^-$), ide értve a Br^- , SCN^- és $[\text{BF}_4]^-$ ionokat is (Swatloski, 2002).

4.1.1. 1-n-butil-3-metil-imidazolium-klorid:

Az általam használt 1-butil-3-metil-imidazolium-klorid imidazolium szerves kationt és szervetlen klorid aniont (Szentgyörgyi, 2011) tartalmazó hidrofil ionos folyadék (Shengdong, 2006). Összegképlete: $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{ClN}_2$ (16. ábra), moláris tömege pedig 174,68 g/mol. Olvadáspontja 60°C körül van, a tisztított cellulózt 100°C -on 20 tömeg %-ig oldja.



16. ábra: [Bmim]Cl sematikus ábrája (Internet 7)

A cellulóz származékok képződése nélkül oldódik benne (Shengdong, 2006). Feltételezhetően a klorid ionok aktivitása játszik jelentős szerepet a hidrogén híd kötések felbontásában (Shengdong, 2006; Swatloski, 2002). Ezzel lehet a legnagyobb mértékben oldani a cellulózt (Swatloski, 2002; Lozano, 2011).

4.2. Előkezelés ionos folyadékban:

Az ionos folyadékos előkezelés a kémiai előkezelések csoportjába tartozik (Szentgyörgyi, 2011).

Graenacher már 1934-ben felfedezte, hogy nitrogén tartalmú bázisok jelenlétében az N-ethylpyridinium képes oldani a cellulózt (Shengdong, 2006; Swatloski, 2002).

Az ionos-folyadékok a lignocellulóz biomassa széles skáláját tudják részben vagy egészben oldani (Bahcegul, 2012; Lozano 2011). Feltételezhetően a vízmentes közeg miatt a hidrogénkötésben részt vevő hidrogén az anionhoz, míg a kation az oxigénhez kötődik (Szentgyörgyi, 2011, Auxenfans, 2012; Zhu, 2006). Ez segít a molekulán belüli és a molekulák közötti hidrogén híd kötések felbontásában és ezáltal az oldódásban (Auxenfans, 2012). Ennek eredményeként a celluláz enzimek hatékonyabban hidrolizálják a cellulózt (Auxenfans, 2012; Bahcegul, 2012). A nagy klorid ion koncentráció és aktivitás segíti a kiterjedt hidrogén-híd kötési rendszer bomlását, ezáltal nagyobb mennyiségben oldja a cellulózt és a celluláz enzimek munkáját is megkönnyíti a hagyományos rendszerekhez képest (Swatloski, 2002).

Irodalmi adatok alapján az előkezelések nagy része 100 °C körül történt, habár a foszfát alapú ionos folyadékokkal enyhébb körülmények között is végbemegy a cellulóz oldódása (Auxenfans, 2012).

Az ionos folyadékok hatása függ a biomasszától, annak lignin és hemicellulóz tartalmától, (Auxenfans, 2012) illetve a biomassa őrlemény szemcséinek méretétől (Bahcegul, 2012). A szemcseméret csökkentése energiaigényes, és növeli a keletkező bioüzemanyag árát (Bahcegul, 2012). Az előkezelés hosszának növekedése kismértékben csökkenti az ionos folyadék hatékonyságát (Auxenfans, 2012).

Az előkezelés eredményét például röntgen diffrakcióval lehet vizsgálni, melynél azt állapították meg, hogy a kristályos szerkezetre jellemző 3 karakterisztikus csúcs eltűnik (Szentgyörgyi, 2011). A kezelt minták kristályosodási indexe csökkent a kezeletlenekéhez

képest - habár a regeneráció során újrakristályosodhat-, de ennek nem volt hatása a glükóz felszabadulásra, ezért ez nem a legjobb jellemzője a glükóz felszabadulásnak (Auxenfans, 2012). A nagyobb mértékű emészthetőség inkább a cellulóz rostok kisebb szerveződésének és nem annyira a kristályosodási index csökkenésének köszönhető (Auxenfans, 2012). Másik tanulmány szerint a kristályosodás fontos leírója a cellulóz emészthetőségének (Bahcegul, 2012). A regenerált cellulóz polimerizációs foka hasonló a kiindulásihoz, de a kinézete jelentősen változott, mivel a szálak egy többé-kevésbé homogén szerkezetté olvadtak össze, bár ezt a regenerálás módja is befolyásolja (Shengdong, 2006; Swatloski, 2002).

Eddigi kísérletek során az előkezelés után az ionos folyadékot ioncserélt desztillált vízzel vagy etanollal kicsapták. Ezután a cellulózt tisztították, szárították és így végezték el vele a hidrolízist, de ez a lépés nehézkes és drága (Wang, 2010). A hidrolízis mértéke egy-másfél nagyságrenddel növekedett a kezeletlen mintákhoz képest. (Szentgyörgyi, 2011)

Mikrohullámú fűtést alkalmazva a cellulóz oldódás mértéke 25 tömegszázalékra növekedett, míg az ehhez szükséges idő néhány percre csökkent (Shengdong, 2006, Auxenfans, 2012). 1-etil-3-metil-imidazolium-acetáttal végzett kísérletek során 50 tömeg %-os koncentrációt is leírtak, és a minta szemcseméretének növelése nem befolyásolta a minta oldódását (Bahcegul, 2012).

Korábbi kísérletek alkalmával 1-butil-3-metil-imidazolium kationt (C_4mim) tartalmazó ionos folyadékokat vizsgáltak. Ezekben oldottak cellulóz pépet. Az oldódást különböző eljárásokkal segítették (1. táblázat), (Swatloski, 2002).

1. táblázat: Cellulóz pép oldódása különböző C₄mim kationt tartalmazó ionos folyadékokban (Swatloski, 2002)

Ionos folyadék	Melegítés módja	Oldhatóság (m/m%)
(C ₄ mim)Cl	melegítés (100 ⁰ C)	10%
	melegítés (70 ⁰ C)	3%
(C ₄ mim)Cl	melegítés (80 ⁰ C) + ultrahang	5%
(C ₄ mim)Cl	mikrohullámú melegítés	25%
	3-5-s impulzusok	viszkózus oldat
(C ₄ mim)Br	mikrohullámú	5-7%
(C ₄ mim)SCN	mikrohullámú	5-7%
(C ₄ mim)(BF ₄)	mikrohullámú	oldhatatlan
(C ₄ mim)(PF ₆)	mikrohullámú	oldhatatlan
(C ₄ mim)Cl	melegítés (100 ⁰ C)	5%
(C ₄ mim)Cl	melegítés (100 ⁰ C)	gyengén oldható

A homogén reakció előnye, hogy új bomlási utak nyílnak és kontrollálni lehet a keletkező terméket (Shengdong, 2006).

Kis koncentrációban az ionos folyadékok nem befolyásolják jelentősen az enzim aktivitást (Auxenfans, 2012).

A regenerált ionos folyadék alkalmazásakor víz marad az ionos folyadékban, ami csökkenti a cellulózoldás hatékonyságát, de ennek a mértéke ionos folyadéktól függ (Auxenfans, 2012). További csökkenést okozhatnak az ionos folyadékban maradó cellulóz szálak is (Auxenfans, 2012).

Víz jelenléte csökkenti az oldódást (Shengdong, 2006; Swatloski, 2002), valószínűleg a vízben lévő hidrogénkötések „versenyeznek” a cellulózban lévő hidrogénkötésekkel. Egy tömegszázaléknyi víz jelenléte jelentősen csökkentette az oldódási tulajdonságokat és a cellulózt nem lehet oldani (Swatloski, 2002).

Az előkezelés után a minta lignin tartalma különböző mechanizmusokon keresztül csökkenti az enzimátikus hidrolízis hatékonyságát, ezért fontos figyelni a lignin koncentrációt (Bahcegul, 2012).

5. Célkitűzés:

Munkám célja az 1-butil-3-metil-imidazolium-kloridban történő cellulóz oldás optimalizálása, majd a cellulóz hidrolíziséhez szükséges optimális mennyiségű puffer meghatározása volt anélkül, hogy a fellazult cellulózt tisztítási eljárásnak vetettem volna alá. A cellulóz oldása után a hidrolízist ugyanabban a reakciótérben végeztem, így két lépést sikerült összevonni. Ez az egy lépéses eljárás jó alternatívája lehet a savas előkezelésnek és hidrolízisnek (Auxenfans, 2012).

Irodalmi adatok alapján tisztított cellulózzal már elvégezték ezt az egy lépéses reakciót, bár más enzimmel és más ionos folyadékokkal (Auxenfans, 2012), biomasszára vonatkozóan azonban még nem jelent meg erre vonatkozó közlemény.

6. Felhasznált anyagok és technikák:

6.1. Anyagok és eszközök:

6.1.1. Felhasznált anyagok:

- tisztított cellulóz por (Macherey Nagel, MN100; Düren, Németország)
- kukorica szár és levél
- ionos folyadék: 1-butil-3-metil-imidazolium-klorid ([Bmim]Cl) ($C_8H_{15}ClN_2$; $M=174,68$ g/mol; Merck. O. p.: $60\text{ }^{\circ}\text{C}$; Cas-No:79917-90-1)
- enzimek: Cellic HTec2 (VHN00002); Cellic CTec2 (VCPI0006) Celluclast 1,5L (CCN03133) Gyártó: Novozymes (Dánia)
- orto-toluidin (TO01201000, Scharlau, Spanyolország)
- ecetsav (11110601, Scharlau, Spanyolország)
- NaOH (Gy.sz.:09040407; Spektrum 3D)
- nátrium acetát puffer: 2,8 ml ecetsavat oldottam desztillált vízben, a pH-t NaOHal 5-ös értékre állítottam be, majd desztillált vízzel 1 l-re töltöttem fel

6.1.2. Használt eszközök:

- külső keverők (RW16 basic, RW20 DZM, EVROSTAD digital, IKA-Labortechnik, Staufen, Németország)
- fotométer (DR3900, HACHLANGE)
- centrifuga (Sigma 4K10, B. Braun Biotech International)
- főzőlapok (Velp Scientifica, Arex Heating Magnetic Stirrer; RCT basis, IKA-Labortechnik, Staufen, Németország)

6.2. A mérés menete:

A kísérleteim menetét kétdimenziós kísérlettervezés segítségével állítottam össze. Ennek a módszernek a segítségével csökkeneti tudtam az elvégzéshez szükséges időt és a felhasznált anyagokat a nélkül, hogy a kísérletek kiértékelése csorbát szenvedett volna.

Munkám során a modell anyagként választott tisztított cellulóz port feloldottam 0,5 g ionos folyadéokban. Előkísérletek alapján ezt $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os olajfürdőben hajtottam végre. A cellulóz por oldása 90 percet vett igénybe, és a keverést 20 percenként 20 percig szüneteltettem. Ennek az volt a célja, hogy a már feloldódott, a keverőre ráragadt szirupszerű anyag eltávozzon, és utána a keverés intenzitása fokozódjon. Habár irodalmi adatok alapján az előkezelés hossza nem befolyásolja a későbbi hidrolízist (Auxenfans, 2012), az előkísérletek során úgy

tapasztaltam, hogy a cellulóz oldódása időigényes folyamat. A szükséges oldási idő letelte után intenzív keverés mellett 90 °C-os acetát puffert adtam hozzá, majd lehűtöttem 50 °C-ra. Ezután 15 µl enzimmel intenzív keverés mellett 2 órát inkubáltam az elegyet. A felszabaduló redukáló cukor mennyiségét orto-toluidin reagens segítségével, fotometriás úton határoztam meg.

A kukoricával (*Zea mays*) végzett kísérletek során annak szárát és levelét használtam fel. Tömegállandóságig való szárítás után mákdaráló segítségével aprítottam, majd 0,5 mm-es lyukátmérőjű szitán átszitáltam, mivel irodalmi adatok alapján (Bahcegul, 2012) a klorid iont tartalmazó ionos folyadékok a kis szemcseméretű növényi részeket tudják hatékonyan oldani.

7. Eredmények és tárgyalásuk:

7.1. Tisztított cellulóz:

A kísérleteket a 2. táblázat szerint végeztem el:

2. táblázat: A tisztított cellulózzal végzett előkísérletek paraméterei

feloldott cellulóz (m/m%)	puffer mennyisége (ml)				
	1	3,5	4,75	6	7
10	*			*	
15		*		**	
17,5			**		
20	*	**		*	***

Először *-al jelölt körülmények között végeztem el a kísérleteket, majd az adatokat a Statisztika 8.0 program segítségével kiértékeltem. Ennek alapján a ** -al megjelölt körülmények között folytattam a munkám, hogy az enzim működéséhez szükséges optimális körülményeket megkapjam. Irodalmi adatok alapján 4,5 ml-es puffer mennyiségnél (Auxenfans, 2012) várható a redukáló cukor felszabadulás maximuma, de az 6 ml-nél jelentkezett. Mivel a maximális redukáló cukor felszabaduláshoz szükséges puffer mennyiség a vártnál magasabb értékre tolódott ezért, a ***-al megjelölt körülmények között kiegészítő mérést végeztem, melynek eredményét a végső kiértékelésnél vettem figyelembe. A végső kiértékelésnél az összes kapott adatot felhasználtam. 7 ml puffer alkalmazásakor a korábban említett irodalmi hivatkozás szerint már csökkent a redukáló cukor felszabadulás, amit azzal magyaráztak, hogy a foszfonát tartalmú ionos folyadékot destabilizálja az enzim (Auxenfans, 2012). Én klorid iont tartalmazó ionos-folyadékot használtam. Ebben az esetben is lehetséges zavaró reakció fellépése, de ennek, pontos okának a kiderítésére további vizsgálatok szükségesek.

A számolásnál a következő képletet használtam (Auxenfans, 2012):

$$\text{redukáló cukor felszabadulás(\%)} = \{[\text{glükóz(mg)} * 162 / 180] / \text{bemért cellulóz(mg)}\} * 100$$

7.1.1. A tisztított cellulózzal kapott eredmények:

Az 3. táblázatban a bemért cellulózból felszabadult glükóz mennyisége látható százalékban.

3. táblázat: A tisztított cellulózból keletkezett glükóz az elméleti érték százalékában

	feloldott cellulóz								
	10 m/m%		15 m/m%		17,5 m/m%	20 m/m%			
	puffer								
	1 ml	6 ml	3,5 ml	6 ml	4,75 ml	1 ml	3,5 ml	6 ml	7 ml
Cellic HTec2	12,50	31,51	25,85	38,64	37,72	6,44	29,79	48,56	29,55
Cellic CTec2	17,4	83,24	61,78	99,2	79,1	8,42	58,03	82,34	69,29
Celluclast 1,5L	3,55	34,35	20,00	-	-	6,49	-	24,95	-

Mivel a Celluclast enzimmel kapott eredmények a másik két enzimpreparátummal összevetve nem voltak biztatóak, ezért a Celluclast enzimet kivettem a kísérletből.

Az eredményekből jól látszik, hogy az enzimek a 6 ml-es puffer mennyiséget részesítik előnyben.

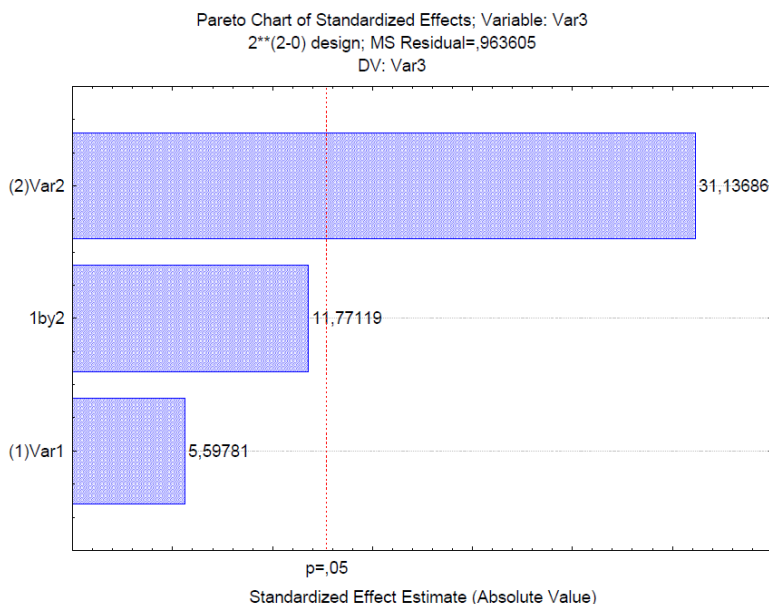
Ionos folyadékos előkezelés nélkül a Cellic HTec2 enzimmel 14,5%-os, a Cellic CTec2 enzimmel pedig 29,59%-os volt a konverzió. Ehhez képest az előkezelés hatására 3,34-szoros, illetve 2,78-szoros növekedést sikerült elérni a legjobbnak bizonyult paraméterek mellett. A Cellic HTec2 enzim esetében ez a 20 tömegszázalékos koncentrációjú cellulóz és 6 ml puffer mennyiségnél volt. A Cellic CTec2 enzim esetében szintén 6 ml-es puffer mennyiségnél volt a maximum viszont a cellulóz koncentráció, csak 15 tömegszázalék volt. Biztató, hogy a Novozymes cég évek óta forgalomba levő és számos munkában eredményesen alkalmazott Celluclast enziménél – már az első kísérletek alapján – jóval hatékonyabb a frissen a piacra kerülő két készítmény.

Pareto ábra segítségével elemeztem, hogy az egyes paramétereknek van-e hatása a glükóz felszabadulásra, és ha van, akkor ez mekkora. Ehhez két alapfeltevést kell tennünk. Az első, hogy a két paraméter változásának hatása lineáris. A második pedig az, hogyha a két pontra illesztett egyenes iránytangense nulla, akkor a paraméter változásának nincs hatás a rendszerre. Az általam használt számítógépes program T-próbát végzett a mérési pont iránytangense és a nulla közötti különbségre. Abban az esetben, ha a T-próba eredménye nagyobb, mint $P=0,05$, akkor elfogadjuk a null hipotézist és azt mondjuk, hogy a paraméter

változásának nincs hatása a rendszerre. Ha a T-próba eredménye kisebb, mint $P=0,05$ akkor elvetjük a null hipotézist és azt mondjuk, hogy a paraméter változásának van hatása a rendszerre. Az adott paraméter hatását, mely a legnagyobb és legkisebb érték közötti különbség, az oszlop mérete szimbolizálja. Ez a hatás standardizált.

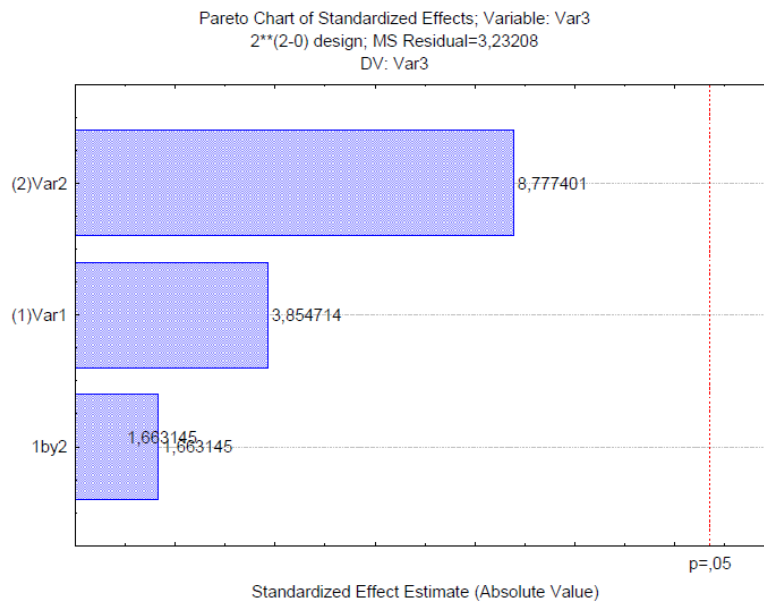
7.1.2. A Cellic HTec2 enzimmel végzett mérések eredményei:

A Cellic HTec2 enzimmel végzett első mérési sorozat Paterno ábrája alapján (17. ábra) a puffer mennyiségének változtatása szignifikáns hatással van a redukáló cukor felszabadulásra. Az ábrából az is látszik, hogy a tisztított cellulóznak ugyan pozitív hatása van a rendszerre, bár ez nem tekinthető szignifikánsnak. A mérési eredményeim nem ezt mutatják. Ennek az ellentmondásnak az oka az elvégzett mérések kis száma.



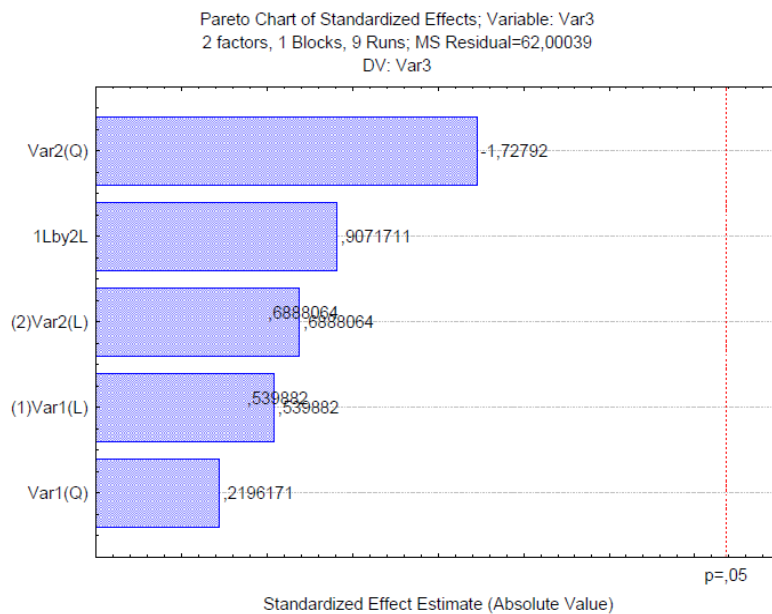
17. ábra: Cellic HTec2 enzimmel végzett első mérési sorozat Pareto ábrája. (Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló redukáló cukor, 1by2: két paraméter kölcsönhatása)

A második mérési sorozat eredményeinek elemzésekor azt kaptam, hogy tisztított cellulóz mellett a puffer mennyiségének változása is pozitívan hat a redukáló cukor felszabadulásra, de egyik sem éri el a szignifikáns szintet (18. ábra). Ez a mérések számával magyarázható.



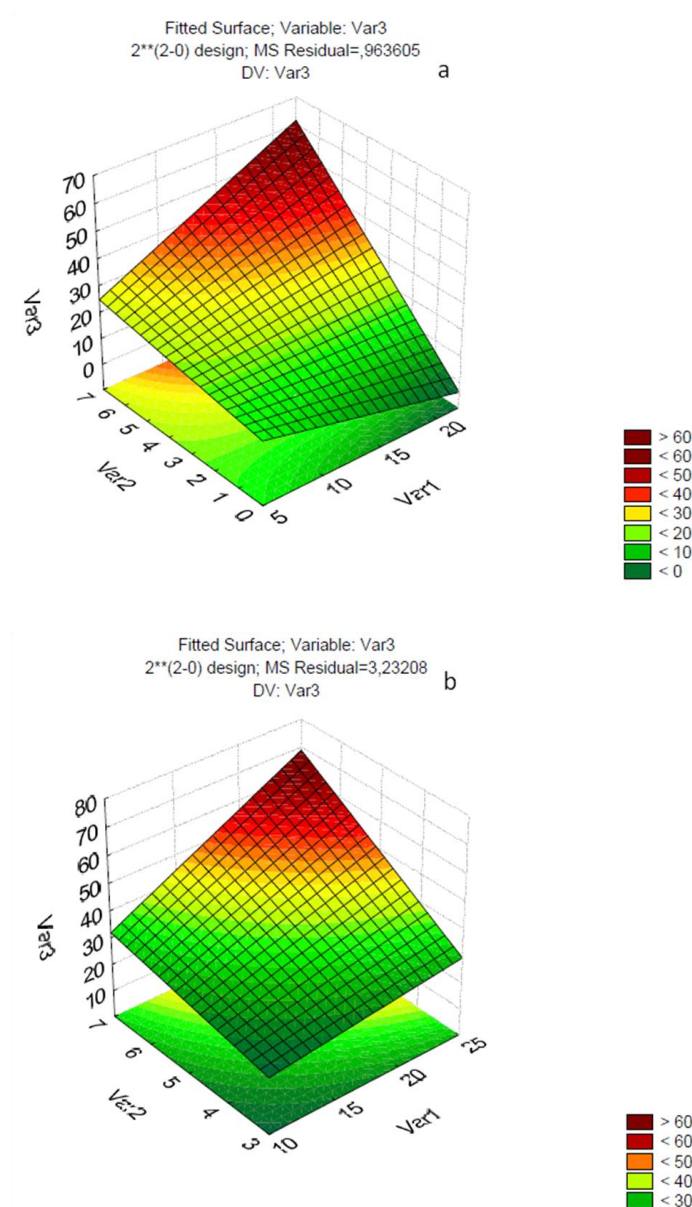
18. ábra: Cellic HTec2 enzimmal végzett második mérési sorozat Pareto ábrája. (Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló redukáló cukor, 1by2: két paraméter kölcsönhatása)

A továbbiakban elkészítettem egy összefoglaló ábrát (19. ábra), melynél az összes mérési eredményt felhasználtam. Az ábráról leolvasható, hogy a tisztított cellulóz és a puffer mennyiségének változása pozitív hatással van a felszabaduló redukáló cukor mennyiségére, de ez nem tekinthető szignifikánsnak. A puffer mennyiségének és a cellulóz koncentrációjának kereszthatása pozitív, de a méréseim száma alapján ez sem tekinthető szignifikánsnak.



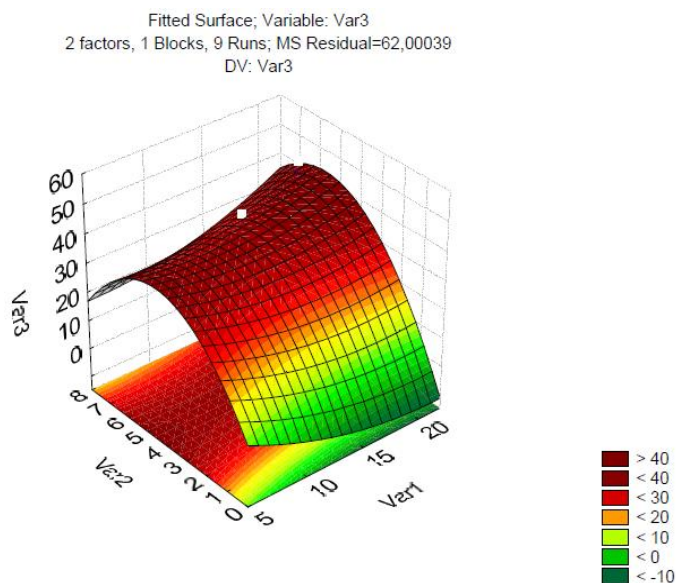
19. ábra: Az összes mérési eredmény felhasználásával készített összefoglaló Pareto ábra. (Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló redukáló cukor, 1by2L: két paraméter lineáris kölcsönhatása, Q: négyzetes hatás)

Háromdimenziós ábrán ábrázolva a mérési eredményeket, mind a két mérési sorozatnál ugyanaz a tendencia figyelhető meg. Eszerint növelve a cellulóz koncentrációját és a puffer mennyiségét, növekszik a felszabaduló redukáló cukor mennyisége (20. ábra).



20. ábra: Cellic HTec2 enzimmal végzett első (a) és második (b) mérési sorozat háromdimenziós ábrája. (Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló redukáló cukor)

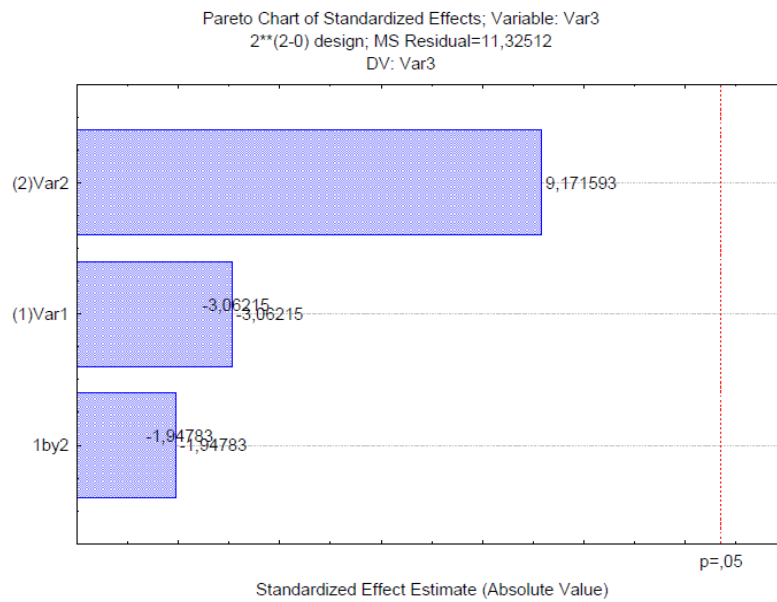
Ennél az ábránál informatívabb az összes mérési eredmény felhasználásával készült ábra (21. ábra), melyen jól megfigyelhető, hogy 7 ml puffer alkalmazásával végzett méréseknél már csökken a felszabaduló redukáló cukor mennyisége. Mivel a cellulóz koncentráció növekedésével nőtt a felszabaduló redukáló cukor mennyisége, ebből azt a következtetést lehetett levonni, hogy az enzim nagy mennyiségű cellulózt is képes lebontani, feltehetőleg nem kell szubsztrát gátlással számolni.



21. ábra: Az összes mérési eredmény felhasználásával készült összefoglaló háromdimenziós ábra. (Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló redukáló cukor)

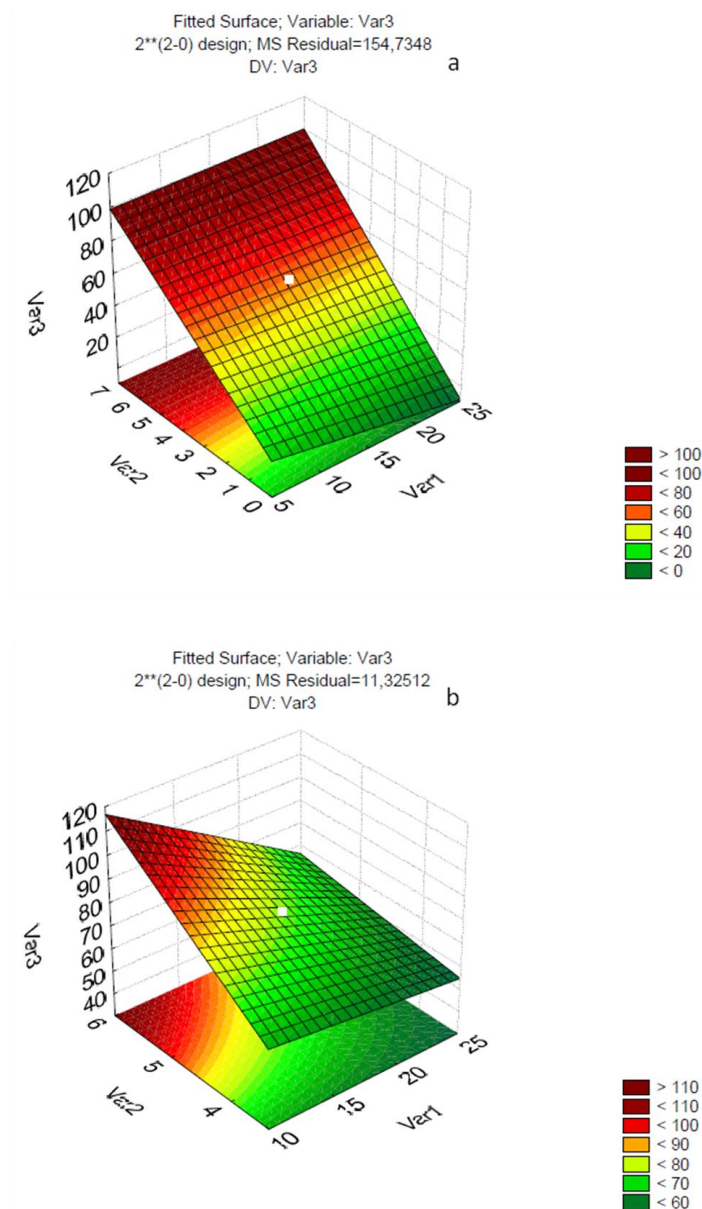
7.1.3. A Cellic CTec2 enzimmel végzett mérések eredményei:

A Cellic CTec2 enzimmel végzett első mérési sorozat Pareto elemzése alapján (22. ábra) azt a következtetést lehetett levonni, hogy a tisztított cellulóz koncentrációja mellett a puffer mennyiségének változása is pozitívan hat a redukáló cukor felszabadulásra, bár ez ebben az esetben sem szignifikáns. A második mérési sorozat és az összes adattal végzett elemzések hasonló eredményt mutattak, mint a Cellic HTec2-vel kapott ábrák, ezért ezek bemutatásától eltekintettem.



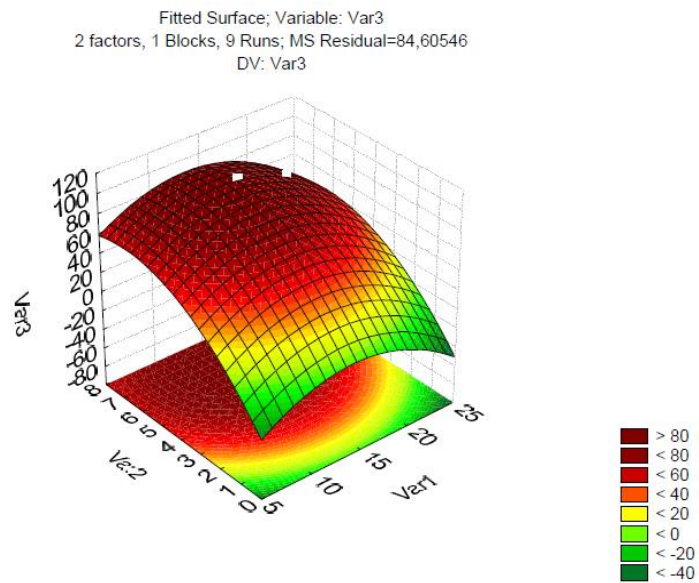
22. ábra: A Cellic CTec2 enzimmal végzett első mérési sorozat eredménye. (Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló redukáló cukor, 1by2: két paraméter kölcsönhatása)

Háromdimenziós ábrán ábrázolva a két mérési sorozat eredményeit (23. ábra) már kicsit árnyaltabb képet kaptam. Az első mérési sorozatból (23. ábra: a) úgy tűnik, hogy a cellulóz koncentrációjának a változása nem befolyásolja a felszabaduló redukáló cukor mennyiségét. A második mérési sorozatnál (23. ábra: b) a kisebb cellulóz koncentráció felé haladva nőtt a felszabaduló redukáló cukor mennyisége.



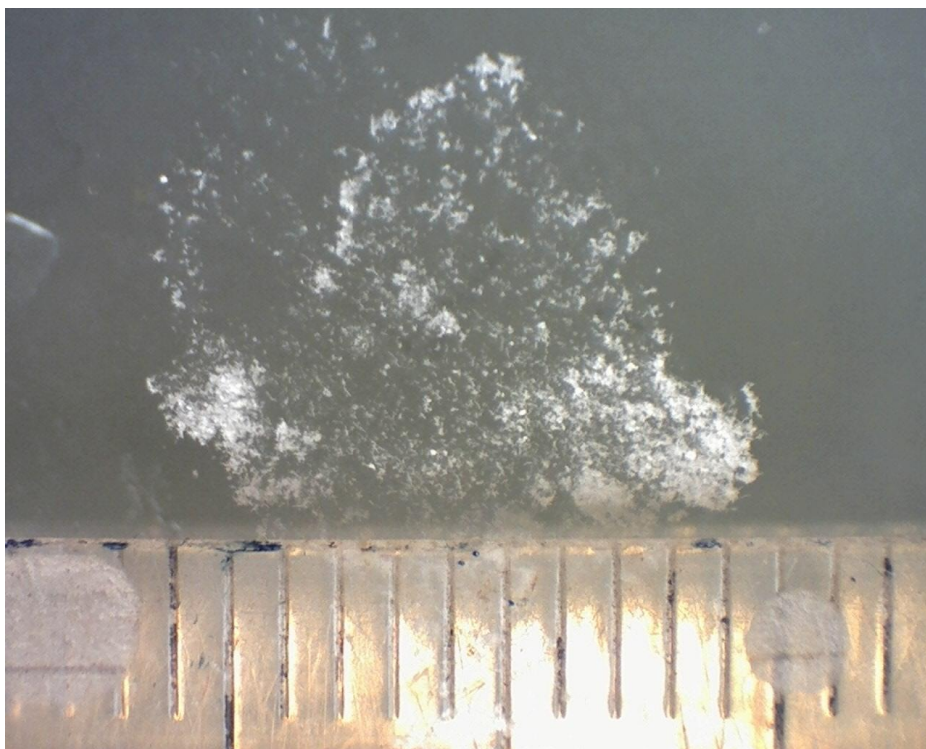
23. ábra: Cellic CTec2 enzimmal végzett első (a) és második (b) mérési sorozat háromdimenziós ábrája. (Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló redukáló cukor)

Ennél az ábránál lényegesen fontosabb információkat hordoz az összes mérési eredmény felhasználásával készült ábra (24. ábra), melyen jól megfigyelhető, hogy 7 ml-es puffer mennyiségnél csökken a felszabaduló redukáló cukor mennyisége. Mivel a cellulóz koncentráció növekedésével csökken a felszabaduló redukáló cukor mennyisége, ebből arra lehet következtetni, hogy az enzim nem boldogul jól a nagy mennyiségű anyaggal. Ez szubsztrát gátlásra enged következtetni.



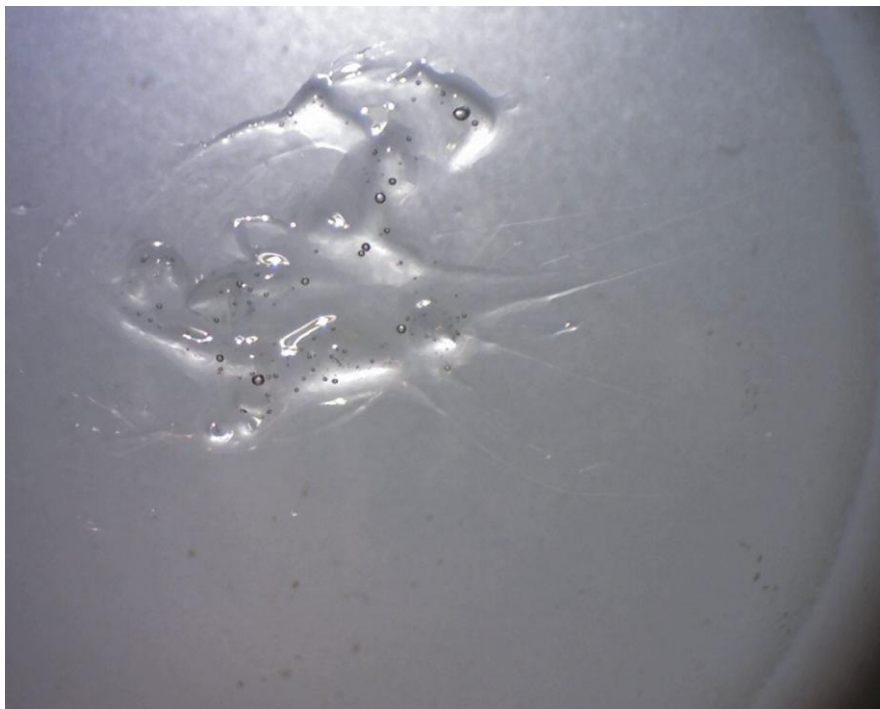
24. ábra: Az összes mérési eredmény felhasználásával készült összefoglaló háromdimenziós ábra. (Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló redukáló cukor)

A kísérletek elvégzése közben fénymikroszkóppal követtem nyomon a végbemenő morfológiai változásokat (25., 26., és 27. ábra).



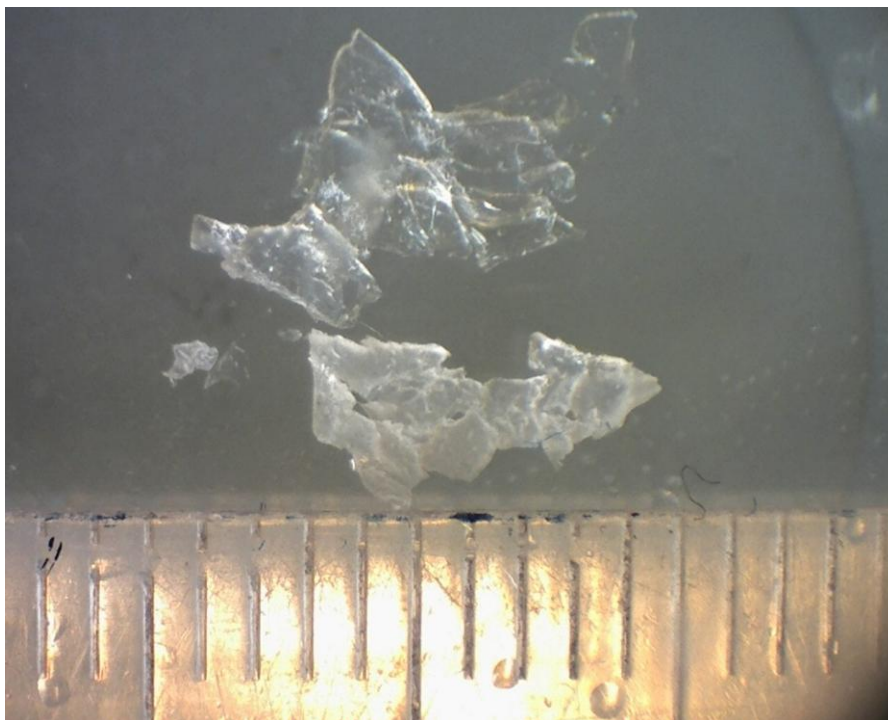
25. ábra: Cellulóz por fénymikroszkópos képe.

A képen jól láthatóak a cellulóz szemcsék. A por állaga miatt fénymikroszkóppal sajnos nem sikerült megállapítani a szemcseméretet, de jól látszódik, hogy homogén ugyan, de nem amorf.



26. ábra: A cellulóz por az ionos folyadékos előkezelés végén.

A képen jól látszik, hogy a cellulóz por teljesen elfolyósodott és teljesen amorf. Ez teljesen egybevág az irodalmi adatokkal (Bahcegul, 2012; Swatloski, 2002; Auxenfans, 2012). Ennek a változásnak köszönhetően az enzimek könnyebben hidrolizálják.



27. ábra: A cellulóz por a puffer hozzáadása után.

A képen az látszik, hogy az előkezeléshez képest a cellulóz opálósabb és rendezettebb. Ez a jelenség valószínűleg annak köszönhető, hogy a cellulóz antiszolvens jelenlétében visszanyeri kristályosodási fokát.

A fényképeken jól látható, hogy az ionos-folyadék tényleg oldja a cellulózt és ezáltal megkönnyíti annak hidrolízisét.

7.2. Kukorica:

A kísérleteket a 4. táblázat alapján végeztem el:

4. táblázat: Kukorica őrlménnyel végzett kísérletek paraméterei

	puffer mennyisége (ml)				
m/m%	1	3,5	4,75	6	7
15	*			*	
20		*		**	
22,5			**		
25	*	**		*	***

Ebben az esetben is először *-al jelölt körülmények között végeztem el a kísérleteket, majd az adatokat a Statisztika 8.0 program segítségével kiértékeltem. Ennek alapján a **-al megjelölt körülmények között folytattam a munkám, hogy az enzim működéséhez szükséges optimális körülményeket megkapjam. A tisztított cellulózos kísérletek alapján a kukorica esetében is 6 ml puffer alkalmazásánál vártam a glükóz felszabadulás maximumát. Hogy erről meggyőződjek, a ***-al jelölt körülmények között is elvégeztem a kísérletet.

7.2.1. A kukorica őrléménnyel kapott eredmények:

Egy kísérlet alkalmával meghatároztam a kukorica cellulóz tartalmát, ami 44,98%-nak adódott. Ez a 35-40%-os irodalmi adatokhoz képest magasabb érték (Internet 8). Ebből az következik, hogy az ionos folyadék nemcsak a cellulózhoz biztosít nagyobb hozzáférést az enzimeknek, hanem valamelyik más összetevő, valószínűleg a hemicellulóz hidrolízisét is segíti. Mivel engem a kukoricából kinyerhető összes glükóz érdekelt, ezért a számolásnál és a kiértékelésnél ezt a magasabb értéket vettem figyelembe.

A mintám hamu tartalma 7,7% volt, átlagos szemcsemérete pedig 0,391 mm.

Az 5. táblázatban a bemért kukorica őrléményből felszabadult glükóz mennyisége látható százalékban.

5. táblázat: Kukorica őrléményből felszabaduló glükóz mennyisége százalékban

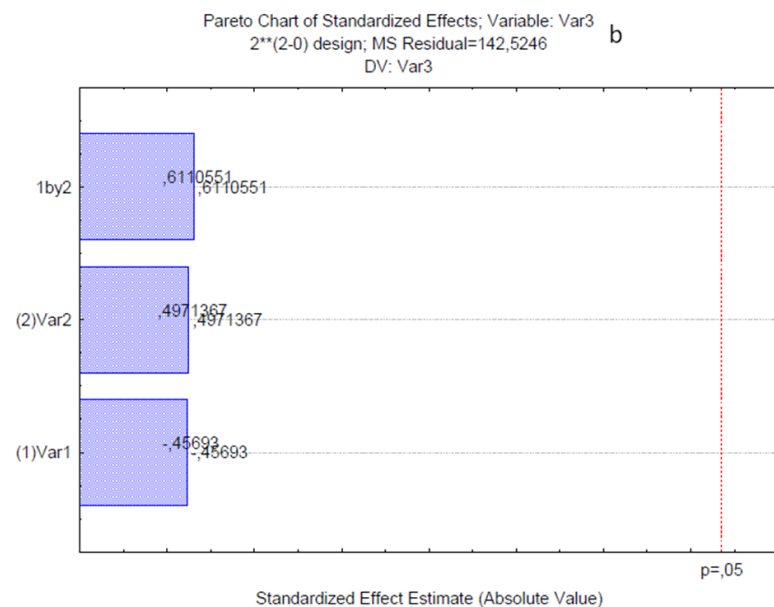
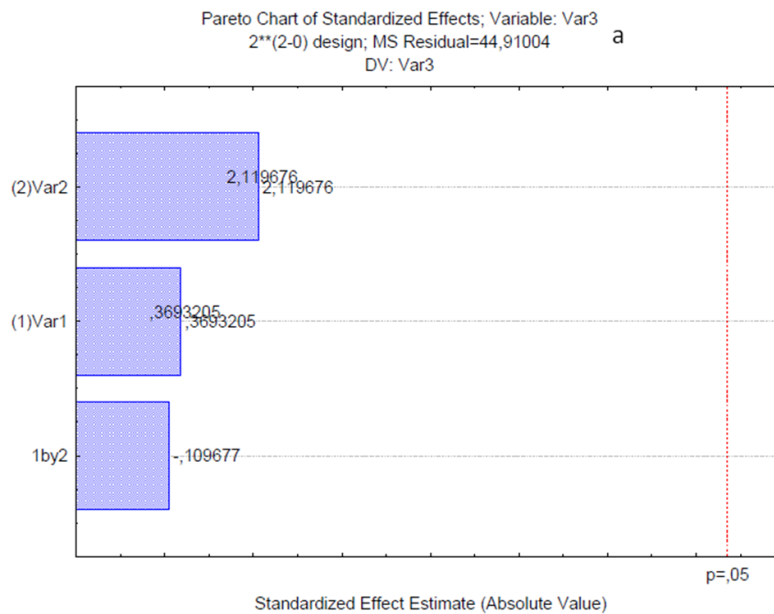
	feloldott kukorica								
	15 m/m%		20 m/m%		22,5 m/m%	25 m/m%			
	puffer								
	1 ml	6 ml	3,5 ml	6 ml	4,75 ml	1 ml	3,5 ml	6 ml	7 ml
Cellic HTec2	10,78	25,72	26,98	25,62	36,92	13,99	14,23	27,46	17,33
Cellic CTec2	15,13	37,25	22,67	28,59	33,08	10,82	28,99	38,85	27,61

Az eredményekből jól látszik, hogy a tisztított cellulózhoz képest jelentősen csökkent a glükóz felszabadulás. Ez azonban várható volt, mert a felhasznált kukorica nemcsak cellulózt és hemicellulózt, de lignint is tartalmazott. A Cellic CTec2 enzim esetében elmondható, hogy a glükóz kinyerés maximuma maradt a 6 ml-es, azaz 7,69 v/v%-os, viszont, nem várt módon, a Cellic HTec2-nél ez a maximum lejjebb tolódott a 4,75 ml, azaz a 9,52 v/v% értékhez. Bahcegul és munkatársai hasonló eredményeket kaptak a pamut szárral végzett kísérleteik során (Bahcegul, 2012). Ionos folyadékos előkezelés nélkül a Cellic HTec2 enzimmel 23,97%-os, a Cellic CTec2 enzimmel pedig 26,45%-os volt a konverzió. Ehhez képest az

előkezelés hatására 1,54-szoros, illetve 1,46-szoros növekedést sikerült elérni. Vagyis az ionos előkezelés hatékonysága, amint az várható volt, csökkent a tiszta cellulózhoz képest, de mindkét esetben másfélszeresére nőtt a kinyert cukor mennyisége a kezeletlen mintákhoz képest.

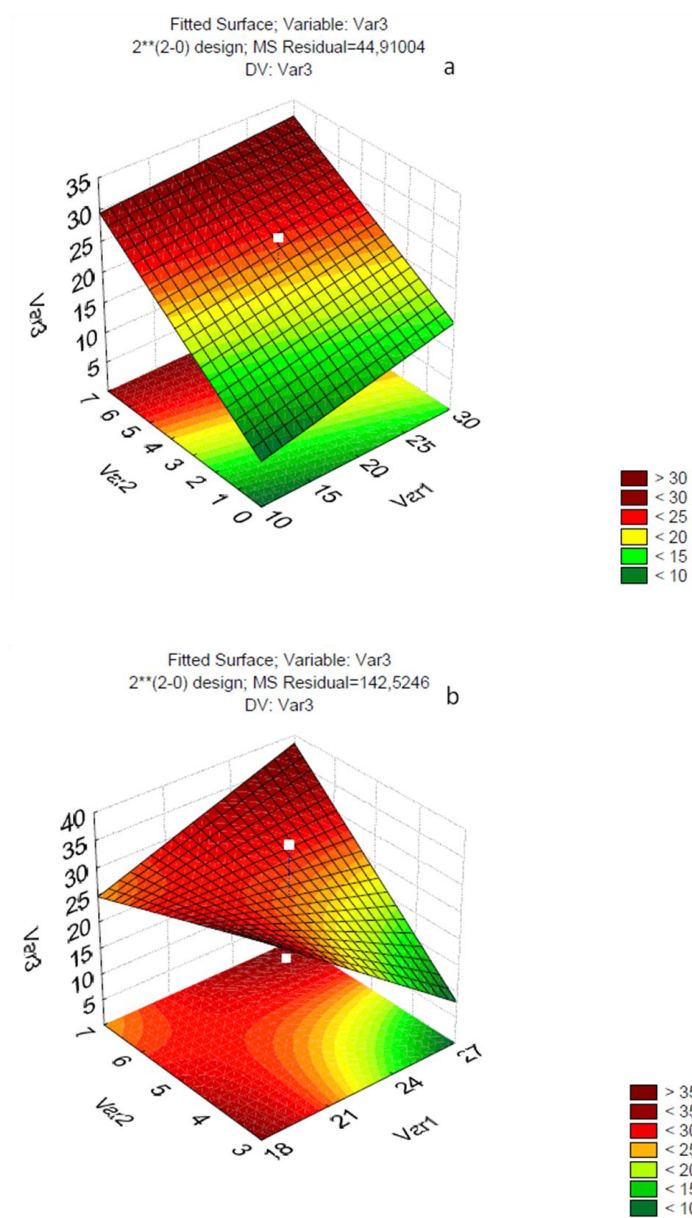
7.2.2. A Cellic HTec2 enzimmel végzett mérések eredményei:

A Cellic HTec2 enzimmel végzett két mérési sorozat Pareto elemzése hasonló eredményeket adott. Mindkét ábrából jól látszik, hogy a kukorica őrlemény és a puffer mennyiségének is pozitív hatása van a felszabaduló glükóz mennyiségére (28. ábra), de egyik esetben sem érte el a szignifikáns szintet.



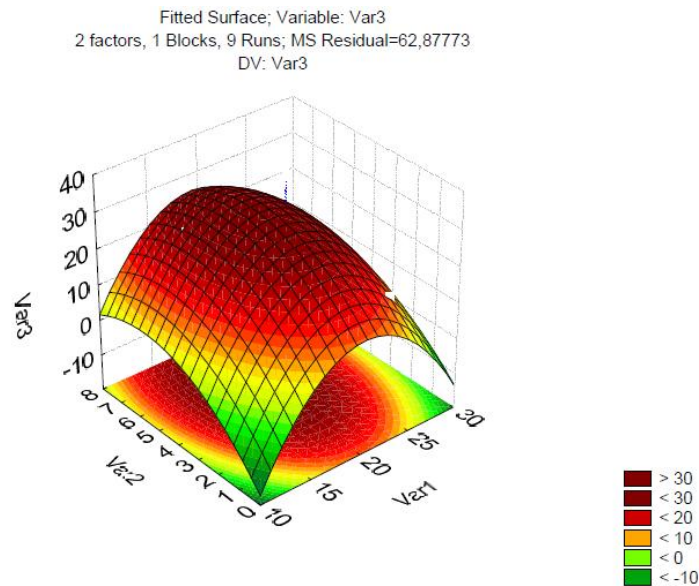
28. ábra: Cellic HTec2 enzimmal végzett első (a) és második (b) mérési sorozat Pareto ábrája.
(Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló glükóz, 1by2: két paraméter kölcsönhatása)

Az eredmények háromdimenziós ábrázolása (29. ábra) már érdekesebb képet mutat. Az első mérési sorozat ábrájából (29. ábra: a) úgy tűnik, hogy a kukorica őrlmény koncentrációjának a változása nem befolyásolja a felszabaduló glükóz mennyiségét. A második mérési sorozat (29. ábra: b) ábráján az látszik, hogy az alacsonyabb kukorica őrlmény koncentráció és kevesebb puffer mennyiség, illetve a nagyobb koncentráció és több puffer felé haladva növekszik a felszabaduló glükóz mennyisége.



29. ábra: Cellic HTec2 enzimmal végzett első (a) és második (b) mérési sorozat háromdimenziós ábrája. (Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló glükóz)

Az összes mérési eredmény felhasználásával készült háromdimenziós ábra (30. ábra) ebben az esetben is beszédesebb. Jól megfigyelhető rajta, hogy a növekvő kukorica őrlemény koncentráció hatására csökken a felszabaduló glükóz mennyisége. Ez a szubsztrát valamelyik komponensének gátló hatására, vagy inhibitorok megjelenésére enged következtetni.

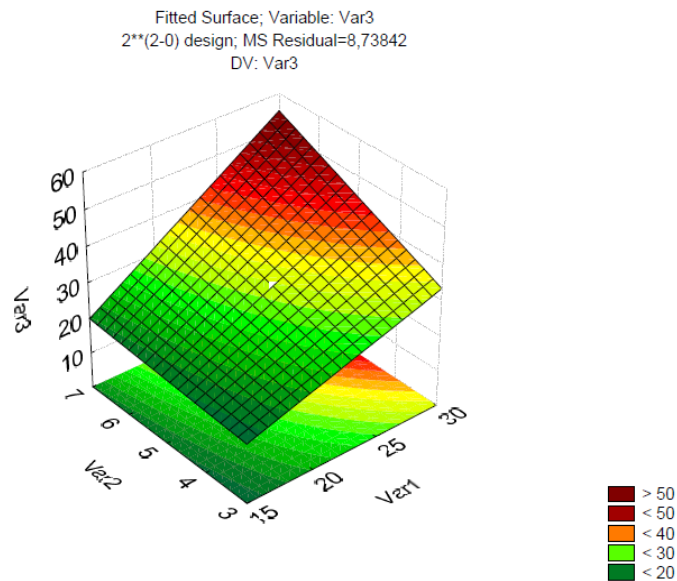


30. ábra: Az összes mérési eredmény felhasználásával készült összefoglaló háromdimenziós ábra. (Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló glükóz)

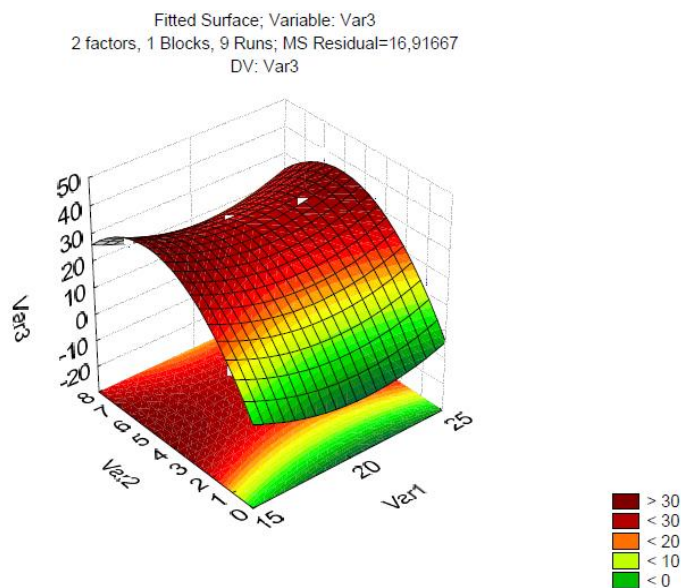
7.2.3. A Cellic CTec2 enzimmal végzett mérések eredményei:

A Cellic CTec2 enzimmal kapott eredmények Pareto elemzése hasonló eredményeket adott mint az előző esetben, ezért ezeket nem részletezem.

Az eredmények háromdimenziós ábrázolásakor az első mérési sorozat ábrája hasonló volt a Cellic HTec2-vel kapott ábrához. Eltérés a második mérési sorozat (31. ábra), illetve az összes mérési eredménnyel készített ábrában (32. ábra) volt. Az első esetben a tisztított cellulózzal kapott eredményekhez hasonló ábrát kaptam. A puffer mennyiségét és a kukorica őrlemény koncentrációját növelve növekedett a felszabaduló glükóz mennyisége. A második esetben az látszik, hogy kisebb és nagyobb kukorica őrlemény koncentrációknál is növekszik a felszabaduló glükóz mennyisége.

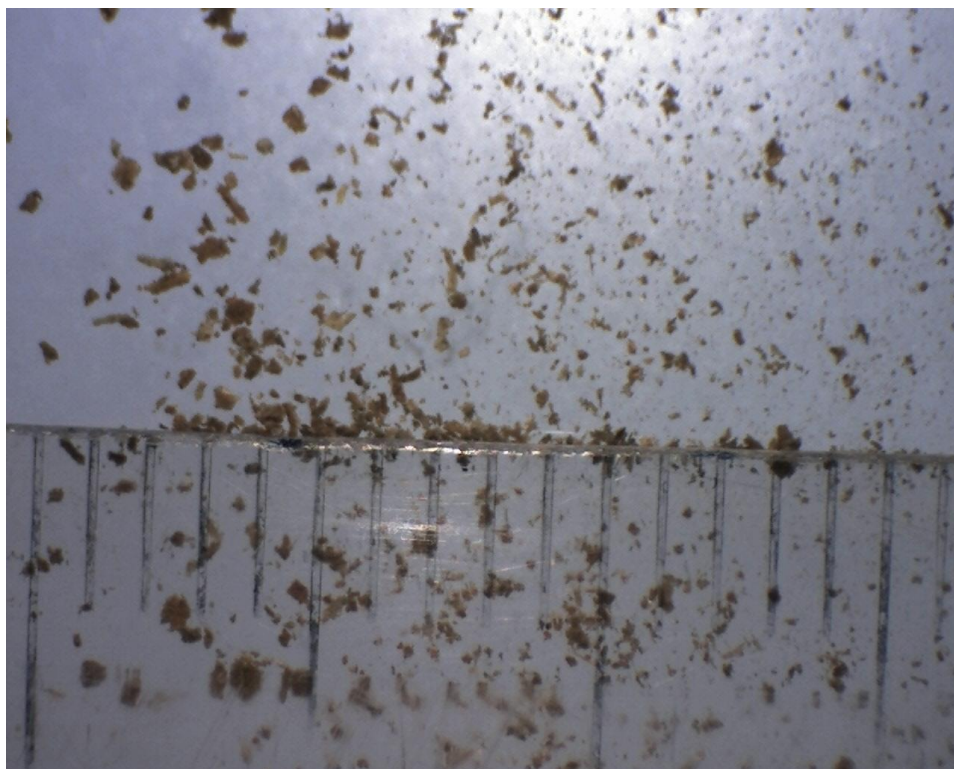


31. ábra: A Cellic CTec2 enzimmel végzett második mérési sorozat. (Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló glükóz)



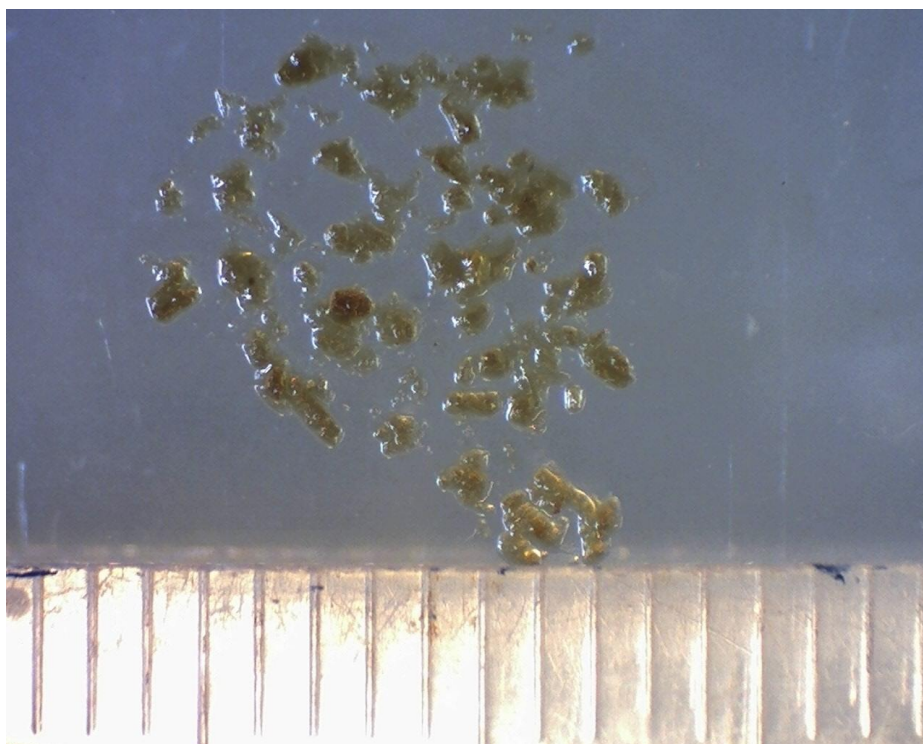
32. ábra: Az összes mérési eredmény felhasználásával készült összefoglaló háromdimenziós ábra. (Var1: tömeg%, Var2: puffer mennyiség, Var3: felszabaduló glükóz)

A kísérletek elvégzése közben a kukorica esetében is fénymikroszkóppal követtem nyomon a végbemenő morfológiai változásokat (33,34,35,36. kép).



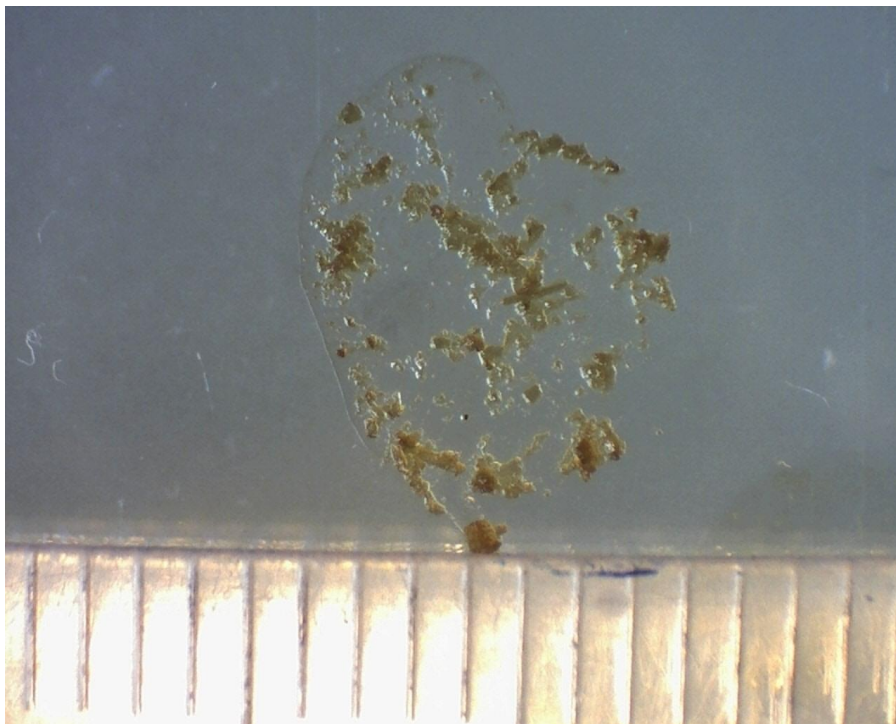
33. ábra: A kukorica szárából és leveléből készített minta az őrlés után

A képen jól látható, hogy a minta homogénnek tekinthető, de nem amorf. A szemcsék jól elkülöníthetők egymástól.



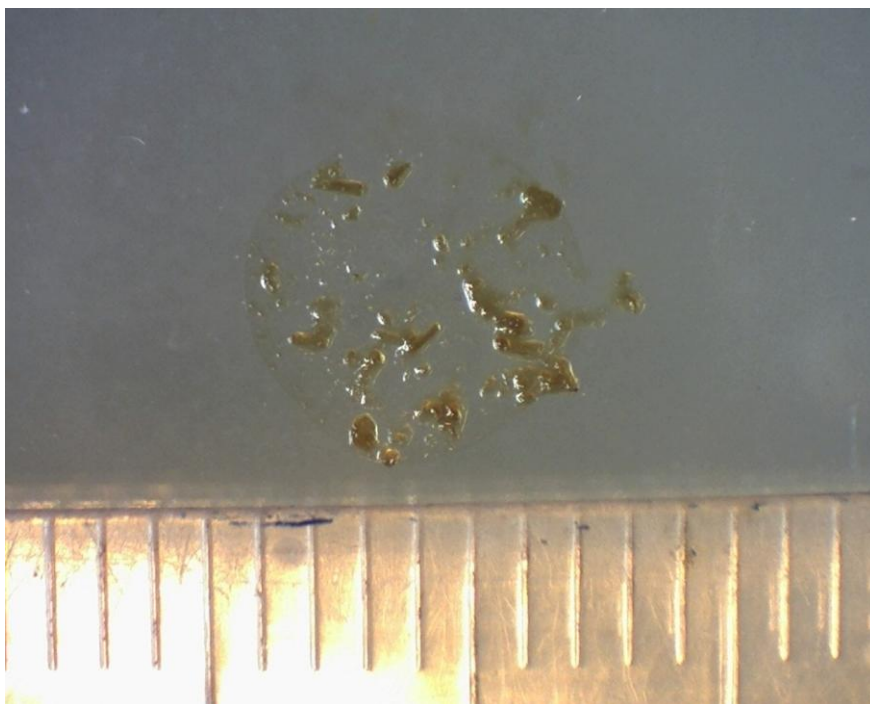
34. ábra: A kukorica az ionos folyadékos előkezelés végén.

Jól látható, hogy a mintának az ionos-folyadékos előkezelés végére amorf kocsonyás állaga lett. A szemcséket nem lehet megkülönböztetni egymástól.



35. ábra: A kukorica a Cellic CTec2 enzimes hidrolízis után.

Az enzimes hidrolízis után a minta amorf kinézete megmaradt.



36. ábra: A kukorica a Cellic HTec2 enzimes hidrolízis után.

A Cellic HTec2 enzimes hidrolízis után a minta még kocsonyásabbnak, még amorfabbnak néz ki. Megfigyelhető benne néhány fehér kristályszerű pont.

A fényképeken jól látható, hogy az ionos folyadék tényleg oldja a kukorica őrleményt. A kapott jelenség megegyezik az irodalomban leírtakkal (Auxenfans, 2012; Bahcegul, 2012; Swatloski, 2002). Ennek köszönhetően az enzimek könnyebben hidrolizálták a minta cellulóz tartalmát.

7.3. Összefoglalás:

Munkám célja a második generációs, tehát lignocellulózból történő bioüzemanyag előállítás lépéseinek intenzifikálása, az előkezelés és a hidrolízis lépések azonos reakcióközegben történő megvalósítása volt.

A vonatkozó irodalom áttekintése során kiderült, hogy az ionos folyadékok, ezek a sok esetben „zöld”, tervezhető tulajdonságú oldószerek kiválóan alkalmasak a lignocellulóz tartalmú anyagok előkezelésére: oldják a cellulózt és az antiszolvens hozzáadása után kinyert amorf cellulóz a celluláz enzimek számára könnyen lebontható volt. E két lépés, az előkezelés és az enzimes bontás összevonásával az eljárás hatékonysága lényegesen növelhető lenne.

Első lépésként kísérlettervezési módszerrel meghatároztam egy modell cellulóz előkezelési és lebontási paramétereinek optimális értékeit. A vizsgálatokba a Novozymes (Dánia) cég három enzimét, a Celluclast 1,5L-t, a Cellic HTec2-t és a Cellic CTec2-t vontam be. A kereskedelmi forgalomban kapható és eddig általánosan használt Celluclast 1,5L enzimmel mértem a legkisebb glükóz felszabadulást, míg a cég kifejlesztés stádiumában levő Cellic HTec2 és Cellic CTec2 enzimek magas hozamot produkáltak. A Cellic HTec2 enzimmel 50 °C-on, 6 ml puffer és 20 m/m% koncentráció mellett 48,56%, míg a Cellic CTec2 enzim alkalmazásakor 15 m/m% cellulóz koncentráció mellett 99,2 % glükóz felszabadulást mértem.

Kísérleteimet a környezetemből begyűjtött éles anyaggal, kukorica levélének és szárának őrleményével folytattam. A vizsgálatok során 50 °C-on a Cellic HTec2 enzim 4,75 ml puffer és 22,5 tömegszázalékos koncentrációjú minta mellett 36,9%-os, míg a Cellic CTec2 enzim alkalmazásakor 6 ml puffer és 25 tömegszázalék minta mellett 38,85 %-os glükóz felszabadulást értem el a cellulóz mellett hemicellulózt és lignint tartalmazó minták előkezelése és hidrolízise után.

Érdekes és nem várt jelenséget tapasztaltam az enzimekkel kapcsolatban. Az irodalmi adatok alapján várt 4,5 ml-es optimális puffer mennyiség a kukorica őrleményen végzett Cellic HTec2 enzimes hidrolízis kivételével minden más esetben növekedett.

A Cellic HTec2 enzim esetében tisztított cellulózból 20 m/m%-nál adódott a maximum, míg a kukorica őrlemény esetében ez kis mértékben emelkedett és 22,5 m/m%-nál volt. Ehhez a 2,5 %-os növekedéshez képest a Cellic CTec2 enzim esetében 10 %-os növekedés figyelhető meg.

További fontos megfigyelés, hogy az adatok alapján a tisztított cellulózos kísérleteknél a Cellic CTec2 enzimmél a töményebb mintáknál csökkent a felszabaduló glükóz mennyisége.

Ez szubsztrát gátlásra enged következtetni. A kukorica őrléménnyel végzett kísérletek során ez a jelenség a Cellic HTec2 esetében volt megfigyelhető. Említésre méltó a két enzim hatékonysága a különböző szubsztrátok esetében. A tisztított cellulózos kísérletek alkalmával a Cellic CTec2 enzimnél körülbelül kétszer akkora volt a glükóz felszabadulás mértéke, mint a Cellic HTec2 esetében. A kukorica őrléménnyel végzett kísérletek során ez a nagy különbség eltűnt, ami azzal magyarázható, hogy a kukorica nemcsak cellulózt tartalmazott, és a Cellic HTec2 enzim hemicellulóz lebontását is végezhetette, ami eltérő szubsztrát specifikusságra utal.

A fénymikroszkóppal készült felvételeken jól nyomon követhető volt a feldolgozott anyag morfológiájában bekövetkező változás.

A munkám során sikerült igazolnom azt az állítást, hogy az ionos folyadékos előkezelés növeli a glükóz felszabadulást, ezáltal alkalmazható a második generációs bioüzemanyag előállításánál során. Ezen kívül sikerült bizonyítanom, hogy az előkezelés után nem szükséges tisztítani a mintát, hanem az ionos-folyadékos reakcióterben az irodalmi adatokhoz hasonló (Bahcegul, 2012) eredménnyel végbemegy a hidrolízis. A kukorica esetében az előkezelés nélküli glükóz felszabaduláshoz képest a másfélszeres növekedés számottevően nagy lépés, de a módszer optimalizálásához további kísérletek elvégzése szükséges.

Felhasznált irodalom:

Aimaretti N.R., Ybalo C.V., Rojas M.L., Pluo F.j., Yori J.C. (2012) Production of bioethanol from carrot discards, *Bioresource Technology* **123**: 727-732

Auxenfans T., Buchoux S., Djellab K., Avondo C., Husson E., Sarazin C. (2012) Mild pretreatment and enzymatic saccharification of cellulose with recycled ionic liquids towards one-batch process, *Carbohydrate Polymers* **90**: 805-813

Bahcegul E., Apaydin S., Haykir N. I., Tatli E., Bakir U. (2012) Different ionic liquids favor different lignocellulosic biomass particle sizes during pretreatment to function efficiently, *Green Chemistry* **14**: 1896-1903

Chandra R., Bura R., Mabee W., Berlin A., Pan X., Saddler J., (2007) Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **108**: 67-93

Chukwuemeka E. T., Qureshi N., Blaschek H. P. (2007) Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors, *Current Opinion in Biotechnology* **18**: 220-227

Ecsobar J.C., Lora E.S., Venturini O.J., Yáñez E.E., Castillo E.F., Almaza O. (2009) Biofuels: Environment, technology and food security, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **13**: 1275-1287

Fehér E. (2008) Oldószerternökség alkalmazása izoamil-acetát enzimátikus előállítására (Doktori Értekezés, Pannon Egyetem)

Graham-Rowe D. (2011) Agriculture: Beyond food versus fuel, *Nature* **474**(7352): S6-S8

Hayes D.J. (2009) An examination of biorefining processes, catalysts and challenges, *Catalysis Today* **145**(1-2): 138-151

Huisman M.M.H., Schol H.A., Voragen A.G.J. (2000) Glucuronoarabinoxylans from maize kernel cell walls are more complex than those from sorghum kernel cell walls, *Carbohydrate Polymers* **43**: 269-279

Kumar R., Singh S., Singh Om V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **35**: 377-391

Lozano P., Bernal B., Bernal J.M., Pucheault M., Vaultier M. (2011) Stabilizing immobilized cellulase by ionic liquids for saccharification of cellulose solutions in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride, *Green Chemistry* **13**: 1406-1410

Łuczak J., Hupka J., Thöming J., Jungnickel (2008) Self-organization of imidazolium ionic liquids in aqueous solution, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **329**: 125-133

Martin C., Jönson L.J. (2003) Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors, *Enzyme Microbial Technology* **32**: 385-395

Martínez Á. T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M. J., Gutiérrez A., del Río José C. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin, *International Microbiology* **8**: 195-204

Orozco A., Ahmad M., Rooney D., Walker G., (2007) Dilute acid hydrolysis of cellulose and cellulosic bio-waste using a microwave reactor system, *Process Safety and Environmental Protection* **85(5)**: 446-449

Sánchez O., Cardona C. (2008) Trend sin biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresource Technology* **99(13)**: 5270-5295

Sang Y. L., Hwan P. J., Jang S. H., Lars K. N., Jaehyun K., Kwang S. J. (2008) Fermentative Butanol Production by Clostridia, *Biotechnology and Bioengineering* **101**: 209-228

Sillers R., Chow A., Tracy B., Papoutsakis E. T. (2008) Metabolic engineering of the non-sporulating, non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strain M5 to produce butanol without acetone demonstrate the robustness of the acid-formation pathways and the importance of the electron balance, *Metabolic Engineering* **10**: 321-332

Swatloski R. P., Spear S. K., Holbrey J. D., and Rogers R. D. (2002) Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids, *JACS Communications* **124**: 4974-4975

Szentgyörgyi Cs., Bélafiné B. K., Nemestóthy N., Bakonyi P., Gubicza L. (2011) Ionos folyadék alkalmazása cellulóz előkezelésére, *Műszaki Kémiai Napok '11, Proceedings, Veszprém*, 241-246

Menon V., Rao M. (2012) Trend sin bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, *Progress in Energy and Combustion Science* **38**: 522-550

Van Eylen D., Van Dongen F., Kabel M., de Bont J., Corn fiber, cobs and stover: Enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment, *Bioresource Technology* **102**: 5995-6004

Zhu S., Wu Y., Chen Q., Yu Z., Wang C., Jin S., (2006) Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: A mini-review, *Green Chemistry* **8(4)**: 325-327

Wang Y., Radosevich M., Hayes D., Labbé N. (2010) Compatible ionic liquid-cellulase system for hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Biotechnology and Bioengineering* **108**: 1042-1048

Internet 1: <http://www.homoludens.hu/node/30074> (2012.10.20)

Internet 2: <http://hu.wikipedia.org/wiki/Etanol> (2012.10.31)

Internet3:http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0032_kornyezettechnologia/ch11_s06.html (2012.10.31)

Internet 4: <http://en.wikipedia.org/wiki/Butanol> (2012.10.15)

Internet 5: <http://www.dow.com/productsafety/finder/nbut.htm> (2012.10.15)

Internet 6: <http://hu.wikipedia.org/wiki/Prop%C3%A9n> (2012.10.31)

Internet 7: http://en.wikipedia.org/wiki/File:1-butyl-3-methylimidazolium_chloride.svg

Internet8:http://www.mokkka.hu/db1/rec_list.php?db_type=mysql&lang=hun&sheet_type=36&datasheet_id=877&sorszam=877&order=sorszam&sheet_type_filter=36&sheet_lang_filter=HU&alluser_filter (2012.10.29)

Köszönetnyilvánítás:

Köszönetemet szeretném kifejezni Bélafiné Dr. Bakó Katalin intézetigazgató egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget biztosított számomra a kísérletek elvégzésére, Dr. Nemestóthy Nándor tudományos munkatársnak a témavezetésért és a tanácsokért, Márkus Béláné vegyésztechnikusnak a munka közbeni segítségért. Köszönöm a NOVOZYMES cégnek, hogy rendelkezésemre bocsátották a termékeiket.