



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék

Szilárd fázisú fermentációval előállított enzimek extrakciójának vizsgálata ultrahangos rendszerben

Készítette: **Kiss Kata** hallgató, biomérnök BSc IV.évf.

Témavezető: **Dr. Csiszár Emília** egyetemi docens

Konzulens: **Olosz-Szabó Orsolya** PhD hallgató

Dr. Szakács György tudományos munkatárs

Tóth Karolina kutató

2013

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi bevezető	5
2.1. Szilárd fázisú fermentáció	5
2.2. Extrakció	6
2.3. Az ultrahang	7
2.4. A vizsgált törzs és a len szubsztrátum	9
2.4.1. <i>Aspergillus oryzae</i>	9
2.4.2. A len	11
2.5. A kutatómunka célja	16
3. Kísérleti rész	17
3.1. Előzmények	17
3.2. Anyagok és módszerek	17
3.2.1. Felhasznált vegyszerek, anyagok	17
3.2.2. Ultrahang kezelések	18
3.2.3. Felülúszóval végzett kísérletek	19
3.2.4. Szilárd SSF-vel végzett extrakciós kísérletek	19
3.2.5. Enzimaktivitás mérések	19
3.2.6. Biofehérítés és színmérés	21
3.3. Eredmények, értékelés	22
3.3.1. Előzmények	22
3.3.2. Ultrahang kezelés hatása a nyers enzimidatok aktivitás értékeire	23
3.3.3. Ultrahang hatása a nyers enzimek extrakciójára	27
3.3.4. Biofehérítés	31
4. Összefoglalás	35
5. Irodalomjegyzék	36

1. Bevezetés

A szilárd fázisú fermentáció (SSF) ígéretes alternatívája az ipari enzimtermelésre széles körben elterjedt szubmerz fermentációs eljárásnak. Az SSF módszerrel szubsztrát specifikus enzimkeverékeket állíthatunk elő, amelyek például a cellulóz alapú szálasanyagok biofehérítés során eredményesen alkalmazhatók. Az SSF módszer gazdaságosabb, ha a nyers fermentált termékeket közvetlenül - downstream feldolgozási műveletek nélkül - használjuk enzimforrásként. Számos alkalmazás előtt viszont szükséges a szilárd szubsztrátumból az enzimek kinyerése extrakcióval. Az extrakció módja és eredményessége jelentősen befolyásolja a szilárd fázisú fermentáció gazdaságosságát, hiszen hatással van a folyamat költségeire és a kinyerhető enzimek hozamára is.

Az élelmiszeriparban számos esetben használtak már ultrahangot a bioaktív komponensek, értékes hatóanyagok és más alkotók extrakciójának a segítésére. Kisfrekvenciás ultrahang alkalmazásakor - a folyadékfázisban kialakuló kavitáció révén - jelentősen javítható a heterogén fázisú folyamat hatékonysága, mivel a kavitáció segíti az oldószer bejutását a sejtbe és növeli az értékes komponensek tömegtranszportját a sejtől a folyadék fázisba. Kisfrekvenciás ultrahang alkalmazásakor a kavitáció a kinyert komponensek bioaktivitását is befolyásolhatja. Egyes esetekben például az enzimek aktivitásának a növekedését, más esetekben viszont az enzimek inaktíválódását tapasztalták. Az ultrahangot SSF minták esetén, a nyers enzimkeverékek kinyerésére, eddig még nem alkalmazták.

A len színes komponenseinek az elszíntelenítése peroxidáz és lakkáz enzimekkel katalizálható. A biofehérítésnek nevezett folyamatban az enzimek a szálasanyagban lévő természetes színezékek és lignin-tartalmú vegyületek aromás csoportjainak a degradációját katalizálják. Mivel az oxidatív enzimek nagyon drágák, célszerű fermentációval előállítani azokat. A fermentáció során a termelt enzimek aktivitása befolyásolható a szénforrásként alkalmazott szilárd szubsztrátum kémiai összetétele révén.

Munkám célja: szilárdfázisú fermentációval len szénforráson előállított fermentumokból a nyers enzimkeverékek extrakciójának a vizsgálata és az extrakció fokozása kisfrekvenciás ultrahang alkalmazásával; az ultrahang enzimaktivitásra gyakorolt hatásának a jellemzése; az extrahált enzimdáták és közvetlenül a szilárd fermentumok alkalmazása nyers lencsövet biofehérítésére.

Ligninolitikus és hidrolitikus enzimeket termeltettünk lenrost szubsztráton hat fonalas gomba törzzsel SSF módszerrel. Tudományos diákköri munkámban feladatom volt az egyik legjobb enzimtermelő törzset (*Aspergillus oryzae* NRRL 3485) vizsgálni. Az SSF mintákból

hagyományos módon (rázófürdőn) nyert nyers enzimdátokban lignin-peroxidáz, lakkáz, poligalakturonáz és szűrőpapír lebontó aktivitásokat mértem. Ezt követően a nyers enzimdátokat kisfrekvenciás ultrahanggal (40 kHz) különböző amplitúdók mellett és különböző ideig kezeltem és vizsgáltam az ultrahangos kezelés enzimaktivitásra gyakorolt hatását. Az extrakciós kísérleteknél az SSF mintákból nyerhető enzimdátok aktivitásértékeit mértem különböző paraméterek mellett alkalmazott ultrahangos besugárzást követően. Az eredményeket összevetettem a hagyományos rázófürdőben végzett extrahálás eredményeivel. A biofehérítéshez az SSF mintákat ultrahanggal előextraháltam. A nyers lenszövet fehérítését egyrészt a szűrt enzimdattal, másrészt a szilárd SSF mintát is tartalmazó szuszpenzióval végeztem. A folyamat eredményességét színméréssel jellemeztem.

2. Irodalmi bevezető

2.1. Szilárd fázisú fermentáció

A szilárd fázisú fermentáció (SSF) alatt mikrobák tenyésztését értjük vízzel oldhatatlan vagy vízben korlátozottan oldódó anyagokon (szubsztrátumokon). Ezek a szubsztrátumok folyó vizet nem, csak kötött vizet tartalmaznak. A szilárd mátrix nedvességtartalma nem haladhatja meg a mátrix maximális vízmegkötő képességét, mely általában a 40-80%-os nedvességtartományba esik. Az SSF folyamán a mikrobanövekedés és metabolizmus rendszerint a vizes fázisban játszódik le. Ha túl alacsony a szubsztrát víztartalma, akkor tápanyag- és oxigén-ellátási zavarok keletkezhetnek. A víznek kettős szerepe van, oldószerfunkciót és strukturális szerepet is betölt. Bizonyos mennyiségben jelenléte szükséges a biológiai egységek stabilitásához és működéséhez. A mátrix részecskéik közötti térben gáz (levegő) van és ezen, illetve a magunkon a részecskéken zajlik a mikroorganizmusok növekedése és anyagcseréje. Ezen tulajdonságainál fogva a szilárd fázisú fermentáció egy komplex heterogén háromfázisú (gáz-folyadék-szilárd) rendszernek tekinthető. A rendszer fontos része a gázcsere, kiváltképpen aerob mikroorganizmusok esetén (*Pandey, A. et al., 1999*).

A természetben elhalt fákon, növényi leveleken, szárazon, gyökereken és magvakon is találkozhatunk ezzel a folyamattal, hiszen számos mikroorganizmus, különösképpen a fonalgombák jelentős része nedves szilárd anyag felszínén él. A szilárd fázisú fermentációs a természetben spontán folyamat, melyet az emberek megfigyeltek, majd megpróbálták tudatosan alkalmazni. A SSF-t évezredek óta alkalmazzák elsősorban a Távol-Keleten különböző élelmiszerek előállítására (pl. szójaszós, rizsbor/sake, tempeh), de Európában (penésszel érlelt sajtok: roquefort, camambert) használják. Továbbá szilárd fázisú fermentációs eljárás a komposztálás is, amely szerves hulladékok mikrobiológiai lebontását jelenti nedves, meleg, aerob környezetben. A komposztálás egy olyan vegyes flórájú fermentáció, mely nem steril, ezért leszámítva a szilárd fázisú fermentáció ezen formáját, a nyugati világban kizárólag a süllyesztett (szubmerz) fermentáció terjedt el (*Tengerdy, R. P. és mtsai., 1996*).

Szubmerz módszerrel állítják elő a különböző enzimeket, antibiotikumokat és aminosavakat. Ipari léptékben végrehajtott steril szilárd fázisú fermentációval napjainkban elsősorban Japánban találkozhatunk, de jelentős még továbbá Kína és India élelmiszeripara is. Kisebb mértékben az Egyesült Államokban és Franciaországban alkalmazzák, ipari enzimek,

szerves savak, ill. különböző anyagcseretermékek (antibiotikumok, mikotoxinok, biokontroll szerek) előállítására.

A jövőben nagyobb szerepet kaphat az SSF olyan nagy értékű, kisebb termelési volument képző termékek előállításában, mint pl. a másodlagos anyagcseretermékek, enzimek, finomvegyszerek, valamint várhatóan nagyobb szerepet fog betölteni a lignocellulózok lebontásában is.

Az SSF számos előnnyel rendelkezik a klasszikus SF-fel szemben, és ezen fontos előnyök miatt válik egyre fontosabbá ipari alkalmazásokban. Térfogategységre vetített termelékenység viszonylag nagy, emellett végtermék koncentrációja a tápközegben relatíve magas. Alacsonyabb beruházási és működtetési költségei vannak, hiszen egyszerű és olcsó alapanyagokat igényel, továbbá relatíve alacsony a feldolgozási (downstream) műveletek legtöbbször olcsóak és alacsonyabb költséggel járnak. Kevesebb folyékonyhulladékot termel, így gyakorlatilag nem képződik szennyvíz, valamint a közeg alacsony vízaktivitása miatt a bakteriális fertőzés kockázata kisebb. További óriási előnye lehet az SF-fel szemben, hogy a nyers fermentált termék sok esetben mindenféle feldolgozás nélkül alkalmazható (Pandey, A. *et al.*, 1999).

Alkalmazhatóságát korlátozhatja, hogy csak olyan mikroorganizmust (pl. fonalgombákat) lehet szaporítani, amelyek kedvelik az alacsony vízaktivitású közeget, illetve hogy a fermentációs paraméterek (pH, nedvességtartalom, hőmérséklet, oldott oxigén stb.) mérése nehézkes. Mivel az SSF rendszer nem homogén, kevertetés hiányában a paraméterek a tenyészetben belül eltérőek, általában hosszabb a tenyésztési idő.

2.2. Extrakció

Az SSF potenciális lehetőséget kínál az enzimek nagy koncentrációban való kinyerésére. Az extracelluláris enzimek nem egyenletesen oszlanak el a szilárd közegben. A koncentrált enzimkivonatok hatékony extrahálását különböző oldószerek és pH-értékek alkalmazása mellett, számos idő és hőmérsékleti adat, illetve rázatási időtartamok függvényében részletesen vizsgálták. Az extrakció kulcsfontosságú a szilárd fázisú fermentációban. Megfelelő töménységű enzimoldat kinyerése a cél. Ehhez különböző módszereket alkalmaznak.

Ikasari és Mitchell (1996) az *Rhizopus oligosporus* savas proteáz enzimtermelését vizsgálta SSF-fel rizs-korpa szénforráson. Az extrakció során a vizsgált tényezők közé tartozik az oldószer pH-ja és típusa, a kontaktidő, illetve az oldószer és a szilárd anyag aránya. Kutatásaik az enzimek stabilitásának vizsgálatára, illetve azok aktivitására is kiterjedt.

Szintén korpán, mint szubsztráton vizsgálták Chandra és munkatársai (2008) az *Aspergillus niger* SSF szubsztrátból történő enzinkinyerés hatékonyságát az inkubációs- és áztatási idő változtatásával. Céljaik közé tartozott egy olyan optimális idő megállapítása, melynek során a teljes penetráció végbe tud menni, illetve az érintkezési idő nem okozza az enzim inaktiválódását. Több egymást követő extrahálás hatékonyságát a *Ceriporiopsis subvermispora* esetén vizsgálták (de Souza-Cruz és mtsai., 2004), mely egy olyan fehérrothasztó gomba, ami a lignint szelektíven bontja. A többszörös pufferes extrakciók elvégzése után azt találták, hogy az első extrakció után átlagosan a teljes enzimaktivitás 50%-át tudják kinyerni.

A kislekvenciás ultrahangot az élelmiszeriparban széleskörűen alkalmazzák az extrakciós műveleteknél (Mason, 1996). A megfelelő oldószer kiválasztását követően ultrahanggal jelentősen fokozható az extrakció hatékonysága, mivel a folyadékfázisban kialakuló kavitáció révén nő a heterogén fázisú folyamat eredményessége. A kavitáció intenzív mechanikai hatást hoz létre a szilárd-folyadék határfelületen, amely degradálja a sejtfalat és ezáltal elősegíti az oldószer bejutását a sejtbe. A kavitáció révén kialakuló mikroáramlások pedig növelik az értékes komponensek tömegtranszportját a sejtől a folyadék fázisba. A gyógynövény hatóanyagok kinyerése, a fehérjék extrakciója szójaból, az instant tea fogyasztó számára értékes komponenseinek a kinyerése mind-mind jó példák arra, hogy ultrahanggal az extrakció fokozható, az extrakciós idő pedig jelentősen csökkenthető.

Szilárdfázisú fermentációval előállított enzimek extrakciójának a hatékonyabbá tételére viszont eddig még nem alkalmazták az ultrahangot. Egyetlen olyan cikket találtunk, ahol a szilárdfázisú fermentációval előállított enzimek hozamának a növelésére alkalmazták az ultrahangot, de a fermentációs folyamatban és nem az extrakció során. Sakthiselvan és munkatársai (Sakthiselvan, 2012) magasabb xilanáz aktivitást értek el úgy, hogy a fermentáció 8 napja során az SSF fermentumokat 12 óránként 30 percig kezelték ultrahanggal.

2.3. Az ultrahang

Az ultrahang a 20 kHz-től 10000 kHz-ig terjedő hangfrekvenciás tartományt foglalja magában. Az ultrahanggal történő besugárzás hatására következik be az ún. szonokémiai aktiválás (Mason, T. J., 2003).

A folyadékon áthaladó hanghullámok hatásáról először Alfred Lee Loomis és Robert Williams Wood számolt be 1927-ben. Azonban a korai eredmények ellenére ez a tudományterület mégis sokáig, egészen 1980-ig feltáratlan maradt. Innentől tekintjük az

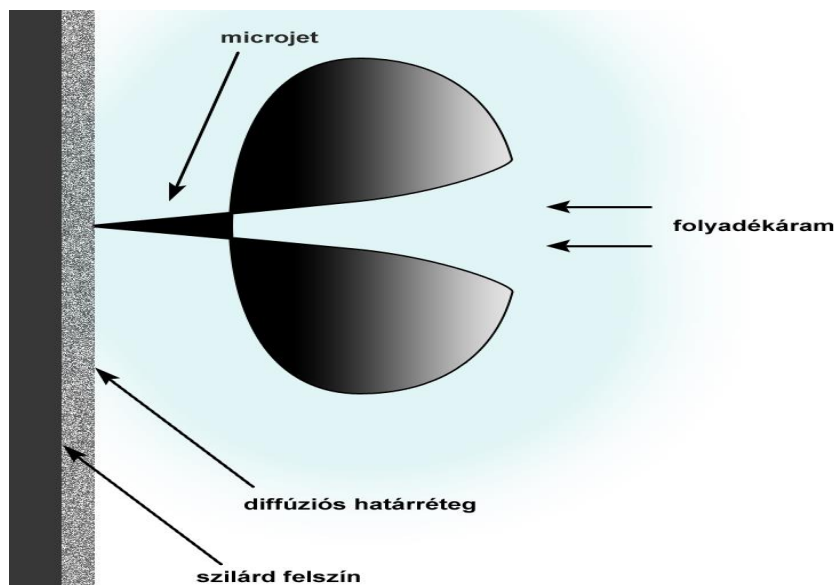
ultrahang hatására lejátszódó kémiai átalakulásokat leíró szonokémiát önálló diszciplínának (Mason, T. J., 1999).

A szonokémiai reakciók alapvetően két altípusra oszthatók, így a reagáló rendszerek minősége alapján megkülönböztetünk homogén, illetve heterogén szonokémiát (Suslick, K. S., 1988). Ha egy folyadékot akusztikus mezőbe helyezünk, a hangrezgések akusztikus nyomást indukálnak, mely hozzáadódik a közeg hidrosztatikai nyomásához. A hanghullámok terjedésével azok intenzitása csökken. Az ultrahang különböző közegekben történő terjedése során gerjeszti a molekulák longitudinális rezgéseit, így a folyadékban lokális tömörödések (kompressziók), illetve ritkulások (expanziók) sorozata jön létre (Rooney, J. A., 1988). A közeg molekuláinak rezgése folytán fellép a folyadék viszkozitásából eredő hatás, amely csökkenti az akusztikus intenzitást, és az energia nagy része így hővé alakul. Tehát a ritkítási helyeknél hűtés, míg a kompressziósoknál hőtermelés történik (T. G. Leighton, 1994). Ha a molekulák mozgása olyan mértékű, hogy a köztük lévő intermolekuláris kölcsönhatások megszűnnek, a folyadékokban üregek, buborékok képződnek, amelyekben a nyomás a folyadék adott gőznyomása alatt van (Török B., Molnár Á., 1996). Ezt a jelenséget akusztikus kavitációnak nevezzük (Margulis, M. A., 1993).

A buborékok élettartamát azok mérete határozza meg. A relatíve nagyobb buborékok stabilabbak, az akusztikus ciklus hosszát figyelembe véve nagyobb élettartamúak. Ezek a buborékok nem tehetők felelőssé a kémiai reakciók bekövetkezéséért, mivel a hanghullámokkal együtt, kis amplitúdón oszcillálnak, nem fejtenek ki tényleges hatást a rendszerre. Ezt a jelenséget nevezi az irodalom stabil kavitációnak. Ezzel ellentétben a rövid élettartamú kis buborékok hatalmas sebességgel képződnek és oldódnak fel, ilyen módon befolyásolva a kémiai reakciók lefolyását. A kis buborékok kezdeti mértékű többszörösére tágulnak és mivel a belsejükben uralkodó nyomás kezdetben is az adott hőmérsékletnek megfelelő telített gőznyomás alatt van, a tágulás miatt egy bizonyos méret után összeroppannak. A roppanás közvetlen közelében extrém nagy nyomás és hőmérséklet alakul ki: 10⁵ Pa nyomás és kb. 5000 K hőmérséklet (Nap felszínének hőmérséklete). Ez a jelenség az átmeneti kavitáció (T. G. Leighton, 1994).

A kavitáció jelensége az ultrahang alsó frekvenciatartományában a legjelentősebb, 20-100kHz között. Ezt nevezik kisméretű ultrahangnak, amelyet számos tudományterületen alkalmaznak. Sikeresen végezhető szerves kémiai reakciókban bontás, szennyvíztisztításban ártalmatlanítás, emulziók képzése, továbbá az anyagszállítás gyorsítása révén enzimreakciókban alkalmazzák. Megállapították, hogy a kavitáció jelensége heterogén fázisú enzimreakciókban két nagyságrenddel erősebb hatást vált ki, mint homogén fázisú

reakciókban. A szilárd fázis közelében a kavitáció hatására képződő buborék aszimmetrikusan felnyílik, majd vízzel való feltöltődésével a szilárd felszínre irányuló kb. 100 m/s sebességű mikroáramlás alakul ki (1. ábra) (Suslick, K. S. , 1988). Ezek az ún. microjetek nagymértékben gyorsítják az anyagszállítást.



1. ábra: A microjet-hatás

A szennyvíztisztítási technológiákban találkozhatunk ultrahangos kezeléssel, amellyel az iszap szerkezetét megbontják, fellazítják, ezzel a fermentációt hatékonyabbá teszik.

2.4. A vizsgált törzs és a len szubsztrátum

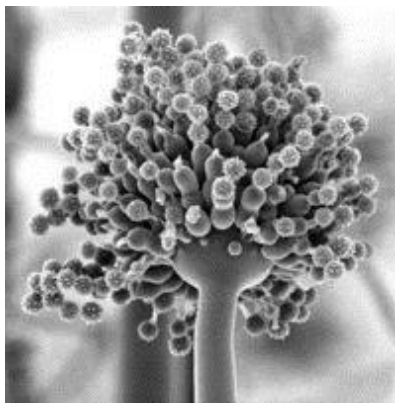
2.4.1. *Aspergillus oryzae*

Számos baktériummal, élesztő- és fonalasgombával termelnek különböző enzimeket szilárd fázisú fermentációs rendszerben. Az adott célra megfelelő legjobb törzs kiválasztása számtalan faktortól függ, amelyek közül a legfontosabb a szubsztrát típusa, illetve a környezeti tényezők. Az SSF során a szubsztrát, azon túl, hogy tápanyagforrásként szolgál a mikroba számára, egyben szilárd felszín is (hordozó), amelyhez a sejt kötődhet. Az ideális szubsztrát megfelelő mennyiségben tartalmaz minden olyan tápanyagot, amelyre a mikroorganizmusnak a növekedéshez szüksége lehet. Bizonyos tápanyagok hiánya, illetve nem megfelelő koncentrációja esetén azokat kívülről pótolni kell (Tengerdy, R. P., 2002).

A mikroorganizmusok növekedése szempontjából az adott szubsztrát esetén a legfontosabb tényezők a vízaktivitás és a részecskeméret. A mikroba kielégítő növekedéséhez általában a kisebb részecskeméret biztosít nagyobb felületet. A túl kis méret azonban a szubsztrát összetapadását okozhatja, ami viszont akadályozza az oxigénellátást, így hátráltatva a mikroorganizmus növekedését. A nagyobb szemcseméret jobb levegőztetést tesz lehetővé,

de a mikrobáknak kisebb felületet kínál a tapadáshoz. Szilárd fázisú fermentációban leggyakrabban *Aspergillus*, *Trichoderma*, illetve *Rhizopus* törzseket alkalmaznak (Machida M. et al., 2005).

Az *Aspergillus* nemzetség több száz penészfajt foglal magában és világszerte megtalálható. Az általunk is használt *Aspergillus oryzae* törzseket rendszertanilag a Deuteromycota tagozaton belül, a Plectomycetes alosztályba soroljuk, a kleisztotéciumos gombák közé. Imperfekt, obligát aerob fonalas penészgomba, mely korhadó növényeken él, kis vízaktivitású helyeken. Az *Aspergillus oryzae* (2. ábra) törzsek nagy mennyiségben termelnek hidrolitikus enzimeket. Ennélfogva széles körben használják főként a rizs cukrosítására (sörkészítés), illetve Ázsiában a hagyományos módon, fermentációval előállított szójaszószhoz (koji). A rizsszemek, valamint a szójabab felületén és azok belsejében gyors micéliumnövekedésre képesek. Főként amilázokat (α -amiláz és glükóamiláz), kisebb mennyiségben karboxipeptidázt és csekély mennyiségben tirozinázt termelnek. Alkalmazhatósága élelmiszerbiztonsági szempontból is megfelelő, hiszen nincs aflatoxin-termelése (Liang, Y. et al., 2009).



2. ábra: *Aspergillus oryzae* elektronmikroszkópos képe

Szilárd fázisú fermentációkban a len, mint fermentációs szénforrás hatékonynak bizonyult (Szabó, O. E. és mtsai, 2013, benyújtott kézirat) az *Aspergillus oryzae* NRRL 3485 törzs számára. A törzs szubsztrátra specifikus enzimeket termel, módosítja az anyagcseréjét, adaptálódik és olyan enzimeket termel, mely a len lignin- és hemicellulóz-tartalmának bontására, illetve egyéb növényi melléktermékek degradálására alkalmasak.

2.4.2. A len

Cellulóz alapú nyersanyagok - A len növény

A cellulóz a növényi sejtek egyik fő összetevője, ezért kinyerésére jól kiválasztott növényi képződményekből kell kiindulni (Rusznák, I., 1988). A lennek közel 100 fajtája ismert, ezek közül csak a *Linum usitatissimumot* (3. ábra) termesztik. A lenfélék (*Linaceae*) családjához tartozik, levelei keskenyek, világoszöldek, virágja halványkék vagy fehér. A len már évezredekkel ezelőtt ismert volt, valamennyi kultúrnép termesztette. Két jellegzetes típusa alakult ki: a rostlen és a maglen (Frányó, I., 1984).



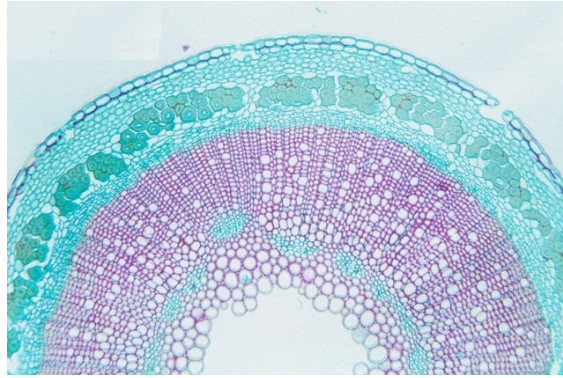
3. ábra: A *Linum usitatissimum* virága

A maglen elágazó szerkezetű növény, melyet főleg lenmag, illetve lenolaj előállítására használnak. A rostlen magas növésű (kb. 0,6 -1,2 méter magas), nem elágazó szárú, egynyári növény. A textilipari célra használt rostlen 1,3-3,0 mm átmérőjű szárából finom, erős rostlen nyerhető. A termesztése meghatározott éghajlati feltételekhez kötött, a mérsékelt, csapadékos éghajlat növénye.

A rostlen a háncsrostok közé sorolható textilipari alapanyag. A háncsrostok a növény szárában, a kéreg alatt találhatók. A rostkötegek együttes keresztmetszete a szárkeresztmetszet kb. 5%-át teszi ki. A rostkötegeket növényi ragasztóanyag, a pektin kapcsolja a szomszédos sejtekhez. Feltárás során ezt a ragasztóanyagot távolítják el, és így a rostkötegek a szár többi részétől szabaddá válnak. A lenrost minősége nagymértékben függ a feltárástól, melynek leggyakrabban alkalmazott módja a baktériumos áztatás (Jedlicka, R., 1993).

A len morfológiai jellemzői

A lenrostokat különböző szövetek veszik körül, mint azt az 4. ábrán is láthatjuk. A lenszárbán hat réteget szokás megkülönböztetni, melyek (kívülről befelé haladva): az epidermisz, a háncsréteg, a kambium, a fás rész, a bélüreg, valamint a rostköteg.



4. ábra: A lenszár keresztmetszete

Az epidermiszt (vagy felhámot) vastagfalú sejtekből álló réteg alkotja, melynek felületét viaszzerű kutikula borítja. Ennek feladata a nedvesség túlzott elpárolgásának megakadályozása és a növény védelme. Pórusos szerkezete lehetővé teszi a növény légcseréjét és a feltáráshoz használt folyadék szárba való bejutását. A háncsréteg pektint és színezőanyagokat tartalmaz, 2-7 rétegben lágy kéregsejtek alkotják. A textíliapar szempontjából értékes rostkötegek a kéregsejtek közé vannak beágyazva. Egy növény szárában 14-40 rostköteg található, kötegenként 12-40 elemi sejtet tartalmazva. Vékonyfalú sejtekből álló gyűrű alkotja kambiumot, mely a háncsrészt a fás növényi résztől szeparálja el. A fás rész vastag falú, elfásodott sejtekből álló széles réteg, feladata a lenszár merevségének biztosítása. A bélüreg vékonyfalú, levegővel telt sejteket tartalmaz (Rusznák, I., 1988).

Az elemi sejt fal két részből áll: a primer (elsődleges), illetve a szekunder (másodlagos) falból. Az elsődleges fal egy rendkívül vékony, fibrilláris felépítésű cellulózzréteg. Felülete igen sima, ezért a kotonizált (elemi sejtekre bontott) len nehezen fonható. A szekunder fal réteges szerkezetű, rétegezettsége kizárólag duzzasztott elemi sejtekben látható. A másodlagos fal anyaga részben elfásodott cellulóz, és a primer falhoz hasonlóan ez is fibrilláris felépítésű.

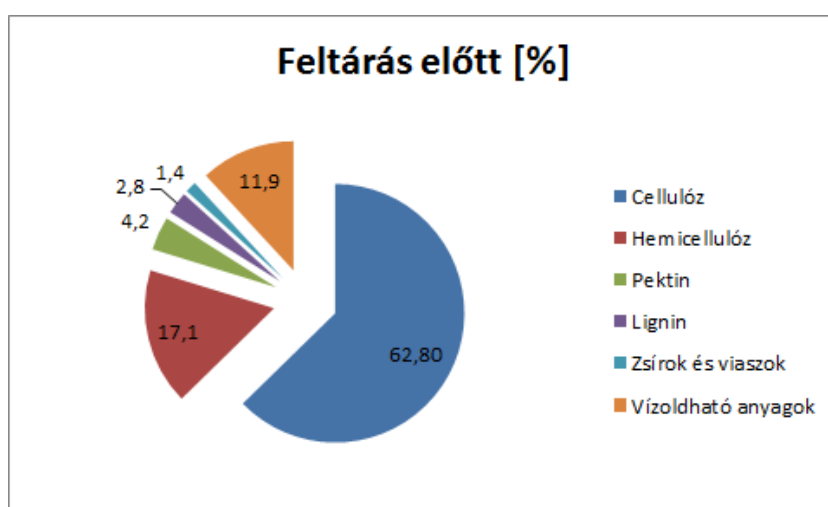
A len fizikai tulajdonságai és kémiai összetétele

A megfelelő minőségű lenrost általában barnás-halványsárga színű, esetleg ezüstös csillogású, míg a mechanikai úton feltárt rostok zöldes árnyalatúak. A lenrostok szép, selymes fénye az elemi sejtek sima felületének tulajdonítható (5. ábra) (Beck és mtsai, 1991).

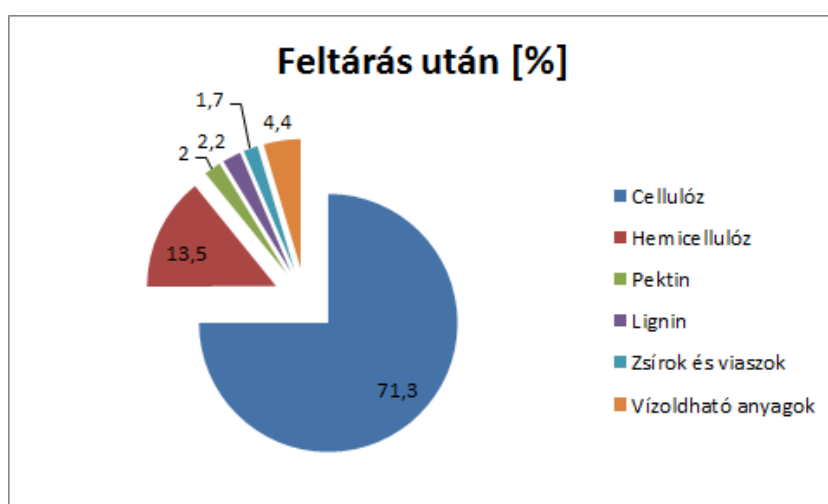


5. ábra: A lenrost

A len alfa-cellulóz tartalma a pamuténál kisebb, a feltárást követően 70% körüli. A kísérőanyagok nagy része lúgoldható. A len kémiai összetételét a feltárás előtt és azt követően az irodalmak alapján az alábbi diagramok (6. és 7. ábra) foglalják össze százalékosan (Goswami, K. K. és mtsai, 1992):



6. ábra: A len kémiai összetétele feltárás előtt



7. ábra: A len kémiai összetétele feltárás után

A szennyező anyagok közel $\frac{2}{3}$ -ad része hemice llulóz. Ez az anyag a növényi sejtfa glükóz egységekből álló poliszacharidjai (200-nál is kisebb polimerizációs fokkal), a

glükóztól eltérő hexóz és pentóz alapú szénhidrátjai, valamint ezek egymással és uronsavakkal alkotott vegyületei. A hemicellulózok teljes eltávolítása a szál szilárdsági és szakítási tulajdonságainak jelentős romlását eredményezi. Sokféle előkezelési eljárást dolgoztak ki a lignocellulóz és egyéb melléktermékek szerkezetének megbontására. Minden eljárásnak megvannak a maga előnyei és hátrányai, valamint léteznek olyanok, melyek a magas költségek vagy a kis hatásfok miatt ipari megvalósításra alkalmazhatatlanok.

A len kísérőanyagainak enzimes eltávolítása

A cellulóz alapú szálanyagok kikészítésének leginkább vegyszer- és energiaigényes része az előkészítés, illetve a fehérítés, melyek során a szálanyagok természetes vagy mesterséges kísérőanyagainak eltávolításával jó nedvszívóképességű és megfelelő fehérségű textíliát állítanak elő. A hagyományos (vegyszeres) len előkészítés-fehérítés fő részei a lúgos főzés és az oxidációs fehérítés. A lúgos főzés során forró nátrium-hidroxid oldattal, illetve szódával történő kezeléssel távolítjuk el a természetes kísérőanyagokat, különös tekintettel a felület nedvesítését gátló viaszt. Fehérítéskor oxidálószereket (hidrogén-peroxidot, nátrium-hipokloritot stb.) alkalmazunk a természetes színezőanyagok elroncsolására (*Rusznák, I., 1988*).

Napjainkban egyre nagyobb figyelmet kapnak a különböző környezetkímélő technológiák, így megnőtt az érdeklődés az enzimek textilipari alkalmazása iránt is. Enzimes technológiákkal lehetővé válik a különböző hatások elérésére alkalmazott vegyi hozzáadékok mérséklése, mellyel a környezetvédelmi (szennyvíz) problémák jelentősen csökkenhetnek, vagy akár meg is szűnhetnek.

A textíliák bioelőkészítésében a hidrolitikus enzimek (pl. pektinázok és xilanázok), valamint oxidatív enzimek bizonyultak hatékonyak. A hidrolitikus enzimek a biofőzésnek nevezett folyamatban - főként a pektin részleges hidrolízise révén - eredményesen alkalmazhatók a hidrofíl szálfelület kialakítására. A színes komponensek degradációjára – a biofehérítésre – a lignin degradációban eredményes oxidatív enzimek alkalmazhatók. A fő ligninmódosító enzimek közé soroljuk a peroxidázokat és a lakkázokat.

A peroxidázok közé tartoznak a lignin-peroxidáz (LiP) és a mangán-peroxidáz (MnP). A LiP a legfontosabb lignin degradációt katalizáló enzim, ami a polimer fragmentációjához vezet. A LiP a lignin nem-fenolos részegységeit oxidálja egy elektron-átmenettel járó reakcióban. Az aromás magból kationgyök jön létre, ami képes kémiaiilag tovább bomlani. Lignin modellvegyületek segítségével kimutatták, hogy a LiP a C α -C β kötések hasításáért, a

gyűrűnyitását, valamint számos más reakcióért is felelős (*Datta, A. et al., 1991; Gröngyist, S. et al., 2003; Wood, W. A. et al., 1988*).

A mangán-peroxidáz a Mn(II)-t oxidálja Mn(III)-má, amelyet szerves savak, pl. oxálsav, malonsav, tejsav stabilizálnak komplexképzés közben. Az Mn(III) komplex oxidálja a lignin fenolos részeit és fenoxigyökök képződnek, melyek tovább hasítják a kötéseket az aromás gyűrű és a C α szénatom között. A MnP lignin-oxidáló kapacitása azonban korlátozott, mivel a fenolos szerkezetek aránya a lignin összes egységéhez képest csupán 10-15% (*Gröngyist, S. et al., 2003; Papinutti, V. L. et al., 2003*).

A lignin biodegradációjában hatékony oxidatív enzimek második csoportja a lakkázok, amelyek a lignin polimerizációjában és depolimerizációjában is részt vesznek. A lakkázok a kék multi-réz oxidázok családjába tartoznak. A molekula katalitikus része négy réz atomot tartalmaz. Az egyik réz, mint elsődleges elektron akceptor elektront von el a szubsztrátumtól, a többi binukleáris centrumot képez, ahol a molekuláris oxigén négyelektronos redukciója történik. Az oxigénből víz keletkezik, miközben a redukáló szubsztrátum négy, egyenként egyelektronos oxidációja lejátsszódik.

A mediátorok olyan molekulák, amelyek könnyen oxidálhatók a lakkázzal, majd az oxidált mediátor azután oxidálja az aktuális szubsztrátot. Míg a lakkáz önmagában csak a fenolos lignin egységeket képes oxidálni, mediátorok alkalmazásával már a nem-fenolos lignin egységeket is. Ilyen mediátor (elsőrendű szubsztrát) pl. a 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-szulfonsav) (ABTS) (*Gröngyist, S. et al., 2003; Papinutti, V. L. et al., 2003*).

A biológiai előkezelések során különböző mikroorganizmusokat (barna-, fehér-, és lágyrothasztó gombák) alkalmazhatnak a lignin és a hemicellulózok bontására a növényi melléktermékekben (*Szakács-Dobozi és mtsai, 1992*). Az eddigi kísérletekben fehérrothasztó gombák (pl. *Phanerochate chrysosporium*, *Trametes versicolor* stb.) bizonyultak hatékonyaknak (*Taherzadeh M.J. et al, 2008*). Az előnyök között említhető az alacsony energiaigény, az enyhe körülmények, illetve hogy semmilyen kémiai ágens nem szükséges.

Az oxidatív enzimek - eltérően a bioelőkészítésben alkalmazott hidrolitikus enzimektől - rendkívül drágák, ezért hasznos ezek előállítása fermentációval. A fermentáció során alkalmazott szénforrás hatással van a termelt enzim aktivitására. Kedvező eredményeket tapasztaltak lignocellulóz szénforrás alkalmazása esetén különböző (SF, semi-SSF, SSF) fermentációs eljárásokban, ami alapján azt a következtetést vonták le, hogy a lignocellulóz szubsztrát és annak bomlástermékei indukálják a lignindegradáló oxidatív enzimek termelését. A cellulóz jelenléte a LiP enzim termelésére hatott kedvezően SF-ban (*Kapich AN*

et al., 2004; Leisola MSA et al. 1985). Indokolt tehát a len biofehérítése céljából előállított enzimek fermentációja során len szénforrást alkalmazni.

2.5. A kutatómunka célja

A kislekvenciás ultrahang eredményesen alkalmazható extrakciós műveletekben, például az élelmiszeriparban. A szakirodalomban nem találtunk azonban olyan közleményt, ahol a kislekvenciás ultrahangot a szilárd fázisú fermentációval termeltetett enzimek kinyerésében (extrakciójában) alkalmazták volna. Mivel az extrakció és a megfelelően koncentrált enzimoldatok előállítása a szilárdfázisú fermentáció gazdaságosságát jelentősen befolyásolják, a hatékony extrakciós lépés hozzájárulhat a fermentációs eljárás további elterjedéséhez.

Tudományos diákköri munkámban *Aspergillus oryzae* törzset szaporítottunk el nyers lenrost szubsztrátumon szilárd fázisú fermentációval abból a célból, hogy oxidatív enzimeket állítsunk elő, amelyeket aztán a len biofehérítéséhez használhatunk. Az extrakciós lépést kislekvenciás ultrahanggal segítettük. Az ultrahangos kezelés paramétereit széles határok között változtattuk.

A kutatási munkám során arra kerestem a választ, hogy

- a kislekvenciás ultrahang a szilárd fázisú fermentációval előállított és kinyert enzimek hidrolitikus és oxidatív aktivitását hogyan befolyásolja;
- a kislekvenciás ultrahang milyen mértékben fokozza az enzimek extrakcióját a szilárd fermentumokból;
- a kinyert enzimkeverék hatékony-e nyers lenszövet biofehérítésében.

Mivel a biofehérítésben egyrészt oxidatív enzimek, másrészt hidrolitikus enzimek katalitikus hatása érvényesül, ezért a fenti folyamatokat a lignin-peroxidáz, a lakkáz, a poligalakturonáz (pektináz) és a szűrőpapírlébonzó (celluláz) aktivitás mérésével követtem.

3. Kísérleti rész

3.1. Előzmények

A BME-VBK Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszéken korábbi kísérletekben gyapotmaghéjon sikeresen előállítottak enzim komplexeket gyapotmaghéj és pamut enzimes kezeléséhez (Csiszár és mtsai, 2007; Csiszár és mtsai, 2008). Ennek analógiájára lenen, mint szénforráson szaporítottak el hat fonalas gomba törzset kétféle fermentáció keretében (SSF, SmF) és a kapott anyagot használták len szövetek bioelőkészítésére és biofehérítésére. Az alábbi fonalas gombákat tesztelték len szénforrást tartalmazó fermentációs kísérletekben:

- *Phanerochaete chrysosporium* NCAIM F 00740 (=ATCC 34541),
- *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725,
- *Phanerochaete chrysosporium* VKM F-1767,
- *Aspergillus giganteus* NRRL 10,
- *Aspergillus oryzae* NRRL 3485,
- *Trichoderma virens* TUB F-498.

A hat törzset különböző összetételű és nedvességtartalmú fermentációs táptalajokon vizsgálták, optimalizálva a só tartalmat (egyszerűbb és komplexebb), valamint szilárd fázisú fermentációnál a nedvességtartalmat is.

A fermentáció végén a szubmerz tenyészeteket lecentrifugálták, majd a felülúszókból különböző hidrolitikus és ligninolitikus enzimaktivitásokat mértek a nemzetközi publikációkban használt módszerek szerint. Az előzetes screening eredmények alapján a két legjobban termelő törzset kiválasztották későbbi kísérletekhez (*Trichoderma virens* TUB F-498, ill. *Aspergillus oryzae* NRRL 3485). A *Trichoderma* törzssel végzett kísérletek eredményeit egy benyújtott kéziratban foglalták össze a közelmúltban (Szabó, O. E. és mtsai, 2013, benyújtott kézirat). A kutatási munkába bekapcsolódva feladatom az extrakciós és biofehérítési kísérletek folytatása volt az *Aspergillus oryzae* törzssel.

3.2. Anyagok és módszerek

3.2.1. Felhasznált vegyszerek, anyagok

A fermentációhoz a komáromi Hungaro-Len Kft. által gyártott len előfonalat használtam. A biofehérítésnél a győri Pannon-Flax Zrt. által gyártott kezeletlen (nyers) lenszövetet kezeltem. A lenszövet vászonkötésű és területi sűrűsége 276 g/m².

A kísérletekhez analitikai tisztaságú vegyszereket használtam, amelyeket a Sigma Aldrich Kft.-től és a Reanal Finomvegyszergyár Zrt.-től rendeltem.

A korábbi screening kísérletek alapján *Aspergillus oryzae* (NRRL 3485) törzzsel dolgoztam, szilárd fázisú fermentációval enzimeket termeltem lenrost szubsztrátumon az Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszéken.

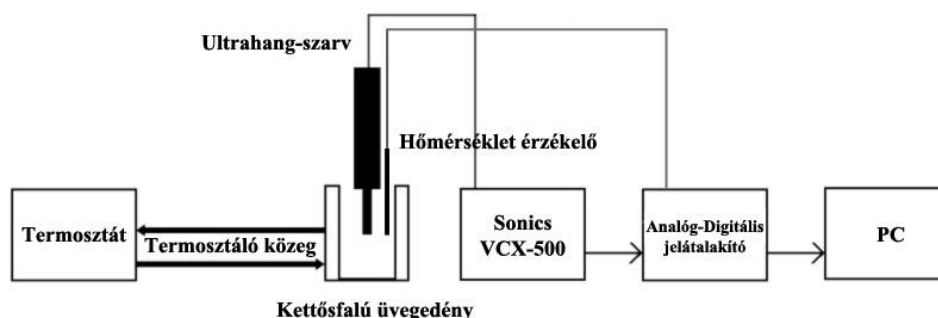
3.2.2. Ultrahang kezelések

Az ultrahangos kezelésekhez Sonics VCX-500 (Sonics & Materials, Inc., USA) típusú ultrahang horn/szarv készüléket használtam. A készülék 40 kHz frekvenciájú hangot bocsát ki, maximális amplitúdója 124 μm , amelynek értéke százalékosan állítható. Maximális teljesítménye pedig 500 W.

A kezeléseket egy speciálisan kialakított kettősfalú üvegedényben végeztem, amelynek magasságát úgy tervezték, hogy az edény alja, és a horn vége közt egy hullámhossz legyen a távolság az állóhullám kialakulása miatt. Az üvegedényt külső termosztátra kapcsoltam, hogy meggátoljam az ultrahang okozta jelentős hőmérséklet-emelkedést, és biztosítsam az enzimek számára optimális körülményeket. Az ultrahangos processzor egy mintagyűjtő egységen keresztül kapcsolódott számítógéphez, ahol 10 másodpercenként regisztrálódott a leadott teljesítmény és a reakcióközeg aktuális hőmérséklete.

Az ultrahang energiasűrűségét korábbi kutatások során határozták meg kalorimetriás módszerrel az egyes vizsgált amplitúdó értékeken (Szabó, O. E. és mtsai, 2013). A 40 % amplitúdón a készülék által leadott teljesítmény 30,3 W, amelyből a tényleges munka 20,6 W. 60 % amplitúdón a leadott 62,6 W-ból 40,9 W fordítódik a hanghullám előállítására. Míg 80 % amplitúdón 91,5 W-ból 55,1 W munkával állítható elő az ultrahang. Az értékek különbsége hőenergiává alakul, hővesztésként jelentkezik.

Az alábbi 8. ábrán látható a mérési gépelrendezés.



8. ábra: Az ultrahang feltáró készülék és a mérési elrendezés

Az ultrahangos kezeléseket 40, 60 és 80 % amplitúdó értéken végeztem, folyamatos termosztálás mellett, 60 percig. A reakcióedénybe 12 ml felülúszó oldatot hígítottam 0,05 M-os citrát pufferrel (pH=5) 120 ml-re. Extrakció esetén pedig 1,2 g szilárd fermentumra 120 ml citrát puffert mértem. Az ultrahang kezelés során mágneseesen kevertettem az oldatot/

szuszpenziót. Mintavételezés 15 percenként történt a későbbi enzimaktivitás mérésekhez (szűrőpapírlbontó-, lignin-peroxidáz, lakkáz és poligalakturonáz aktivitás). Kontroll mérésenként mágnessel kevertetett rendszert vettem alapul. Minden mérést megismételtem háromszor.

3.2.3. Felülúszóval végzett kísérletek

A kísérletek első szakaszában arra kerestem a választ, hogy az ultrahang milyen mértékben degradálja a vizsgált enzimek aktivitását (szűrőpapír lebontó-, lignin-peroxidáz, lakkáz és poligalakturonáz aktivitás). Ehhez a fermentációt követően körkörös típusú rázógépen extrahált felülúszó mintákat használtam fel (220 rpm, 2 óra, 0,05 M citrát puffer pH=5). A felülúszó mintákat citrát pufferrel hígítottam 120 ml-re 10 x-es hígítással, majd 60 perces ultrahangos kezelést végeztem, és a mintavételezést követően mértem az enzimaktivitasokat.

3.2.4. Szilárd SSF-vel végzett extrakciós kísérletek

A kísérletek második fázisában az ultrahang horn extrakciós hatását vizsgáltam, hogy az ultrahanggal milyen mértékben nő az oldatba került enzimek aktivitása a hagyományos mágnessel kevert rendszerhez képest. A szilárd SSF mintákhoz 100-szoros mennyiségű puffert adtam, majd az előzőekben leírt módon jártam el a mintavételezéssel és az aktivitásmérésekkel.

3.2.5. Enzimaktivitás mérések

Szűrőpapír lebontó aktivitás (FPA)

A reakcióelegy egy 1×6 cm-es Whatman No.1. szűrőpapír csíkot, 1,0 ml 0,05 M-os citrát puffert (pH=5) és 0,5 ml megfelelően hígított felülúszót tartalmazott. Az elegyet 50°C-on 60 percig inkubáltam, majd 3,0 ml DNSZ (dinitro-szalicilsav oldat) hozzáadásával állítottam le, és 5 percig forraltam (100°C-on). Lehűlés után 20,0 ml desztillált vizet adtam hozzá, és (összekeverés után) az abszorbanciát 540nm-en vakkal szemben határoztam meg (vak: 1.5 ml 0,05M-os citrát puffer és 3.0 ml DNSZ reagens) (Ghose és társai, 1987). A szűrőpapír lebontó aktivitás (celluláz enzimkomplex) méri az 50 mg szűrőpapír csíkból 1 óra alatt felszabaduló redukáló cukor (glükóz ekvivalens) mennyiségét. Az aktivitást Ghose (1978) ajánlása szerint számoltam ki.

Poligalakturonáz aktivitás

A reakcióelegy 1,2 ml K-pektát (Sigma) oldatból, és 0,5 ml felülúszóból állt. Az elegyet 10 percig 50 °C-on inkubáltam, és ezután 3,0 ml Stop reagens (EDTA, 0,5 M NaOH, 0,5 % PAHBAH) hozzáadásával leállítottam a reakciót. A 10 perces inkubálást 5 percre 95 °C-on melegítettem, majd a hűlést követően mértem az abszorbanciáját 412 nm-en, a megfelelő háttérrel szemben mértem. (vak: 1,2 ml 1%-os K-pektát (Sigma) oldat, 0,5 ml desztillált víz és 3,0 ml Stop reagens) (*Puchart és társai, 1999*). A poligalakturonáz a pektint bontó enzim komplex egyik lényeges alkotója.

Az aktivitást az alábbi képlet alapján határoztam meg:

$$PG \text{ aktivitás } [IU / ml] = \frac{(A_{\min ta} - \text{tengelymetszet}) * D}{tg \alpha * t}$$

Ahol:

$A_{\min ta}$: a minta mért abszorbanciája 412 nm-en, a megfelelő háttérrel szemben (vak minta)

tengelymetszet: a kalibrációs egyenes tengelymetszete

D: a hígítás mértéke

$tg \alpha$: a kalibrációs egyenes meredeksége [ml/mikromol]

t: a mérés ideje [10 perc]

Lignin-peroxidáz

Az aktivitás meghatározását a Daljit és társai (2001) által kidolgozott módszer szerint végeztem.

A lignináz katalizálja a veratril-alkohol (dimetoxi-benzilalkohol) veratril-aldehiddé történő H_2O_2 által végzett oxidációját. Az alkoholnak nincs, de az aldehydnek erős abszorbanciája van 310 nm-en. A reakcióelegy 1 ml 125 mM tartarát puffert (pH=3), 0,5 ml 10 mM veratril-alkoholt, 0,5 ml enzimoldatot tartalmazott. 5 percig előtermosztáltam 30 °C-on a mixet. Majd hozzáadtam 0,5 ml 10 mM H_2O_2 oldatot, amellyel elindult a reakció. Leolvastam a peroxid hozzáadása előtti, ill. 10 perccel később, a lecsökkent abszorbancia értéket. Vak mintaként hasonlóan készített, de enzimet és peroxidot nem tartalmazó mintát használtam.

Az alábbi képlet alapján számoltam az enzimaktivitást, a Lambert-Beer törvényt felhasználását követően:

$$A = c \times \varepsilon \times l,$$

Ahol:

c: a koncentráció [M]

ε : a moláris extinkciós koefficiens [$\text{dm}^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

l: a fény útja [cm]

$$\text{Aktivitás} \left[\frac{\text{IU}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{átalakult mólok száma } [\mu\text{mol}]}{\text{enzimtérfogat } [\text{ml}] \times \text{inkubálási idő } [\text{min}]}$$

A fehérje moláris extinkciós koefficiense: $\varepsilon_{310}=9\,300\text{ dm}^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Lakkáz

A kémcsőbe 1,75 ml acetát puffert (pH=5), 0,25 ml 0,05 mM ABTS (2,2'-anizo-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfocid acid)) oldatot, ill. 0,5 ml enzim oldatot mértem össze. Az ABTS szubsztrátot 2 perces (30 °C) előtermosztálás után adtam a mintákhoz, majd 10 perc elteltével jeges vízbe helyezve leállítottam a reakciót. Az oldatok abszorbanciáját 420 nm hullámhosszon mértem spektrofotométerrel. Vak mintaként hasonlóan készített, de enzimoldatot nem tartalmazó mintát készítettem el, amelyre felvettem az alapvonalat a fotometriás mérésnél. Az aktivitást a lignin-peroxidáznál leírtakhoz hasonlóan számoltam ki. A fehérje moláris extinkciós koefficiense: $\varepsilon_{420}=36\text{ mM cm}^{-1}$ (Papinutti, 2003).

3.2.6. Biofehérítés és színmérés

Biofehérítés extrakció után

Vizsgáltam az ultrahangos extrakció hatását a biofehérítésre. 60% amplitúdó értéken különböző ideig (15-30-45perc) végeztem extrakciót szilárd SSF mintából. Az ultrahangkezelést követően a 120 ml SSF szuszpenziót kétfelé osztottam, majd az egyiket centrifugáltam 8500 rpm-en 15 percig szobahőmérsékleten és dekantálva szűrtem. Az extrakciót rázó termosztátban is elvégeztem, viszonyítási alapként. Ezt követően előkészítettem a fehérítéshez a kezelendő mintákat, körbeszegtem az 5 cm oldalhosszúságú nyers lenszövet négyzeteket. A fehérítést rázó termosztátban 50 °C-on 30 percig végeztem. 1 g szövetre 60 ml előextrahált szuszpenzió jutott, mind a szűrt, és szűretlen mintákkal. A fehérítés után a szöveteket alaposan mostam forró, majd szobahőmérsékletű desztillált vízzel, és levegőn hagytam megszáradni.

Színmérés

A biofehérítés hatását a kötött lenszövet színére színméressel határoztam meg. A fehérítést követően másnap a megszáradt szövetek mértem a reflektanciáját Hunterlab Color QUEST színmérő berendezésen, D 65/10° fényforrással. A mintákat a standardnak választott kezeletlen kelmékhez viszonyított ΔE^* , ΔL^* és ΔC^* értékekkel jellemeztem, amelyek jelentése:

- dC^* = színtelítettség, azaz króma
- dL^* = világossági tényező
- dE^* = színingerek közti különbség

A mérést 3 rétegbe hajtogatott szövetem három különböző helyen végeztem, amelyből a színmérő készülékhez kapcsolt számítógép és a szoftver elvégezte az átlagolást.

3.3. Eredmények, értékelés

3.3.1. Előzmények

Munkám során a BME-VBK Fizikai Kémia és Anyagtudományi tanszéken folyó kutatásokba kapcsolódtam be. Az alábbi törzseket vizsgálták len szubsztráton végzett szilárd fázisú fermentációval: *Aspergillus giganteus* NRRL 10, *Aspergillus oryzae* NRRL 3485, *Phanerochaete chrysosporium* VKM F-1767, ATCC 24725, NCAIM F-00740 és *Trichoderma virens* TUB F-498. A fermentációs előkísérletekben összehasonlították a süllyesztett fázisú fermentációt a szilárd fázisúval, továbbá optimalizálták a tenyésztési körülményeket, ahogy erről az irodalmi bevezető fejezetben leírtam. Hidrolitikus és lenre specifikus oxidatív enzimek aktivitásának mérésével meghatározták a legnagyobb enzimaktivitást produkáló törzseket. E mellett tesztelték a kinyert nyers enzimkeverékek len szövet fehérítő hatását, és a legjobb enzimtermelő, ill. fehérítő törzsekkel dolgoztak tovább.

A legjobb, *Trichoderma virens* törzsszel végzett kísérletek eredményeit egy benyújtott kéziratban foglalja össze témavezetőm és szerzőtársai (Szabó, O. E. és mtsai, 2013, benyújtott kézirat). Ennek folytatásaként kísérleteimben az *Aspergillus oryzae* NRRL 3485 törzsszel dolgoztam. Az eredményeimet három szakaszban szeretném bemutatni.

Az első részben az ultrahang esetleges enzimkárosító hatását vizsgálom extrahált felülúszóminták szonikálásával. A második részben a szilárd SSF minták (9.ábra) extrakcióját ultrahanggal végeztem el, amelyet mágneses kevertetéshez viszonyítottam. Végül pedig az extrakciót és a kinyert enzimek fehérítő hatását vizsgáltam nyers lenszövet *in situ* biofehérítésével rázó termosztátban.

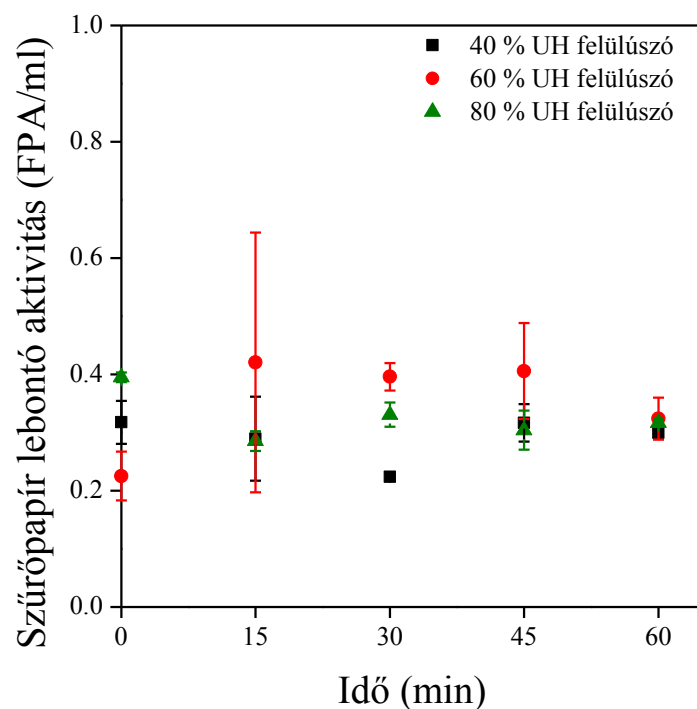


9. ábra: *Aspergillus oryzae* NRRL 3485 SSF minta

3.3.2. Ultrahang kezelés hatása a nyers enzimoldatok aktivitás értékeire

Az extrakció és biofehérítési vizsgálatok értékelése előtt tisztázni kellett, hogy milyen hatással van az ultrahangos kezelés az SSF mintákból kiextrahált nyers enzimkeverékre. Az extrakciós hatás mellett figyelembe kell venni az ultrahang esetleges degradáló, fehérje-szerkezetkárosító, denaturációs hatását. Így citrát pufferrel (pH=5) körkörös rázóban extraháltuk két órán át 200 rpm fordulaton az SSF mintákat, majd centrifugálás után a kapott felülúszókat vizsgáltuk ultrahanggal. Négy választott enzim aktivitásának mérésével jellemeztem az ultrahang hatását. Mértem a felülúszók szűrőpapír lebontó, lakkáz, lignin-peroxidáz, és poligalakturonáz aktivitását 40-60-80 %-os amplitúdó értéken 60 percig. Az extrakció vizsgálatának megkezdésekor a 0. időpillanatban egy hipotetikus mérési pont került felvételre.

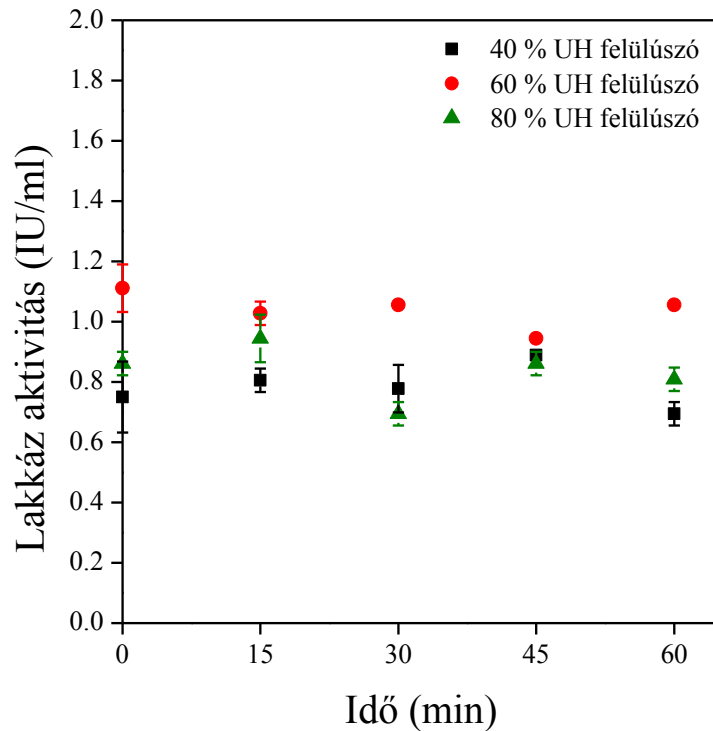
A szűrőpapír lebontó aktivitással a cellulózbontó enzimek összaktivitása jellemezhető. A kiindulási enzimaktivitás 0,23-0,4 FPU/ml érték körül ingadozik, mivel az extrahált felülúszók kiindulási aktivitás értékei szarzonként eltérhetnek. A 10. ábrán láthatjuk, hogy a 60 % amplitúdón mért 15. perces kiugró mintavételtől eltekintve az enzimaktivitás nem csökken ultrahang hatására. Egy órás kezelést követően is 0,30-0,32 FPU/ml aktivitást mértünk. 80 % amplitúdó értéken tapasztalunk csak enzimaktivitás csökkenést, 0,4 FPU/ml-ről 0,32 FPU/ml-re, de ez nem jelentős csökkenés. Az FPA mérési eredményei viszonylag nagyobb szórást mutatnak, amely a mérési módszerből is adódik.



10. ábra: Szűrőpapír lebontó aktivitás (FPA) változása felülűsző minták ultrahangos kezelése során

A lakkáz (EC 1.10.3.2.) több rézont tartalmazó polifenol-oxidáz enzim, szubsztrátjaként különböző aromás komponensek szolgálnak, míg terminális elektron akceptora az oxigén (Scherer, M. et al., 2001). A folyadékból, illetve szövetanyagokból való színezék eltávolító hatása miatt különösen fontos a biotechnológiai műveletekben és környezetvédelmi alkalmazásokban betöltött szerepe (Tzanov, T. et al., 2003).

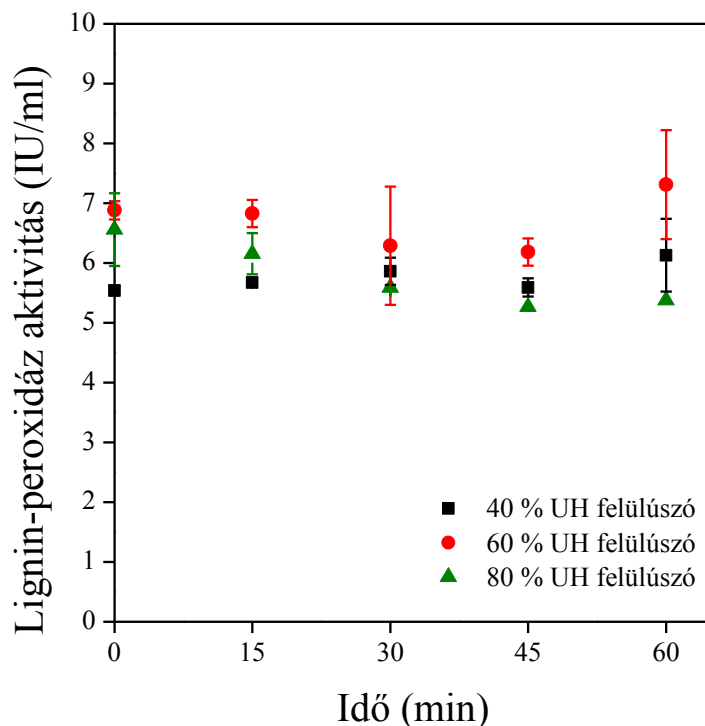
A lakkáz aktivitás mérése során az FPA-hoz hasonló eredményeket tapasztaltunk. A felülűsző minták kiindulási lakkáz aktivitása 0,75-0,85-1,1 IU/ml érték körül mozgott (11. ábra). Az egyes mintavételeknél látható némi ingadozás, de kb. a kiindulási érték körül mozog a mért lakkáz aktivitás. A rendkívül biztató eredmények azt mutatják, hogy az ultrahang amplitúdójának növelésével nem csökken a lakkáz aktivitás sem jelentős mértékben egy órás kezelést követően.



11. ábra: Lakkáz aktivitás változása felülűsző minták ultrahangos kezelése során

Az oxido-reduktázok csoportjába tartozó lignin-peroxidáz enzim (EC 1.11.1.14) a lignin lebontásában vesz részt. Először a *P. chrysosporium* tenyészetekből azonosították. A LiP sokféle reakcióban vesz részt. Aktivitásmérése is a veratril-alkohol veratril-aldehiddé történő oxidációján alapul, amelyet a hidrogén-peroxid iniciál. A LiP a torna-peroxidázhoz hasonló katalitikus ciklusban reagál, 5 redox reakciós lépésben (R. C. Kuhad, et al., 1997).

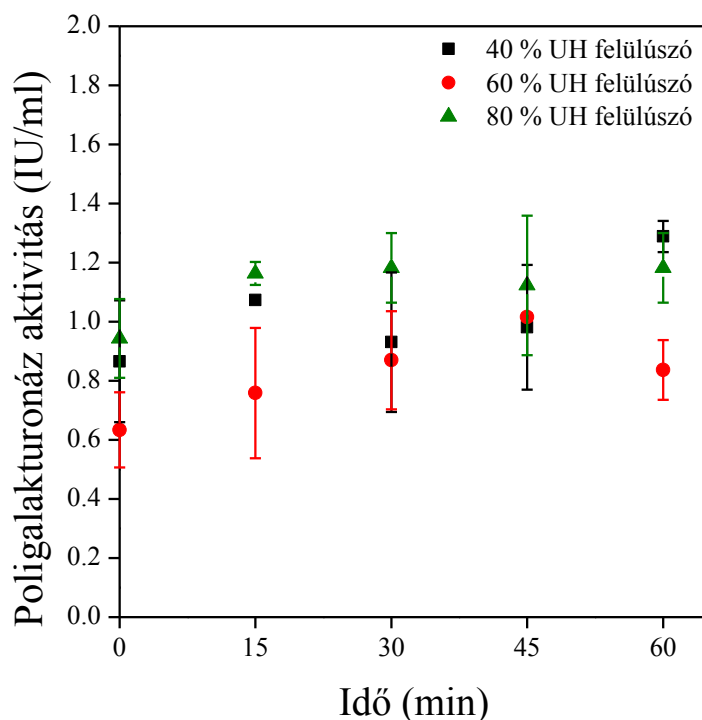
A felülűsző mintákban mértem a lignin-peroxidáz aktivitás változását is. Amint az a 12. ábrán is látható, a kiindulási LiP aktivitás 5,5-6,8 IU/ml közt változott. Az előző eredményekhez hasonlóan tapasztaltam az ultrahangos kezelés során. Az amplitúdó növelésével 30 perc után csekély csökkenés tapasztalható. Azonban a kezelés végére 60 perc után a LiP aktivitás megnő, főleg 60 % amplitúdón, amely adódhat mérési hibából is. 80 % amplitúdó értéken a kiindulási 6,56 IU/ml-ről 5,37 IU/ml-re csökken az aktivitás, ami 20 %-os csökkenést jelent, ez már nem elhanyagolható mértékű.



12. ábra: Lignin-peroxidáz (LiP) aktivitásváltozása felülűsző minták ultrahangos kezelése során

A poligalakturonáz (EC 3.2.1.15) a pektinbontó enzimek egyik nagy csoportját alkotja (Pedrolli D.B. et al., 2009). A pektin a cellulózzal, a hemicellulózzal és a ligninnel együtt a növényi sejtfal egyik fontos építőanyaga, és a cellulózrostok összeragasztásában van szerepe. A textíliák enzimes bioelőkészítése során a külső viaszos réteg eltávolítását a pektin enzimkatalizált hasításával valósítják meg, amely hidrofíli felület eredményez. Így a poligalakturonáz enzim ipari jelentősége a lakkázhoz és lignin-peroxidázhoz hasonlóan rendkívül fontos.

A poligalakturonáz aktivitás mérés során az előző három enzimaktivitáshoz hasonló eredményt mértünk. A 60 % amplitúdó értéken mért PGU aktivitás alacsonyabb a másik 2 amplitúdón mértékhez képest. Valószínűleg a felülűsző sarzs tulajdonságaiban volt eltérés a fermentációból adódóan. Az ultrahang kezelés megkezdése előtt 0,6-0,8-0,94 IU/ml aktivitást határoztam meg (13. ábra). A kezelés során a PGU aktivitás kis mértékben nőtt is az ultrahang hatására.



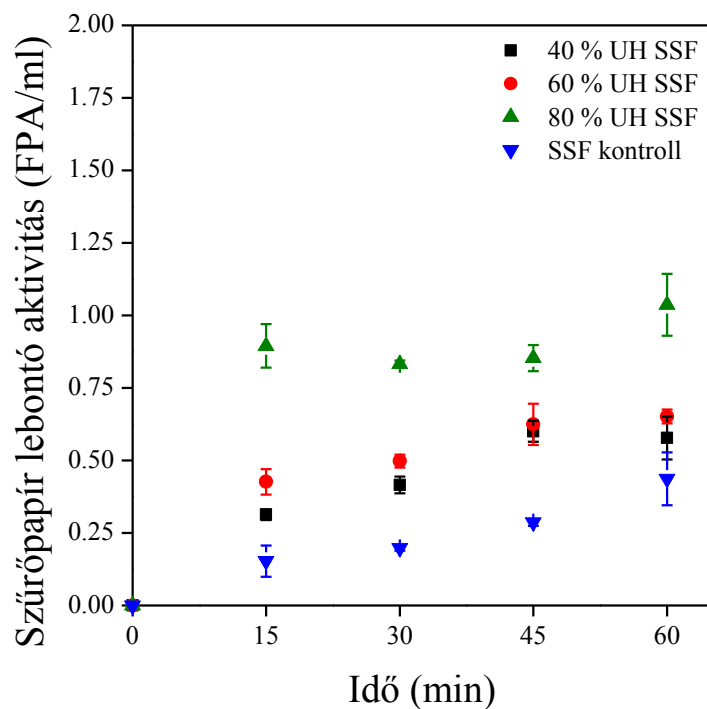
13. ábra: Poligalakturonáz (PGU) aktivitás változása felülűszó minták ultrahangos kezelése során

Összességében tehát elmondható, hogy az ultrahangkezelés nem csökkentette jelentős mértékben a vizsgált felülűszókban a szűrőpapírlebontó, lakkáz, lignin-peroxidáz, és poligalakturonáz aktivitását. Ez rendkívül fontos eredmény, hiszen az extrakció során nem kell számolnunk jelentős degradációval és enzimveszteséggel.

3.3.3. Ultrahang hatása a nyers enzimek extrakciójára

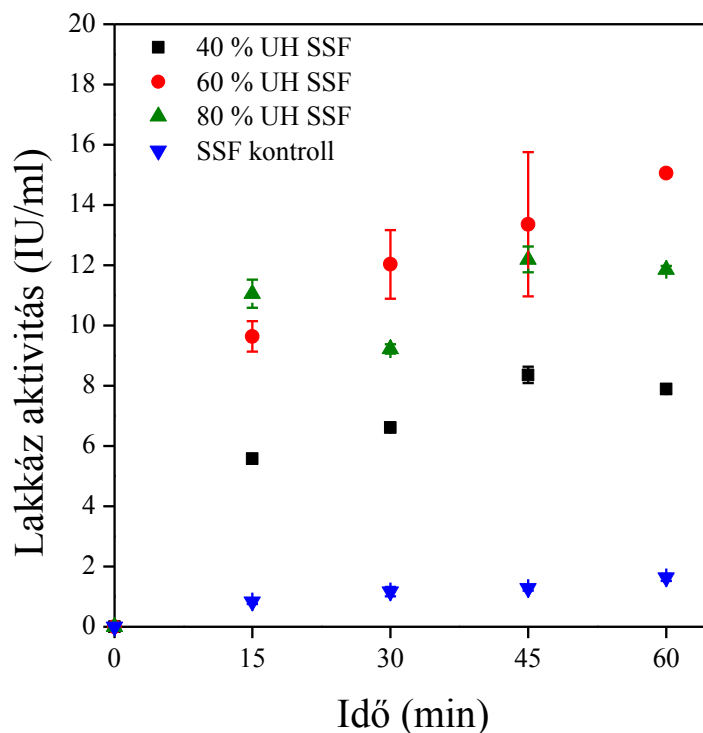
A kísérletek második szakaszában a szilárd SSF minták extrakciójának hatékonyságát ultrahangkezeléssel vizsgáltuk. Kontroll mérésenként mágneses keverővel végeztünk enzimkinyerést. Az ultrahanggal végzett méréseket 40-60-80 % amplitúdó értéken végeztük, az előző szakaszban leírtakhoz hasonlóan.

Az extrakciót először FPA-mérésen keresztül követtük. A 14. ábrán látható, hogy az ultrahang amplitúdójának növelése jelentős mértékben növeli az oldatba került celluláz enzimek mennyiségét. 60 perc elteltével a kontroll mérésnél 0,43 FPU/ml-t mértünk, míg 40% amplitúdón 0,58 FPU/ml-t, 60 % amplitúdón 0,65 FPU/ml-t, 80 % amplitúdón pedig 1,03 FPU/ml-t. A 80 % amplitúdón végzett kezelés 240 %-os növekedést eredményezett a szűrőpapír lebontó képességben.



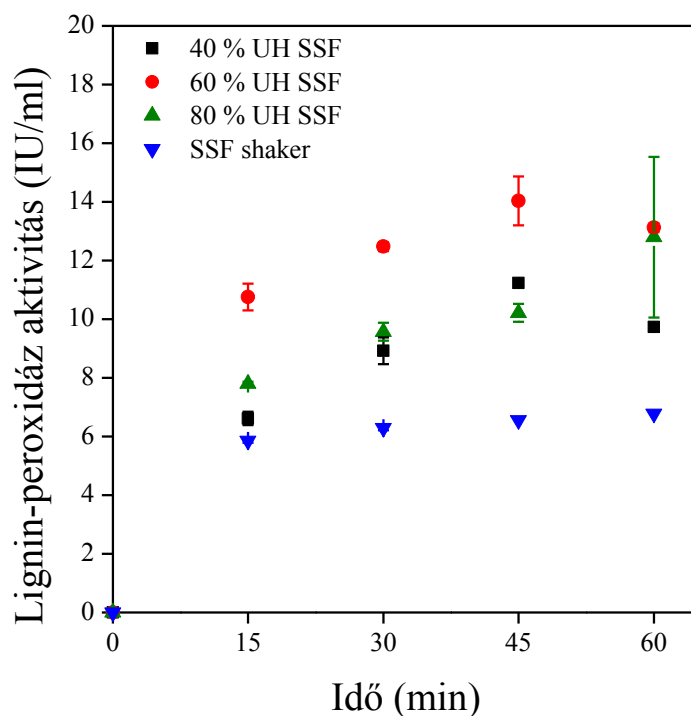
14. ábra: Szűrőpapír lebontó aktivitás. Az ultrahang amplitúdójának hatása az extrakció eredményességére

A lakkáz kinyerésének eredményei a 15. ábrán láthatók. Az ultrahanggal végzett kinyerés nagyságrendi növekedést hozott a kontrollhoz képest (1,64 IU/ml 60 perc után). 40% amplitúdón 7,88 IU/ml-re, 60 % amplitúdón 15,05 IU/ml-re nőtt a lakkáz aktivitás, míg 80 % amplitúdón 45 perc után mértük a maximális értéket, amely 12,19 IU/ml volt. Látható, hogy a 80 % amplitúdó érték a kinyerésben korlátozottan alkalmazható, hiszen a felülűzők kezelésénél is 20 %-os aktivitás csökkenést eredményezett. Tehát a legnagyobb hatékonyságnövekedést 60 % amplitúdón értem el.



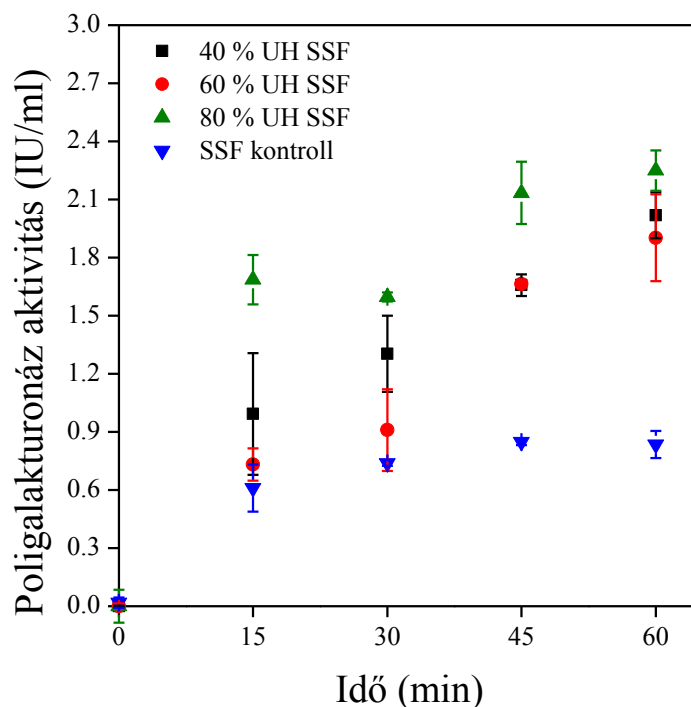
15. ábra: Lakkáz aktivitás. Az ultrahang amplitúdójának hatása az extrakció eredményességére

A lignin-peroxidáz aktivitásméréséhez kapcsolódó eredmények a 16. ábrán láthatók. A telítési görbére jellemző tendencia alakult ki az enzimkinyerés során. A kevert kontroll esetében 15 perc után jelentősen megnő a LiP aktivitás, azonban ez nem tud tovább emelkedni jelentősen. A mágneses kevertetéssel a szilárd SSF gumók/golyók nem esnek szét, így a kinyerés hatékonysága is alacsony. Míg az ultrahang az extrakció során az összeállt SSF gumókat szétveri és szálakra szedi, így az enzimek oldatba kerülése jelentősen javul.



16. ábra: Lignin-peroxidáz aktivitás. Az ultrahang amplitúdójának hatása az extrakció eredményességére

Végül pedig a poligalakturonáz enzim kinyerésének eredményeit szeretném bemutatni a 17. ábrán keresztül. A kontroll mérés egy telítésbe hajló görbét ad, az aktivitás folyamatosan nő 45 percig, majd stagnál 0,83 IU/ml aktivitás értéken. Szonikálás hatására meredeken nő a kinyert enzim aktivitás. Az amplitúdó emelésével egyre gyorsabban kerül oldatba a poligalakturonáz és válik mérhetővé. Az extrakció hatékonyságát jelentősen javítja az ultrahang. 60 perc kezelést követően közel hasonló PGU aktivitás mérhető mindhárom amplitúdón, 1,9-2,2 IU/ml, ami 2,5-szeres aktivitásnövekedést jelent.



17. ábra: Az ultrahanggal végzett extrakció hatása a polilakturonáz aktivitásra

Az extrakció értékelésének összegzéseként kijelenthetjük, hogy a kisfrekvenciás ultrahang rendkívül jelentős mértékben javítja az extrakciós hatékonyságot, a szilárd fázisú fermentációs mintákból az enzimek kinyerhetőségét. Mind a négy vizsgált enzimaktivitás esetében 2-3-szoros aktivitást mértem 60 perc kezelést követően, míg a lakkáznál nagyságrendi növekedést eredményezett a szonikálás.

3.3.4. Biofehérítés

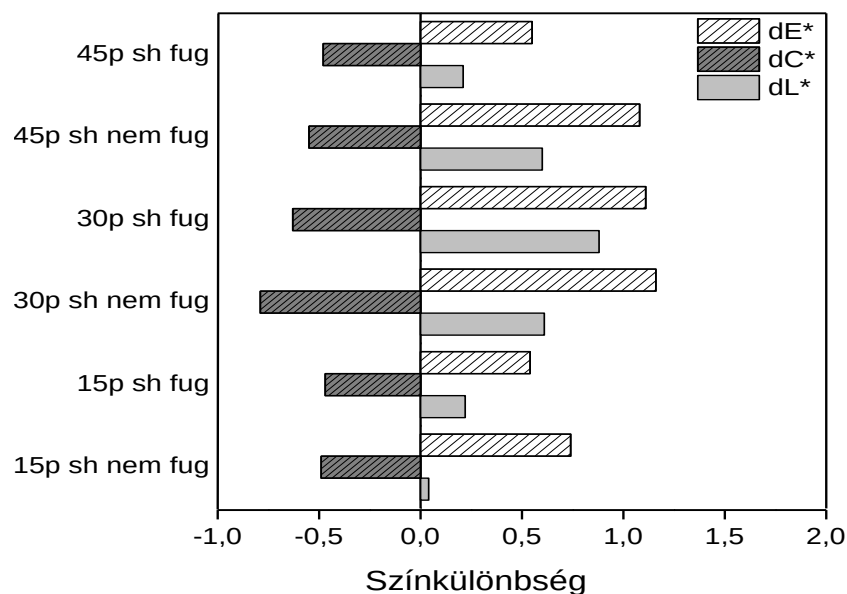
Textilipari felhasználás szempontjából korábban főleg hidrolitikus enzimeket vizsgáltak, és alkalmaznak, mint pl. a farmerkoptatásra vagy pillingesedés gátlására (bolyhok eltávolítása) cellulázokat, vagy a viaszréteg eltávolítására pektináz enzimeket. Az utóbbi időben nagyobb kutatási érdeklődés irányul az oxidatív enzimek felhasználására, mivel sokféle reakciót katalizálhatnak. Az oxidatív enzimek előállítása nagyon költséges, ezért laboratóriumi körülmények között leggyakrabban sült és szilárd fázisú fermentációval állíthatják elő. Fontos lenne a cellulóz alapú szálanyagok előkészítésében a fehérítési lépést enzimes technológiára cserélni. Ehhez oxidatív enzimekre van szükség, amelyek az aromás gyűrűket tartalmazó lignin és más színes vegyületek degradációját katalizálják. A lignint bontó enzimek előállítására a *Phanerochaete* törzsek a legalkalmasabbak, de más törzsek, mint pl. az *Aspergillus* is képesek erre. A színyanyagok eltávolításában a legnagyobb szerepet a lakkáz és a peroxidáz enzimek töltik be.

Az általunk termeltetett oxidatív enzimek biofehérítő hatását különböző ideig, rázó termosztáttal (shaker, sh. rövidítve) és ultrahanggal végzett előextrakciót követően vizsgáltuk. Az előextrakció célja az volt, hogy a szövet már egy nagyobb enzimkoncentrációjú oldatba kerüljön. Az előextrahált SSF szuszpenziókat kétfelé osztva centrifugált felülúszóval és szilárd SSF-et is tartalmazó szuszpenzióval párhuzamosan biofehérítést végeztünk.

Vizsgáltuk, hogy van-e különbség az extrakciós időn kívül a centrifugált enzimoldat ill. a szuszpenzió fehérítő hatásában. 15, 30 és 45 percig végeztünk előextrakciót. A 60 perces előextrakciót elhagytam, mivel az extrakció során tapasztalt lignin-peroxidáz aktivitása lecsökkent az ultrahang hatására (12. ábra). A lignin-peroxidáz enzim a legfontosabb a len elszíntelenítésében, ezért a maximális elérhető enzimaktivitásra és kinyerésre törekedtem.

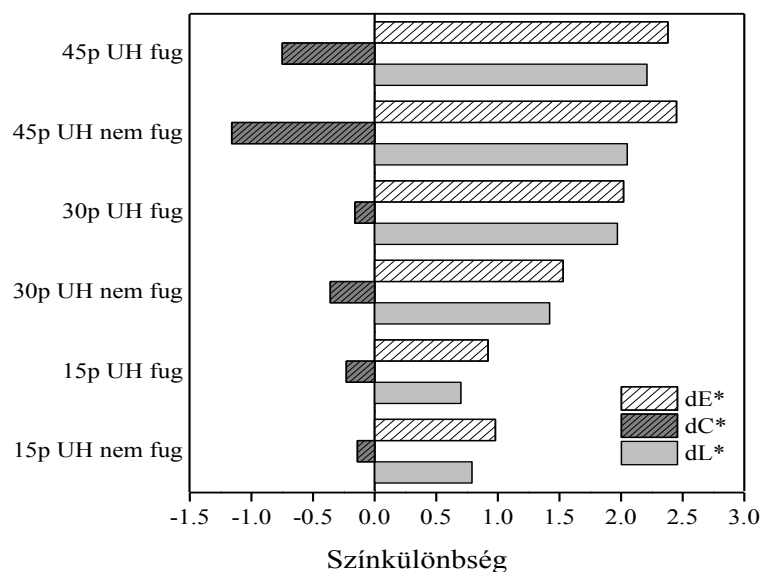
A 18. ábrán látható a shakerrel végzett extrakciót követő fehérítés eredménye.

Látható, hogy az extrakciós idő növelésével jelentős a kiindulási szövethez viszonyított színváltozás. A színkülönbség szemmel is jól látható, hiszen az értéke lényegesen meghaladja a $\Delta E^* > 0,5$. A centrifugált mintákkal végzett kezelés fehérítő hatása elmarad a szuszpenzióval kezelt szövetek fehérítésétől. A színkülönbség egyes komponenseit vizsgálva megállapítható, hogy jelentős a világosodás, hiszen a ΔL^* folyamatosan nő az extrakció idejével. A 45 perces centrifugált minta eredménye mérési hibára utal. Jelentős az elszíntelenedés is, de a mértéke (ΔC^*) az extrakció idejétől független, $-0,5$ és $-0,7$ közt változik.



18. ábra: Rázó termosztáttal végzett előextrakciót követő fehérítés eredménye

Az alábbi ábrán pedig az ultrahanggal extrahált minták fehérítési eredményessége látható (19. ábra). Ultrahanggal kezelt szuszpenzióknál nincs különbség a centrifugált felülúszó ill. a szuszpenzió fehérítő hatása közt. Elmondható, hogy a shakeres extrakcióhoz képest jelentősebb színváltozást tapasztaltam. Ultrahanggal az össz-színváltozás 45 perc után $\Delta E^* = 2,45$ -ös értéket éri el, amely több, mint kétszerese a shakerben végzett extrakciós mintához képest ($\Delta E^* = 1,08$). Jól látszik az oszlopdiagramon, hogy az extrakció idejének növelésével nagy mértékben megnő a színváltozás, továbbá a világosodás mértéke is (ΔL^*). Az elszíntelenedés csak a 45 perces ultrahangos extrakciónál kiemelkedő érték ($\Delta C^* = -1,16$) a shakertől eltérően.



19. ábra: Ultrahanggal végzett előextrakciót követő fehérités eredménye

Láthattuk, hogy a kisméretű ultrahanggal segített SSF extrakció, majd a kezelt szuszpenziókkal végzett fehérités eredményessége nagymértékben javul az ultrahangkezelés idejének növelésével. Jelentős színváltozást és világosodást tapasztaltam, míg az elszíntelenedés a shakerben végzett extrakciós mintáknál nagyobb mértékben jelentkezett.

A shakerrel végzett előextrakciónál a nem centrifugált szuszpenzió fehéritő hatása bizonyult jobbnak, mivel valószínűleg az SSF szubsztrátból még a fehérités során is folyamatosan a kioldódó enzimek hozzájárulnak a jobb fehéritéshez.

Az ultrahanggal végzett előextrakciónál nem tapasztaltunk különbséget a centrifugált és szűretlen szuszpenzióval végzett fehérités közt. Ennek hátterében az állhat, hogy az ultrahanggal kioldódó enzimek mennyisége 2-3-szoros, így eleve jelentősebb fehéritő hatást fejt ki a centrifugált minta is. Ultrahanggal az elszíntelenedés mértéke mégsem éri el a kontroll eredményeit, mivel valószínűleg az előextrahált és nagyon finom porrá tört SSF anyag szuszpenziójából a felületre visszarakódnak színes részek, amelyek a fehéritő hatást mérséklék. Az SSF anyaggal végzett fehéritésnél tehát két ellentétes hatás érvényesül, a nagyobb fehéritő hatás és a szilárd szuszpenzióból a felületre visszarakódó finom por hatása, amely rontja a fehérséget.

4. Összefoglalás

Tudományos diákköri munkám során a BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karának Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszékén folyó kutatásokba kapcsolódtam be. A korábbi tanszéki kísérletekben szilárdfázisú fermentációval len szubsztráton állítottak elő hidrolitikus és oxidatív enzimeket. Az egyik legjobb enzimtermelőnek az *Aspergillus oryzae* NRRL 3485 törzs bizonyult. Kutatómunkámban ezzel a törzsszel dolgoztam. Vizsgáltam a szilárdfázisú fermentációval len szénforráson előállított fermentumokból a nyers enzimkeverékek extrakcióját és az extrakció fokozását kismeghajtású ultrahang alkalmazásával. Jellemeztem az ultrahang enzimaktivitásra gyakorolt hatását. Vizsgáltam az extrahált enzimdáták és közvetlenül a szilárd fermentumok eredményességét nyers lencsövet biofehérítésében.

Kutatómunkám első szakaszában extrahált felülszókkaal végeztem kísérleteket az ultrahang enzimaktivitásra gyakorolt degradációs hatásának vizsgálatára. Az eredmények alapján arra a megállapításra jutottam, hogy az ultrahangos kezelés nem csökkentette számottevő mértékben a szűrőpapír lebontó és lakkáz aktivitásokat. A lignin-peroxidáz és poligalakturonáz aktivitások 45 perces 80 % amplitúdón végzett ultrahangos kezelést követően közel 20 %-kal csökkentek.

Munkám második szakaszában az extrakció hatékonyságát vizsgáltam szilárd SSF minták ultrahangos kezelésével. Az eredmények azt bizonyítják, hogy a szűrőpapír lebontó aktivitás, a lignin peroxidáz és a poligalakturonáz aktivitás a 80 % amplitúdón végzett ultrahangos kezelés következtében közel 2,5-szeresére nő. A lakkáz enzimek esetén még ennél is nagyobb aktivitás növekedést tapasztaltam.

A biofehérítési kísérletekben kismeghajtású ultrahanggal és rázó termosztáttal előextrahált SSF szuszpenziók fehérítő hatását vizsgáltam. Az ultrahangos előextrakció eredményesebbnek bizonyult, mint a hagyományos shaker-ben végzett extrakció és jelentősebb elszíntelenedést és világosodást okozott a lencsövek kezelése során

Mérési eredményeim alapján tehát elmondható, hogy sikeresen alkalmaztam a kismeghajtású ultrahangot szilárd fázisú fermentumból történő enzimek kinyerésére, valamint a nyers lencsövet biofehérítésére. Az eredmények azt mutatták, hogy SSF mintákból a nyers enzimkeverékek kinyerése jó határfokkal megvalósítható, valamint a biofehérítés során is eredményesen alkalmazható.

5. Irodalomjegyzék

Beck, Erdész, Harcheschi. - A rostkikészítés technológiája (Kiegészítés a Háncsrostok technológiája c. tankönyvhöz), Műszaki Könyvkiadó, Budapest (1991)

Boon, Gerard K. – Technology transfer in fibres, textile and apparel, Sijthoff&Noordhoff, Alphenaan den Rijn, The Netherlands, Rockville, Maryland, USA (1981)

Chandra, M.S., Reddy, B.R., Choi, Y-L. - Optimization of extraction of Fpase from the fermented bran of *Aspergillus niger* in solid state fermentation, *Journal of Applied Biological Chemistry*, **51**(4), 155-159 (2008)

Christopher, L., Bissoon, S., Singh, S., Szendefy, J., Szakacs, G. - Bleach-enhancing abilities of *Thermomyces lanuginosus* xylanases produced by solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **40**, 3230–3235 (2005)

Csiszár, E., Szakács, Gy., Koczka, B. - Biopreparation of cotton fabric with enzymes produced by solid-state fermentation, *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1765-1771 (2007)

Csiszár, E., Szakács, Gy., Koczka, B. - Effect of hydrolytic and oxidative enzymes produced by solid-state fermentation on greige linen fabric, *Biocatalysis and Biotransformation*, **26** (5) 422-429 (2008)

Daljit, S. Arora, Paramjit, K. Gill. A. - Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, **28**, 602-605 (2001)

Datta, A., Bettermann, A., Kirk, K.- Dentification of a specific manganase peroxidase among lignolytic enzymes secreted by *Phanerochaete cryosporium* during wood decay, *Applied and Environmental Microbiology*, 1453-1460, May (1991)

de Souza-Cruz, P.B., Freer J. Siika-Aho, M. Ferraz, A. - Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during biopulping of *Pinustaeda* wood chips. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, 228–234 (2004)

Ghose, T.K. - Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, **59**, 257-268 (1987)

Grönqvist, S, Suurnakki, A., Niku-Paavola, M. L., Kruus, K., Buchert, J., Viikari, L. - Lignocellulose processing with oxidative enzymes, Applications of Enzymes to Lignocellulosics, *ACS Symposium Series*, Eds.: Mansfield, S. D., Saddler, J. N., **855**, 46-65 (2003)

Frányó I., Tóth J.- Len- kenderipari szövés technológia, Műszaki könyvkiadó, Budapest, (1984)

Ikasari, L., Mitchell, D.A. - Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation, *Enzyme and Microbial Technology*, **19**, 171-175 (1996)

Jedlicka, R. - Textilipari anyagismeret OOK-Press, Budapest (1993)

Kapich, A.N, Prior B.A., Both, A., Galkin, S., Lundell, T., Hattakka, A. - Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-466. *Enzyme Microbial Technology*, **34**, 187–95 (2004)

Kuhad, R. C. et al. - Microorganisms and Enzymes Involved in the degradation of Plant Fiber Cell Walls, *Advanced in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **57**, 45-125 (1997)

Leighton, T. G. - The Acoustic Bubble, Elsevier, (1994)

Leisola, M.S.A., Thanei-Wyss, U., Fiechter, A. - Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, **3**, 97–107 (1985)

Liang, Y., Pan, L., Lin, Y. - Analysis of extracellular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce koji. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **73**, 192-5 (2009)

Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., – Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, **43**, 1157-61 (2005)

Margulis, M. A. - Sonochemistry and Cavitation, Gordon, Ycerdon, Langhorne (1993)

Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A. - Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review, *Biotechnology Advances*, **29**, 365–373 (2011)

Mason, T. J. – Sonochemistry. Oxford University Press (1999)

Sakthiselvan, P., Naveena, B., Partha, N. - Effect of medium composition and ultrasonication on xylanase production by *Trichoderma harzianum* MTCC 4358 on novel substrate. *African Journal of Biotechnology*, **11**, 12067-12077 (2012)

Scherer, M., Fischer, R., Molecular characterization of blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*, *FEMS Microbiology*, 207–213 (2001)

Singh, S.A., Ramakrishna, M., Appu Rao, A.G. - Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius* *Process Biochemistry*, **35**, 411–417 (1999)

Suslick, K.S., Rooney, J.A. - Ultrasound, Its Chemical, Physical and Biological Effects, VCH, New York, Weinheim (1988)

Szabó, O.E., Csiszár, E., Tóth, K., Szakács, G., Koczka, B. - Ultrasound-assisted extraction and characterization of hydrolytic and oxidative enzymes produced by solid-state fermentation and their use in biopreparation of linen (benyújtott) (2013)

Szabó, O. E., E. Csiszár, The Effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme, *Carbohydrate Polymers* **98** 1483-1489 (2013)

Szakács-Dobozi, M., Szakács, Gy. Bruschi, C.V. - Xylanase activity of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 3466-3471 (1992)

Pandey, A., Sevakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P. - Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, **77**, 149-162 (1999)

Papinutti, C. L.A., Diorio, C. F. Forchiassin - Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **30**, 157–160 (2003)

Pedrolli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, E., Carmona, E.C. - Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, **3**, 9-18 (2009)

Puchart, V., Katapodis, P., Biely, P., Kremnický, L., Christakopoulos, P., Vrsanská, M., Kekos, D., Macris, B J., Bhat, M.K. - Production of xylanase, mannanase and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginous*. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 355-361 (1999)

Rusznák István - Textilkémia I-II. Tankönyvkiadó, Budapest (1988)

Taherzadeh, M.J., Karimi, K. - Pretreatment of Lignocellulosic Waste to Improve Ethanol and Biogas Production: a review, *International Journal of Molecular Sciences*, **9**, 1621-1651 (2008)

Tengerdy, R.P. - Cellulase production by solid substrate fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research*, **55**, 313-316 (1996)

Tengerdy, R.P., Szakács Gy. - Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering. Journal*, **3644**, 1-11 (2002)

Mason, T.J., Peters, D. – Practical Sonochemistry: Power Ultrasound Uses and Applications, Horwood Publishing (2003)

Török, B., Molnár, Á. – Kémiai átalakulások mikrohullámú és szonokémiai aktiválással. A kémia újabb eredményei, 82. kötet, Akadémiai Kiadó, Budapest (1996)

Tzanov, T., Basto, C., Guebitz, G., Cavaco-Paulo, A. – Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching in cotton. *Macromolecular Materials and Engineering*, **288**, 807 (2003)

Wood, R.W., Loomis, L.L.- The physical and biological effects of high-frequency sound-waves of great intensity. *Nature*, **121**, 622-624 (1927)

Wood, W.A., Kellogg, S.T. - Methods in Enzymology Vol 161, Biomass, Part B, Lignin, Pectin and Chitin, Academic Press, Inc. (1988)