



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

Kukoricarost biofinomító szemléletű feldolgozása

DIPLOMAMUNKA

Készítette: Gázsó Zita
MSc. biomérnök hallgató

Témavezető: Dr. Barta Zsolt
egyetemi adjunktus
Konzulens: Fehér Csaba
doktoráns hallgató

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Budapest, 2014

Köszönetnyilvánítás

Ezúttal szeretném megköszönni Dr. Barta Zsoltnak és Dr. Réczey Istvánnénak, hogy együtt dolgozhattam csoportjukkal, bármikor kérdezhettem tőlük és mindig bölcs tanáccsal láttak el.

Köszönettel tartozom konzulensemnek, Fehér Csabának munkám irányításáért, a türelméért és bátorításáért, mellyel nagyban segítette az előrehaladásomat, valamint azért, mert minden helyzetben segített megoldani a felmerülő szakmai problémákat.

Köszönettel tartozom Fehér Anikónak, amiért bármikor fordulhattam hozzá tanácsért, mindig segítőkészen fogadott.

Köszönet illeti továbbá a családomat, akik végig mellettem álltak és támogattak.

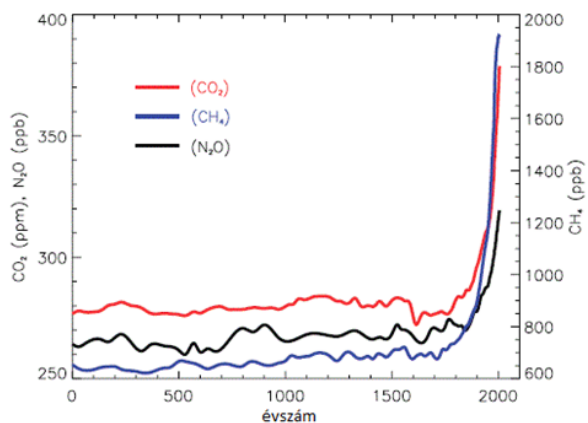
Tartalom

1. Bevezetés	5
2.. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1. Lignocellulóz alapú biomassa	7
2.1.1. A lignocellulóz felépítése	8
2.1.1.1. A cellulóz.....	8
2.1.1.2. A hemicellulóz.....	8
2.1.1.3. A lignin	9
2.1.2. A lignocellulóz alapú biomassa hasznosítása.....	9
2.2. Biofinomítás	10
2.3. A kukorica	12
2.3.1. A kukorica termesztése	12
2.3.2. A kukoricaszem	12
2.3.3. A kukoricaszem feldolgozása	13
2.3.4. A kukoricarost összetétele	14
2.3.5. A kukoricarost frakcionálása	14
2.3.5.1. A kukoricarost híg kénsavval történő kezelése	14
2.4. Az arabinóz és a xilóz.....	15
2.4.1. Arabinóz	15
2.4.2. Xilóz	16
2.5. A xilit.....	16
2.5.1. Xilitelőállítás.....	17
2.5.1.1. Xilitelőállítás kémiai úton.....	17
2.5.1.2. Xilitelőállítás biológiai úton	18
2.5.1.2.1. A xilózhasonosítás folyamata élesztőkben.....	18
2.5.1.2.2. A biológiai úton történő xilitelőállítást befolyásoló tényezők	19
2.5.1.2.2.1. Oxigénellátottság	19
2.5.1.2.2.3. Egyéb cukrok jelenléte a xilóz mellett a fermentációban	20
2.5.1.2.2.4. A sejtkoncentráció hatása	20
2.5.1.2.2.5. Ritka cukrok hasznosítása.....	21
2.5.1.2.2.6. Kofaktorok hatása	21
2.5.1.3. Lignocellulóz-hidrolizátumok felhasználása xilitfermentációra	22
2.5.2. Arabinózelőállítás	23
3. Célkitűzések	26
4. Anyagok és módszerek	27
4.1. Felhasznált anyagok.....	27
4.2. Felhasznált berendezések.....	27
4.3. Alkalmazott módszerek	28
4.3.1. A szárazanyag tartalom meghatározása	28
4.3.2. A folyadékkromatográfiás vizsgálat	28
4.3.3. A nyersanyagelemzés lépései	28

4.3.3.1. A keményítőtartalom meghatározása	28
4.3.3.2. A szénhidráttartalom meghatározása módosított Hågglund módszerrel [44]	28
4.3.4. A kukoricarost keményítőmentesítése	29
4.3.5. Oligomerek kénsavas hidrolízise monomerekké (utósavazás).....	29
4.3.6. A kukoricarost kénsavas kezelése 90, 120 és 140°C-on	29
4.3.7. Sejtszaporítás (inokulum készítés) 30 g/l cukoroldaton (glükóz-/xilózoldat).....	29
4.3.8. A sejtkoncentráció meghatározása.....	30
4.3.9. Sejttömeg-kalibráció.....	30
4.3.10. Biotisztítás modellszubsztrát-oldaton	30
4.3.11. Biotisztítás kukoricarost-hidrolizátumon <i>Candida boidinii</i> sejtekkel.....	30
4.3.12. Xilitfermentáció <i>Candida boidinii</i> sejtekkel.....	31
4.3.13. Xilitfermentáció <i>Candida boidinii</i> sejtekkel kukoricarost-hidrolizátumon	31
4.3.14. Összes fenolos komponens meghatározása Folin & Ciocalteu's reagenssel.....	32
5. Eredmények és értékelésük	33
5.1. Nyersanyag szénhidrát tartalmának meghatározása.....	33
5.2. A kukoricarost keményítőmentesítése	33
5.3. A kukoricarost kénsavas kezelése.....	34
5.3.1. A kukoricarost kénsavas kezelése 90°C-on	36
5.3.2. A sejtkoncentráció számítása.....	38
5.3.3. Biotisztítás xilóz- és arabinóztartalmú tápoldaton	38
5.3.4. Biotisztítás xilóz-, arabinóz-, és galaktóztartalmú tápoldaton	39
5.3.5. Kukoricarost-hidrolizátum biotisztítása <i>Candida boidinii</i> -vel.....	40
5.3.6. Mosott sejtes xilitfermentáció <i>C. boidinii</i> -vel modellszubsztrát-oldaton	42
5.3.6.1. A levegőztetés és pH hatása.....	44
5.3.6.2. A megnövelt kiindulási sejtkoncentráció hatása	45
5.3.6.3. A megnövelt kiindulási xilózkoncentráció hatása.....	46
5.3.6.4. A megnövelt kiindulási sejt- és xilózkoncentráció együttes hatása	47
5.3.6.5. A hozzáadott metil-alkohol és glicerín hatása	47
5.3.7. Xilitfermentáció kukoricarost-hidrolizátumon <i>C. boidinii</i> -vel	50
5.3.8. Xilitfermentáció betöményített kukoricarost-hidrolizátumon <i>C. boidinii</i> -vel.....	52
5.3.9. Xilitfermentáció kukoricarost-hidrolizátumon felszaporított <i>C. boidinii</i> sejtekkel	53
6. Összefoglalás	55
7. Irodalomjegyzék.....	59
8. Függelék.....	62

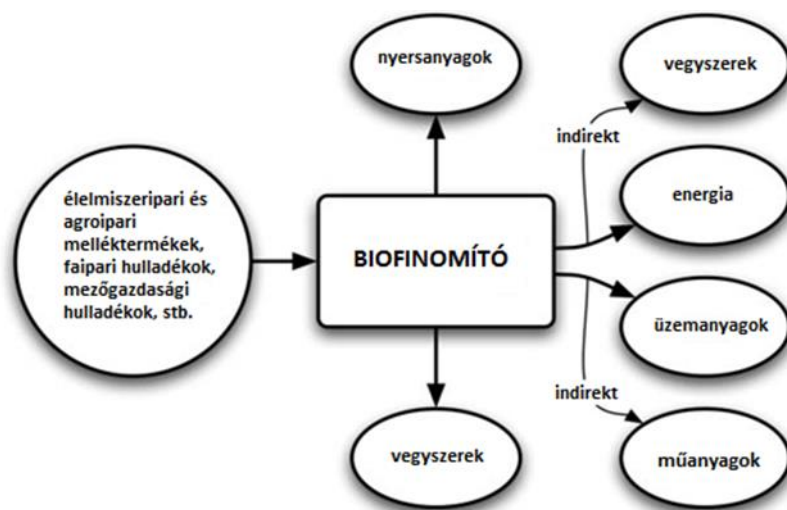
1. Bevezetés

A XXI. század egyik legnagyobb gazdasági kihívása az energiabiztonság biztosítása. Az emberiség energiaigénye folyamatosan növekszik, az ismert kőolajkészletek pedig végesek, így fontos feladat gazdaságos alternatívák keresése. Az IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change, azaz az éghajlatváltozással foglalkozó kormányközi testület) szakértői szerint a levegő földközeli átlaghőmérsékletének növekedését (1.1. ábra) egyértelműen a XIX. század közepe óta légkörbe juttatott üvegházhatású gázok okozzák [1]. Az Európai Bizottság erre irányuló programja szerint 2020-ig a közlekedési szektorban használt hagyományos üzemanyagok 20%-át alternatív üzemanyagokkal fogják helyettesíteni [2]. További problémát jelent, hogy a fosszilis erőforrások földrajzi eloszlása nagyon egyenetlen, ami számos politikai és gazdasági konfliktus forrása [3].



1.1. ábra: Üvegházhatású gázok légköri koncentrációja (IPCC)

Ezen okokból kifolyólag szükségessé vált fenntartható, környezetbarát, ugyanakkor gazdaságos technológiák kifejlesztése és ezek alkalmazása – akár a korábbiakkal kombinálva, akár azokat teljes mértékben helyettesítve. A fosszilis energiahordozók kiváltására számos lehetőség van, ilyenek például az atomenergia vagy a megújuló energiaforrások (nap, víz, szél, geotermikus energia, biomassza). A jelentős kőolaj kitermelés hatására kiépült a petrokémiai ipar, mely lehetővé tette egyszerű, és ezekből bonyolultabb anyagok – műanyagok, vegyipari alapanyagok, stb. – előállítását különböző iparágak számára. Ezen anyagok termelésére szintén alternatív megoldások szükségesek. Ilyen alternatíva például a biofinomítás. A biofinomító egy integrált átalakító egységnek tekinthető, mely különböző eredetű és összetételű biológiai alapanyagokból képes hasznos termékeket – energiát, vegyszereket, műanyagokat, üzemanyagokat – előállítani (1.2. ábra).



1.2. ábra: Integrált biofinomító felhasználási lehetőségei [4]

A kukorica termelése és feldolgozása során nagy mennyiségű melléktermék keletkezik, melynek csak kis részét használják fel, főként takarmányozási célra – körülbelül 6%-ot [5]. Ezen melléktermékek közé tartozik a kukoricarost is, melynek xilóz- és arabinóztartalma jelentős. Amennyiben a xilózt és arabinózt megfelelő technológiával szelektíven képesek vagyunk kinyerni a rostból, értékes termékekre tehetünk szert. A xilóz legjelentősebb felhasználási területe az élelmiszeripar: egy gyakori édesítőszer, a xilit gyártásának alapanyaga. Az arabinózt számos területen felhasználják: az élelmiszeripar egyik fontos édesítőszere, fontos vegyipari alapanyag, számos bioaktív anyag, például antibiotikumok prekursora, valamint mikroorganizmusok azonosítására is alkalmas [6].

A xilit egyike napjaink legfontosabb vegyületeinek. Elterjedt édesítőszer, melyet cukorbetegség is fogyaszthatnak, ezen kívül számos biológiai anyag prekursora. A xilitermelés első lépéseként lignocellulózok hidrolízisével xilózt állítanak elő. Az így nyert xilóz xilitté redukálása történhet kémiai vagy biológiai úton. A kémiai módszer hátránya, hogy a xilózt tartalmazó hidrolizátumot több lépésben tisztítani kell, mert a hidrogénezéshez csak nagytisztaságú xilózoldatot használható. A tisztítási lépések jelentősen megnövelik a technológia költségeit [7]. A biológiai redukció történhet élesztők segítségével. Erre alkalmas élesztők például a *Candida* nemzetség tagjai. A módszer előnyei közül a legfontosabbak, hogy nem igényel tiszta xilózoldatot, így megfelelő hozam elérése esetén gazdaságosabb lehet, mint a kémiai redukció [7].

2.. Irodalmi áttekintés

2.1. Lignocellulóz alapú biomassa

Biomassa alatt a természetes körforgásban résztvevő – a növényeket, állatokat és mikroorganizmusokat felépítő – összes szerves anyagot értjük. Ezek közül a legnagyobb mértékben a növényi biomasszát hasznosítjuk, mely alapvetően szén-dioxidból, vízből és ásványi sókból keletkezik, energiaforrásként napfényt használva. Képződése közben „melléktermékként” oxigén szabadul fel. A Földön évente 170-200 milliárd tonna növényi biomassa szárazanyag keletkezik, melynek jelenleg 3%-át – körülbelül 6 milliárd tonnát – hasznosítanak [5]. A növényi biomassa legnagyobb része lignocellulóz. A jelenleg hasznosított növényi biomassa eredete alapján háromféle lehet: mezőgazdasági és erdészeti termék, ipari melléktermék, valamint faipari, mezőgazdasági hulladék [8].

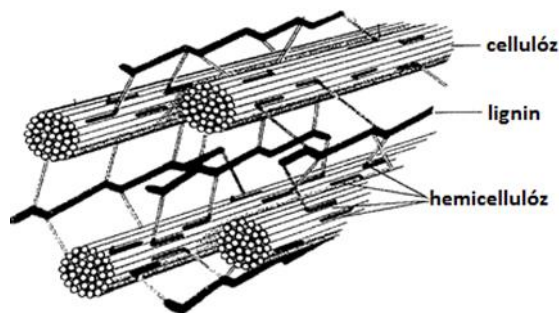
A biomassa a megújuló energiaforrások közé tartozik – a nap-, víz-, és szélenergia mellett –, ugyanakkor a megújulók közül egyedül a biomassa kimeríthető. Energetikai célú hasznosítása régóta ismert és alkalmazott lehetőség, habár a nagy energiasűrűségű fosszilis energiahordozók háttérbe szorították. A biomassa számtalan formában előfordul, így felhasználása széleskörű. A széleskörű felhasználási lehetőségek miatt sokféle feldolgozó technológia kialakult. A biomassa alapvetően kétféleképpen hasznosítható: az egyik lehetőség a teljes, kezeletlen biomassa elégetése vagy elgázosítása, a másik lehetőség a biomassa különböző alkotóira bontása, majd a kapott frakciók külön-külön történő hasznosítása [8].

A biomassa hasznosítása számos előnnyel jár. Az alapanyag olcsó, nagy mennyiségben áll rendelkezésre, és az energetikai célú hasznosításon kívül számos termék – vegyszerek, ipari nyersanyagok, műanyagok, stb. – előállítható belőle. Az alapanyag földrajzilag egyenletes eloszlása révén a fosszilis energiahordozóknál nagyobb mértékben járul hozzá a biztonságos energiaellátottsághoz azáltal, hogy kiküszöbölheti az energiahordozók importja általi nemzetközi konfliktusokat. Az energetikai célú hasznosításra termesztett biomassa (energiaültetvények) az egyéb célokra alkalmatlan – homokos, tápanyagszegény, száraz – termőföldek újfajta használatát biztosítja, ezáltal alternatív jövedelemforrást és lokális munkahelyeket teremt vidéken, elősegítve a regionális fejlődést. A vidéki tájra és a regionális infrastruktúrára is hatást gyakorol, valamint új műszaki fejlesztési lehetőségeket biztosít. Előnyei mellett a biomassa hasznosításnak hátrányos tulajdonságai is vannak. Ezek közül a legjelentősebb, hogy energiasűrűsége viszonylag kicsi, ugyanakkor a hasznosításhoz szükséges rendszerek kiépítése költséges [9].

2.1.1. A lignocellulóz felépítése

A lignocellulóz az egyik leggyakrabban előforduló szerves anyag a Földön, a növényi sejtfalak egyik építőeleme. Cellulózból, hemicellulózból és ligninből álló összetett szerkezet (2.1. ábra).

Pontos összetétele függ a növény fajtájától és eredetétől, valamint attól, hogy az adott sejtfal milyen növényi rész felépítésében vesz részt. A lignin a cellulózból és hemicellulózból felépülő rostokat kívülről tokként veszi körbe, ezáltal ellenálló képességet biztosít a szerkezetnek [5], [8].

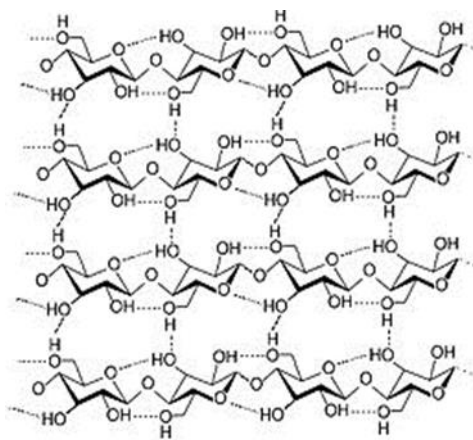


2.1. ábra: A lignocellulóz felépítése

2.1.1.1. A cellulóz

A cellulóz a természetben az egyik legelterjedtebb poliszacharid. β -D-glükóz-egységekből felépülő lineáris polimer, melyben a glükóz molekulák az energetikailag legkedvezőbb, szék konformációban, egymáshoz képest 180° -kal elforgatva kapcsolódnak össze β -1,4-es kötéssel (2.2. ábra). A cellulóz polimerizációs foka eredetétől függően 2000-20.000 között változhat.

A lineáris láncok között kialakuló hidrogén hidak és van der Waals kötések segítségével épül fel a cellulóz fibrilláris szerkezete. A cellulózrostok kristályos és kevésbé rendezett amorf részekből állnak, melyek váltakozva fordulnak elő. Rendkívüli stabilitása és mechanikai szilárdsága miatt hideg és forró vízben, híg savakban és híg lúgokban nem oldódik [5], [8].

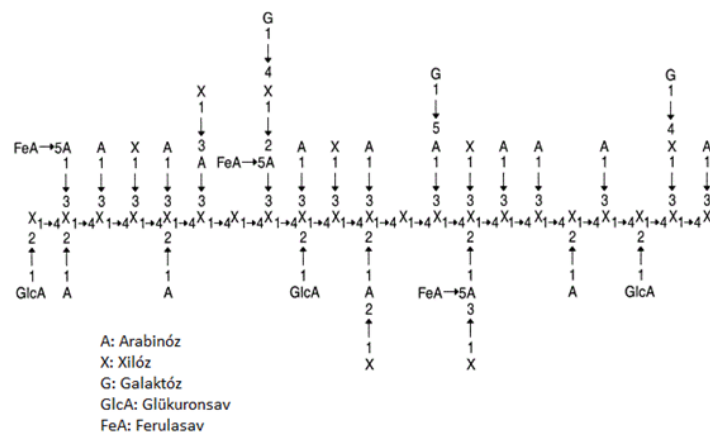


2.2. ábra: A cellulóz felépítése

2.1.1.2. A hemicellulóz

A hemicellulóz a lignocellulózokban a cellulóz rostokhoz hidrogén hidakkal, a ligninhez kovalens kötéssel kapcsolódik. Elágazó szerkezetű, heterogén polimer, mely pentózokból (arabinózból, xilózból), hexózokból (glükózból, galaktózból, mannózból), valamint cukorsavakból áll (2.3. ábra). Pontos összetétele eredetétől függően változik. Polimerizációs foka kisebb, mint a cellulózé, 200-300 közötti. Szerkezetét tekintve egy alapláncból és

elágazásokból áll. Az alaplánc általában homopolimer xilánlánc, melyben a xilózmolekulák β -1,4-kötéssel kapcsolódnak össze. A leágazó láncok a xilózon és arabinózon kívül tartalmazhatnak még glükuronsavat, glükuronsav-4-O-metil-étert, ecetsavat, stb. Vízen nem, savakban és lúgokban viszont a cellulóznál nagyobb mértékben oldódik – ez elsősorban lazább szerkezetének köszönhető. Az elágazó láncok érzékenyebbek a savas hidrolízissel szemben [5], [8].

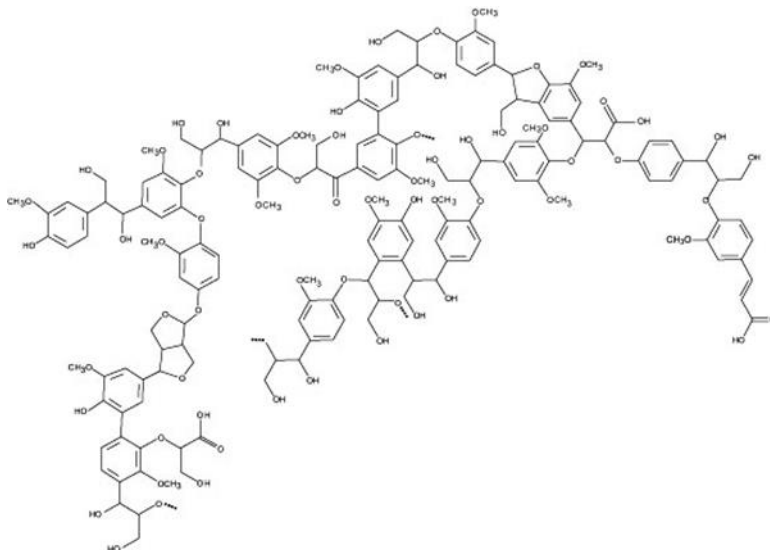


2.3. ábra: Xilán alapláncú hemicellulóz sematikus szerkezete

2.1.1.3. A lignin

A lignin egy háromdimenziós, fenolos hidroxi- és metoxicsoportokat tartalmazó, főként gvajakolból és fahéjalkoholból felépülő makromolekula (2.4. ábra).

A természetben előforduló egyik legellenállóbb anyag, ez biztosítja a lignocellulózok ellenállóságát. Körbeveszi, és így ellenállóvá teszi a cellulózból és hemicellulózból álló rostokat az enzimes bontással szemben. A sejtek falában lerakódva a sejtfal elfásodását okozza. Szerves oldószerekkel oldatba vihető [5].



2.4. ábra: A lignin felépítése

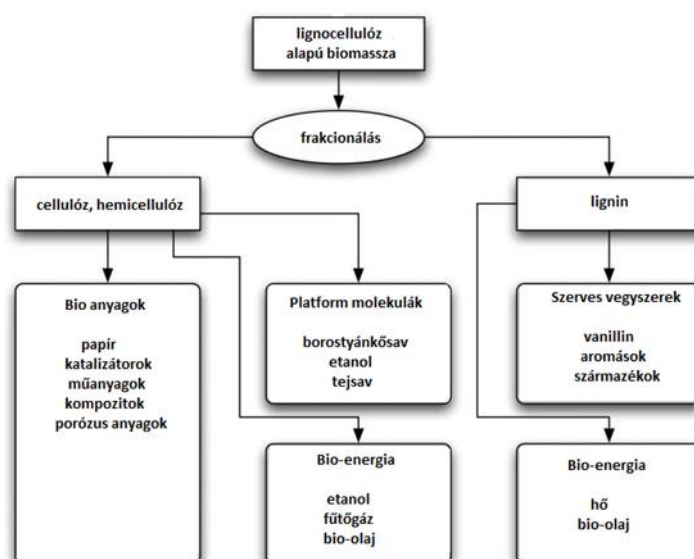
2.1.2. A lignocellulóz alapú biomassza hasznosítása

A lignocellulóz alapú biomassza – ahogyan az előző fejezetből is látszik – rendkívül komplex szerkezetű, melyben számos különböző molekula kapcsolódik össze különböző

kötéstípusokkal. Ennek az összetett szerkezetnek köszönhetően komoly kihívást jelent a feldolgozása, ugyanakkor az alkotóelemek széles skálája révén jelentős lehetőségeket rejt. A különböző frakciók hasznosítására a biofinomítás már számos alkalmazható technológiát szolgáltatott. A cellulóz legelterjedtebb felhasználása a bioetanol-előállítás, de ezen kívül elméletileg a szerves vegyipar összes terméke előállítható belőle. A hemicellulóz frakció szintén lehet etanol-előállítás alapanyaga, bár ez körülményesebb, mint a cellulóz alapú eljárás. Ezen kívül a hemicellulózt alkotó cukrok felhasználhatók élelmiszeripari adalékanyagként, valamint a pentózokból mosószer adalékok és szappanok állíthatók elő. A ligninfrakciót általában energianyerésre használják: vagy közvetlenül elégetik, vagy elgázosítják [8].

2.2. Biofinomítás

A biofinomítás több alapvetően kitűzött cél szempontjából is megfelelő alternatíva lehet a kőolaj-finomítás kiváltására. A három legfontosabb cél a környezetbarát technológiák alkalmazása, a megújuló energiaforrások felhasználása, valamint a hulladékhasznosítás. A biofinomító kifejezés az angol *biorefinery* szó tükörfordításából ered, és egy olyan integrált átalakító egységet jelent, mely különböző biológiai alapanyagokból képes hasznos termékeket előállítani. A felhasznált alapanyagok lehetnek élelmiszeripari és agroipari melléktermékek, faipari és mezőgazdasági hulladékok, stb. A biofinomító ezekből képes értéknövelt termékek, például energia, üzemanyagok, műanyagok, vegyipari alapanyagok előállítására (2.5. ábra).



2.5. ábra: A lignocellulóz alapú biomassa hasznosítása biofinomító üzemben [4]

A biofinomítás során számos tudomány terület ötvöződik, mint például a biomérnökség, polimerkémia, élelmiszertudományok, stb. A *biofinomító koncepció* a kőolaj-finomítás analógjaként alakult ki: ahogyan a kőolaj-finomításnál számos termék előállítható a nyersolaj feldolgozása során, úgy itt is számos termék előállítható a biomasszából. A biomassza feldolgozásában termokémiai, biokémiai, mechanikai/fizikai és kémiai folyamatok vesznek részt. A biofinomító koncepció egy új szemlélet, mely a fenntartható fejlődés alapját képezi. Teljes mértékben követi a zöld kémia alapelveit, miszerint a fenntartható fejlődés érdekében lehetőleg megújuló nyersanyagokat kell alkalmazni és ezeket hatékonyan kell felhasználni, ki kell küszöbölni a hulladékok keletkezését és el kell kerülni a mérgező és veszélyes reagensok, oldószerek használatát [10], [11].

A biofinomító magába foglalja a biomassza átalakítás folyamatait és eszközeit. A hasznosított alapanyag alapján két csoportra oszthatók a biofinomító üzemek: az egyik esetben erre a célra termesztett biomasszát hasznosítanak, a másik esetben pedig különböző iparágak (mezőgazdaság, faipar, élelmiszeripar, stb.) hulladékanyagait. A feldolgozás során nem keletkezik hulladék, mert ami az egyik folyamatnak hulladéka, az egy másik folyamatnak alapanyaga, ezáltal az összes folyamat összekapcsolódik egyetlen komplex egészet alkotva. A koncepció szerint a biofinomítónak gazdaságosan elő kell tudni állítani nagy mennyiségben a bio-üzemanyagokat, amelyekre a kereslet világviszonylatban is a legnagyobb; azokat az értékesebb termékeket, amelyekre a kereslet kisebb; valamint a működéséhez szükséges hő- és villamosenergiát [8].

Magyarországon a biofinomító üzemek számára nyersanyagként felhasználható biomassza tömeg legnagyobb részét a mezőgazdasági melléktermékek és hulladékok teszik ki, ezek közül is kiemelhető a kukorica feldolgozása során keletkező melléktermékek. A kukorica termesztése és feldolgozása során több melléktermék keletkezik, mint amennyi maga a termés.

2.3. A kukorica

A kukorica (*Zea mais*, 2.6. ábra) a C4-es növények csoportjába tartozik. A C4 jelző a fotoszintézis sötét szakaszának Calvin-ciklustól eltérő formájára utal, mely elsősorban trópusi növényekre, köztük a cukornádra és a kukoricára jellemző. A C4-es út energiaigényesebb a Calvin-ciklusnál, így a kukorica kiemelkedően sok napenergia megkötésére képes.



2.6. ábra: Kukorica
(*Zea mais*)

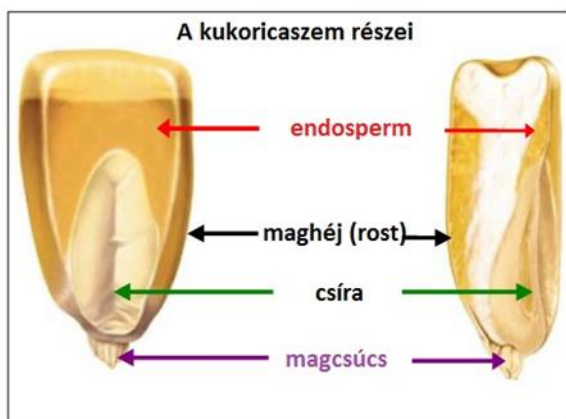
2.3.1. A kukorica termesztése

Magyarországon a kukoricatermesztés és felhasználás hosszú múltra tekint vissza. A közel állandó vetésterület ellenére, az öntözőrendszer hiánya miatt a kukoricatermés mennyisége jelentősen, 4-9 millió tonna között ingadozik évente, ugyanakkor biztos felvevőpiaca csak körülbelül 4 millió tonnának van [5]. A kukoricatermesztés során megmaradó (és kezelendő) termékek: a főlős kukoricatermés, valamint a kukorica levele és szára. A főlős kukorica mennyisége 1-5 millió tonna között változik évente [5], ennek legjelentősebb felhasználási területe a bioetanolgyártás. Kukoricaszárból évente körülbelül 11 millió tonna keletkezik [5], ezt a kombájnok a levelekkel együtt aprítva visszaszórják a szántóföldre, majd beleforgatják. Az így visszaszórt anyagok égetése környezetvédelmi okok miatt nem engedélyezett. A visszaszórt lignocellulózok azonban megnehezítik a földművelést, mert megváltoztatják a talaj szerkezetét, ezzel befolyásolva a vízháztartását és a művelés hatékonyságát. Egyetlen előnyük, hogy lebomlásuk révén hozzájárulnak a talaj szerves és ásványi anyag tartalmához. A szár és a levelek egyéb gazdaságos hasznosítása jelenleg még nem megoldott. A lignocellulóz alapú melléktermékek – mint az előbb említett kukoricaszár és levél – szintén lehetnek bioetanolgyártás alapanyagai, vagy – az üzemanyagokon kívül –, megfelelő technológiák esetén egyéb értékes termékeket nyerhetnénk belőlük biofinomító üzemekben [5].

2.3.2. A kukoricaszem

A kukoricaszem fő alkotórészei a magcsúcs, a maghéj, a csíra és az endosperm (2.7. ábra). A csíra a mag azon inaktív része, amely megfelelő környezeti hatások esetén fejlődésnek indul.

A mag körülbelül 80%-át az endosperm teszi ki, mely a csíra fejlődéséhez szükséges tápanyagokat, főként keményítőt, és kevés fehérjét tartalmaz.



2.7. ábra: A kukoricaszem részei

A kukoricaszemet körülvevő maghéj két részből áll. A külső *pericarp* részt elhalt sejtek alkotják, a belső *aleurone* rész pedig egy sejtnyi vastagságú, élő réteg. A maghéj legfőbb összetevője a lignocellulóz, de ezen kívül tartalmaz még fehérjéket és olajat is [5].

2.3.3. A kukoricaszem feldolgozása

A kukoricaszem feldolgozására alapvetően két technológia áll rendelkezésre: a száraz és a nedves őrléses technológia. A száraz őrléses technológia első lépéseként egy törőmalomban darálják le a kukoricaszemet. Ezzel szemben a nedves őrléses technológia első lépéseként a kukoricaszemet egy-két napig (körülbelül 50°C-on, kén-dioxid vizes oldatában) áztatják. Az áztatás során a maghéj megpuhul, a kukoricaszem megduzzad. Ezután a különböző részek elválasztása következik: elsőként a csírat pattintják ki a kukoricaszemből, majd vízzel történő mosással oldatba viszik a fehérjét és a keményítőt. A következő lépésben a kimosott keményítőt és fehérjét választják el egymástól. A technológia során keletkező melléktermékek a kukoricarost, a glutén és a kukoricaalekvár (azaz a bepárolt áztatólé). A nedves őrléses technológia költségei (mind a beruházási, mind a működtetési költségek) nagyobbak, mint a száraz őrléséi [12].

Magyarországon az egyetlen nagyüzemi kukorica feldolgozó a nedves őrléses technológiát alkalmazza. A kukorica nedves őrléses feldolgozása során keletkező melléktermékeket főként takarmányozásra használják, de a kukoricaalapú bioetanol-előállítás növekedésének és a magyarországi takarmányozott állatállomány csökkenésének köszönhetően folyamatosan nő a hasznosítatlan melléktermékek mennyisége. A rost és a préselt, extrahált csíra koncentrált képződésüknek és összetételüknek köszönhetően alkalmas alapanyagai lehetnek biofinomító üzemeknek [5].

2.3.4. A kukoricarost összetétele

<i>komponens</i>	<i>% (száraz tömegre vonatkoztatva)</i>
keményítő	18-22
cellulóz	15-16
hemicellulóz	
xilán	21-23
arabinán	10-12
lignin	<3
fehérje	10-15
olaj	2-4
hamu	0,5-1,5

2.1. táblázat: A kukoricarost átlagos összetétele [13]

A kukoricarost lignocellulóz tartalma nagy, közel 50% [13], így biofinomítás révén számos értéknövelt termék előállítható belőle. A nagy lignocellulóztartalom mellett jelentős a keményítőtartalma is: körülbelül 20% [13]. A keményítőtartalma a nedves őrléses technológiának köszönhető: a rost elválasztása a keményítőt és fehérjéket tartalmazó oldattól nem tökéletes, a keményítőtartalom ebből a lépésből marad vissza. A kukoricarost pontos összetétele évjáratonként és termőterületenként változik. A 2.1. táblázat a kukoricarost összetételére vonatkozó átlagos adatokat mutatja.

2.3.5. A kukoricarost frakcionálása

A kukoricarost biofinomító szemléletű feldolgozása az egyes frakciók (hemicellulóz, cellulóz, lignin) elválasztását igényli. A lignocellulózok komplex szerkezete miatt a kívánt frakció a komplex lignocellulóz struktúra megbontásával válik hozzáférhetővé. A megbontásra alkalmas kezelések között vannak vizes és vegyszeres kezelések. A legtöbbet végezhetjük kis, illetve nagy hőmérsékleten is. A legismertebb kezelések: forró vizes, híg vagy tömény savas, lúgos, kén-dioxidos, hidrogén-peroxidos, szerves oldószeres kezelés; gőzrobbantás, ammóniás áztatás, ammóniás robbantás, nedves oxidáció, CO₂ robbantás [14].

2.3.5.1. A kukoricarost híg kénsavval történő kezelése

Kálmán Gergely doktori munkája során a híg kénsavas kezelést többek között keményítőmentesített kukoricarost esetében alkalmazta. A reakciót 8-10% szárazanyag

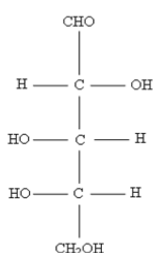
tartalom és – a kísérleti tervtől függően – 0,5-1,5% kénsav-koncentráció mellett, 2 órán át, 120°C-on végezte. A kísérletek során az oldatba kerülő oligoszacharidokat 4%-os kénsavval hidrolizálta. A cukorkoncentrációkat folyadékkromatográfiás módszerrel határozta meg. Eredményei alapján a híg kénsav oldatok a hemicellulózt gyakorlatilag teljesen oldatba vitték: 1%-os kénsavoldat és 120°C reakcióhőmérséklet, kevertetés nélkül, 2 óra tartózkodási idő mellett éles elválasztást valósított meg a hemicellulóz és cellulóz frakciók között. A cellulóz kb. 90%-a a szilárd frakcióban maradt, míg a hemicellulóz 99%-a oldatba került [5].

Badal C. Saha és Rodney Bothast vizsgálataik során többféle savkoncentráció és kezelés idő hatását vizsgálták 15 m/m% szárazanyag tartalmú kukoricarost-szuszpenziókban, 120°C-on. Az általuk vizsgált savkoncentrációk: 0,5; 0,75; 1,0%, és a kezelési időtartamok: 15, 30, 45, 60 perc. Statisztikai értékelés után megállapították, hogy a két paraméter közül melyiknek van szignifikáns hatása a cukorkonverziók tekintetében. Az eredmények alapján elmondható, hogy az arabinóztartalom könnyen leoldható, és az adott határok között a hozam értéke csak elhanyagolhatóan függ a kezelési idő hosszúságától, valamint az alkalmazott savkoncentrációtól. A xilóz hozama ezzel szemben jelentősen függ a kezelési idő hosszúságától, de csak kis mértékben függ az alkalmazott savkoncentrációtól. A glükózhozam mértéke egyaránt függ a kezelési idő hosszúságától és a savkoncentrációtól is [15].

2.4. Az arabinóz és a xilóz

A kukoricarost hemicellulóz frakciójának hidrolízisekor legnagyobb mennyiségben L-arabinóz és D-xilóz keletkezik. Mindkettő az aldózok csoportjába tartozó öt szénatomos monoszacharid. Vízben oldódnak. A természetben általában kötött formában fordulnak elő.

2.4.1. Arabinóz



Az arabinóz fehér színű, kristályos vegyület. A természetben – a xilóz után – a második leggyakrabban előforduló pentóz. Számos felhasználási területe ismert. Hagyományosan az élelmiszeripar alkalmazza adalékanyagként és kis kalóriatartalmú alternatív édesítőszerként, de fontos alapanyaga számos gyógyszer szintézisének is [16].

2.8. ábra: L-arabinóz

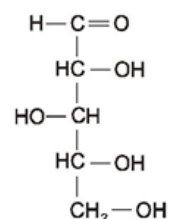
Vizsgálatok kimutatták, hogy az L-arabinóz (2.8. ábra) csökkenti a bélnyálkahártya *szacharáz* aktivitását, így szacharózzal együtt történő fogyasztása esetén csökkenti és késlelteti a vércukor- és inzulinszint emelkedését a vérben. Ennek köszönhetően alkalmas cukorbetegség étrendjének kiegészítésére [17]. Ezen kívül az arabinózt felhasználják mikroorganizmusok

azonosításában, gyógyszerek karcinogén anyag tartalmának keresésében, daganat- és vírusellenes anyagok, például nukleozid-analógok szintézisének alapanyagaként is [6].

Az arabinóz a természetben általában kötött formában fordul elő, így előállítása két módon történhet: savas, illetve enzimes hidrolízissel. Kutatások zajlanak a kukoricarostból és cukorrépa pépből történő előállítására. Jelenleg ipari méretekben gumiarábikumból savkatalizált hidrolízissel arabinóz és xilóz keverékét állítják elő, de folynak kutatások az enzimes hidrolízis alkalmazására is. Az enzimes hidrolízis előnyei, hogy az enzimek nagymértékben specifikusak a szubsztrátra, enyhe körülmények között is végbemennek a kívánt reakciók, valamint, hogy mellékreakciók nem fogyasztják a hidrolizált terméket. Az enzimes hidrolízis hátránya azonban, hogy költségesebb, mint a savas hidrolízis [18]. Az előállítás során arabinóz és xilóz keverékét nyerik, mely komponensek szétválasztása költséges kromatográfiás elválasztást igényel. A kromatográfiás tisztítás kiiktatásával – azaz az arabinóztartalom szelektív hidrolízisével – jelentősen csökkenthetők lennének az arabinózelőállítás költségei, és ez által az arabinóz piaci ára.

2.4.2. Xilóz

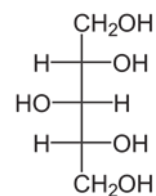
A D-xilóz (2.9. ábra) a természetben leggyakrabban előforduló pentóz. Fehér színű, könnyen kristályosodó vegyület. Legnagyobb mennyiségben egy alternatív édesítőszer, a xilit előállítására használják [8]. Felhasználható etanolelőállításra is: léteznek olyan élesztő törzsek, melyek képesek a xilózt etanollá alakítani [19]. A xilózt alkalmazza továbbá a kozmetikai és gyógyszeripar (ezen belül is a bőrgyógyászati ágazat), mert stimuláló hatással van a proteoglikánok és glükózamino-glükánok szintézisére [20].



2.9. ábra: D-xilóz

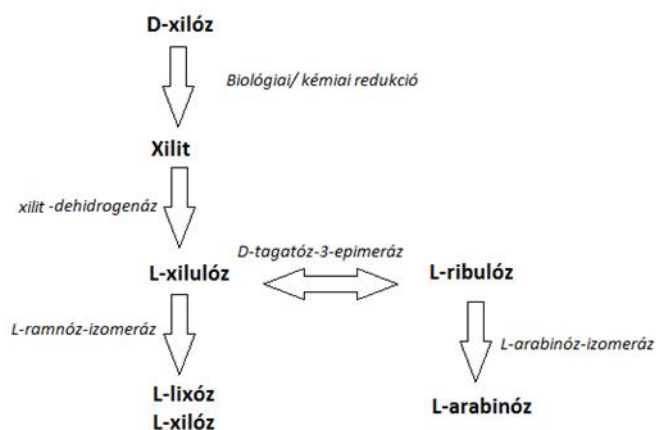
2.5. A xilit

A xilit egy öt szénatomos cukoralkohol (2.10. ábra), mely a természetben ritkán fordul elő. Gyümölcsökben és zöldségekben található meg. Az emberi szervezet normál metabolizmusa során is megjelenik a xilit mint közttermék, ennek mennyisége 5-15 g naponta [21]. Alkalmazzák édesítőszerként rágógumikban, cukrokban, édességekben és fogkrémekben, mert édessége körülbelül akkora, mint a szacharózé, ugyanakkor kalóriatartalma csak kétharmada a szacharózénak.



2.10. ábra: Xilit

Utóíze gyakorlatilag nincsen, a fogzománcot nem károsítja. „Cukorbetegek számára biztonságos” édesítőszerként hirdetik. A biztonságos jelzöt kis glikémiás indexének (13-as) köszönheti, valamint annak, hogy lebontása nem inzulin-függő útvonalakon történik. A glikémiás index az élelmiszerek 100 kJ-nyi mennyiségének vércukoremelő képessége a szőlőcukoréhoz képest mérve, százalékban [22], [23]. Felhasználják továbbá cukrok prekursoraként. Mivel ipari léptékben állítják elő, így olcsó alapanyaga lehet azon cukrok előállításának, melyek a természetben ritkán fordulnak elő, mint például az L-lixóz vagy L-ribulóz (lásd 2.11. ábra). Nem királis molekula, így a megfelelő reakció köztitermékeként lehetővé teszi D-konfigurációjú anyagok átalakítását L-konfigurációjú anyagokká: például D-xilóz átalakítását L-arabinózzá (2.11. ábra). A xilit *xilit-dehidrogenáz* enzim segítségével L-xilulózzá oxidálható, mely izomerizációval L-lixózzá vagy L-xilózzá alakítható. Az L-xilulóz *D-tagatóz-3-epimeráz* enzim segítségével L-ribulózzá konvertálható, melyből *L-arabinóz-izomeráz* közreműködésével L-arabinóz állítható elő [7].



2.11. ábra: Xilit átalakítási lehetőségei [7]

2.5.1. Xilitelőállítás

2.5.1.1. Xilitelőállítás kémiai úton

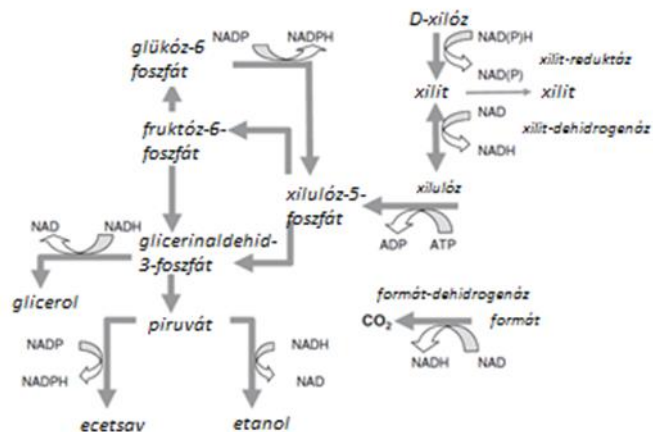
Xilit kémiai úton a xilóz katalitikus hidrogénezésével állítható elő, melyhez Raney-nikkel katalizátort használnak [24]. A kémiai előállítás költséges, mert a redukcióhoz csak tiszta xilózoldat használható. A xilózt lignocellulózok savas hidrolízisével nyerik, mely során egyéb komponensek is megjelennek, így a megfelelő tisztaság eléréséig többlépéses tisztítási folyamaton kell végigvinni a hidrolizátumot. A kémiai eljárást ipari léptékben az 1970-es években dolgozták ki Finnországban, azóta a legtöbb fejlesztés célja a xilithozam növelése és/vagy a költségek csökkentése volt [7].

2.5.1.2. Xilitelőállítás biológiai úton

Egy alternatív módszer a xilitelőállítására a mikrobiális úton történő redukció, melynek ismertsége a nyolcvanas évek óta egyre inkább növekszik. Az alapanyag ebben az esetben is a lignocellulózok savas hidrolízisekor kapott D-xilóz. Egyes élesztőtörzsek pentóz-fermentáló képességét az 1980-as évek elején fedezték fel. Ezután nagymértékben megnőtt az érdeklődés a D-xilóz biokonverziója iránt, melynek célja az etanol- vagy xilitelőállítás volt. Néhány baktérium és fonalas gomba képes xilitet előállítani, de a legfontosabb termelők az élesztők, közülük is a *Candida* nemzetség tagjai, például a *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. parapsilosis*, vagy *C. tropicalis*. Természetes körülmények között néhány pentóz-fermentáló élesztő elsősorban etanolt (ilyen élesztő például a *Pichia stipitis*), míg mások elsősorban xilitet (például *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*) állítanak elő. Léteznek olyan élesztők is, melyek egyszerre állítanak elő etanolt és xilitet. A biológiai módszer előnye, hogy szubsztrátspecifikus reakción alapszik. A biológiai úton történő xilitelőállítás teljes mértékben követi a zöld kémia alapelveit. A jelenlegi kutatásokban alkalmazott alapanyagok az eukaliptusz fa, a cukornád- és kukoricarost, valamint a kukoricacsutka. A biológiai redukció során elérhető hozam versenyképes a kémiai katalízissel elérhető hozammal [7], [25].

2.5.1.2.1. A xilózhasznosítás folyamata élesztőkben

Az élesztők a xilóz-metabolizmus során kétlépéses oxidációs-redukciós reakcióban alakítják a xilózt xilitté, majd ezt xilulózzá. Az első reakciót a NAD(P)H-függő *xilóz-reduktáz* katalizálja. A xilitet a sejt vagy kiválasztja sejten kívülre, vagy tovább oxidálja xilulózzá egy NAD-függő *xilit-dehidrogenáz* segítségével. A képződött xilulóz ezután a *xilulóz-kináz* segítségével foszforilálódik S-xilulóz-5-foszfáttá, ami intermedierként lép be egyéb metabolikus útvonalakba (2.12. ábra). Az élesztők számos metabolikus útvonalának a *xilóz-reduktáz* és a *xilitol-dehidrogenáz* fontos szabályozói [21], [26].



2.12. ábra: D-xilóz metabolizmusa élesztőkben [24]

2.5.1.2.2. A biológiai úton történő xilitelőállítás befolyásoló tényezők

A biológiai redukciót számos környezeti paraméter befolyásolhatja. A legfontosabb befolyásoló tényezők a kezdeti sejt-, illetve xilózkoncentráció, a hőmérséklet, a pH és az oxigénellátottság. Továbbá hatással vannak a fermentációra az inhibitorok, a xilóz mellett jelenlevő egyéb cukrok, valamint ezek mennyiségi aránya a xilózhoz képest [27].

2.5.1.2.2.1. Oxigénellátottság

A xilitfermentációt befolyásoló paraméterek közül az egyik legfontosabb a rendelkezésre álló oxigén mennyisége. Oxigénfeleslegben a NADH koenzim – a terminális oxidáció révén – oxidálódik, a kialakuló nagy NAD/NADH arány a xilit xilulózzá történő oxidációját okozza. Ennek eredményeként a hasznosított D-xilóz sejttömeg-növelésre fordítódik. Ugyanakkor szigorúan anaerob körülmények között néhány mikroorganizmus, mint például a *C. utilis* és *C. parapsilosis* nem képes metabolizálni a D-xilózt. Limitált oxigénellátás mellett az elektron transzport rendszer nem képes az összes – a légzés vagy fermentáció során – képződő redukált koenzim oxidációjára. Emiatt a sejten belüli NADH mennyisége megnő, így a NAD-függő *xilit-dehidrogenáz* enzim aktivitása csökken, aminek következtében xilit halmozódik fel. Vandeska és munkatársai, valamint Kim és munkatársai eredményei azt mutatták, hogy az oxigénellátásnak van egy kritikus értéke, melynél a xilithozam nagy, ugyanakkor a sejttömeg-hozam kicsi. *C. boidinii* és *C. parapsilosis* esetén teljesen anaerob körülmények között a sejtnövekedés csaknem teljesen megszűnt, viszont a xilithozam is kicsi maradt. A xilittermelés szempontjából megfelelő oxigén ellátottság a limitáló oxigénkoncentráció értéke körül található. A xilittermelés fokozása céljából az oxigénellátottságot erősen kontrollálni kell, hogy fenntartsuk a xilóz redukcióját, ugyanakkor a xilit oxidációját gátoljuk [26], [28].

2.5.1.2.2.3. Egyéb cukrok jelenléte a xilóz mellett a fermentációban

Számos szerves „hulladékanyag” olcsó alapanyaga lehet a biotechnológiai folyamatoknak, köztük a xilitelőállításnak is. A biológiai xilózredukció fejlesztésének egyik legnagyobb előrelépése az volt, amikor felfedezték, hogy tiszta D-xilóz helyett pentózok elegye is hasznosítható a fermentációban [29]. Azonban szubsztrátok keveréke esetén eltérő enzimaktivitások tapasztalhatók, mint egyetlen szubsztrát esetén. A *xilóz-reduktáz* és *xilit-dehidrogenáz* enzimek indukciója fontos szabályozó szerepet tölt be a xilózt hasznosító biokémiai folyamatokban. Mindkét enzim indukálható számos szubsztrát által, de szubsztrátonként eltérő mértékben. *C. guilliermondii* esetén a legjobb induktornak a D-xilóz bizonyult, ezt szorosan követte az L-arabinóz. A cellobióz, D-mannóz, D-glükóz, D-galaktóz, D-fruktóz, valamint a glicerin csak kismértékű *xilóz-reduktáz* aktivitást idéztek elő. A *xilit-dehidrogenázt* a cellobióz és a D-fruktóz részlegesen, míg a többi cukor elhanyagolható mértékben aktiválta. Az L-arabinóz, a cellobióz, és a D-galaktóz nem, míg a D-mannóz, D-glükóz, D-fruktóz és glicerin különböző mértékben nyomta el a D-xilóz által a két enzimben okozott indukciót. Hexózok jelenlétében általánosan a következő volt tapasztalható: az élesztő előbb a hexózt fogyasztotta el, és csak azután a pentózt [30].

A cukrok jelenlétének hatása teljesen eltérő mértékű lehet. *Musatto és munkatársai C. guilliermondii*-val végzett fermentációk során vizsgálták az élesztő cukorfogyasztását 85 g/l xilózt, 17 g/l glükózt és 9 g/l arabinózt különböző kombinációkban tartalmazó oldatokban.

D-glükóz jelenlétében 30%-kal lassult a xilózfelhasználás, míg az arabinóz nem volt hatással a xilózfelhasználás sebességére. Ugyanakkor, amennyiben xilóz vagy glükóz is volt a fermentációban, ezek teljesen elnyomták az arabinózhasznosítást [27]. *C. guilliermondii* esetén a xilittermelés szempontjából az bizonyult optimálisnak, ha glükóz nem volt a fermentációban. Az arabinóz jelenléte nem befolyásolta az elérhető xilithozamot [27].

C. parapsilosis-szal folytatott fermentáció során a kukoricacsutka-hidrolizátumhoz feleslegben hozzáadott glükóz jelenléte esetén (20 g/l glükóz, 50 g/l xilóz), anaerob körülmények között etanol termelődött. Ennek köszönhetően a xilittermelés lassult. Ennek oka, hogy a sejtek először a glükózt hasznosították, és csak ezután a xilózt, valamint, hogy az etil-alkohol mérgező a sejtek számára [31].

2.5.1.2.2.4. A sejtkoncentráció hatása

A xilitfermentáció hatékonysága nagymértékben függ a fermentáció során alkalmazott sejtkoncentrációtól. Nagy kiindulási sejtkoncentráció esetén nagyobb hozam és produktivitás érhető el. Rátáplálós fermentáció során a gyors sejt szaporítás megoldható a kezdeti

oxigénkoncentráció nagy értéken tartásával. A sejtkoncentráció növelésének egyik további lehetősége a sejtek membránszeparációja. Folyamatos fermentációs rendszerben a visszatartott sejtek újra felhasználhatók. A visszatartás hatására nagy sejtsűrűség alakul ki, ami növeli a rendszer hatékonyságát [25].

A sejtek növekedésének sebességét befolyásolja a tápoldatban oldott cukrok minősége és mennyisége is. *C. boidinii* esetén gyorsabb sejtnövekedés érhető el glükóz és xilóz elegyén való felszaporításkor, mint tiszta xilózoldaton [21]. Ugyanakkor xilóztartalmú tápoldaton felszaporított *C. guilliermondii* sejtekkel végzett fermentáció esetén nagyobb xilithozam érhető el, mint glükóztartalmú tápoldaton felszaporított sejtekkel [32].

2.5.1.2.2.5. Ritka cukrok hasznosítása

A sejtszaporításhoz szubsztrátként használt cukrok általában a leggyakrabban előforduló pentózok és hexózok. Néhány nyersanyagban azonban található ritka pentózok is, mint például a D-arabinóz, L-xilóz, L-ribóz, és L-lixóz [33]. Ezek elválasztása a többitől bonyolult és költséges, így érdemes foglalkozni ezek fermentálhatóságával.

Granström és munkatársai *C. guilliermondii* növekedését vizsgálták különböző szubsztrátok esetén. A sejtek a leggyorsabban a vizsgált cukrok közül L-arabinózon, L-ribulózon, D-ribózon és D-xilózon növekedtek, D- és L-lixózon lassabb volt a sejtnövekedés. A vizsgálathoz kontrollként D-glükózt használtak. Eredmények alapján a vizsgált pentózok részben cukorlakohol-termelésre, részben biomassza növelésre fordítottak. Az eredmény jelentősége, hogy ha xilóz ipari redukciójára használják ezt az élesztőtörzset, akkor az minden jelen lévő pentózt redukálni fog, ami megnehezíti a tiszta xilit kinyerését [33].

2.5.1.2.2.6. Kofaktorok hatása

A *C. boidinii* egyike azon élesztőtörzseknek, melyek képesek a metil-alkoholt szénforrásként hasznosítani. *Vongsuvanlert és munkatársai* xilózt és 2% metil-alkoholt tartalmazó oldatban végzett fermentációi azt mutatták, hogy a metil-alkohol jelenléte nem volt hatással a sejtek növekedésére és a D-xilulóz felhalmozására. A 20 g/l metanolt és 100 g/l D-xilózt tartalmazó tápközegben 6 nap alatt 48,5 g/l xilitet termeltek a sejtek. Ha metil-alkohol is jelen van a fermentlében, akkor a D-xilulóz-xilit vagy a D-xilóz-xilit redukcióhoz szükséges NAD(P)H koenzim a metil-alkohol oxidációjakor képes regenerálódni. A fermentációs közegben jelen levő metil-alkohol mennyisége arányos a termelt etil-alkohol mennyiségével [34].

Arruda és munkatársai a glicerint xilóz-xilit biokonverzióra kifejtett hatását vizsgálták *C. guilliermondii* törzsszel végzett fermentációkban. Kísérleteik során a glicerinkoncentráció 0,7; illetve 6,5 g/l volt, kontrollként csak D-xilózt tartalmazó tápoldatot alkalmaztak, valamint

vizsgálták a fermentációt csak glicerint (53 g/l) tartalmazó tápoldaton is. Eredményeik alapján 0,7 g/l glicerint hozzáadása a xilittermelést és a produktivitást is növelte, közben etil-alkohol képződött. A sejtkoncentráció a csak glicerint tartalmazó tápoldatban volt a legnagyobb [35].

2.5.1.3. Lignocellulóz-hidrolizátumok felhasználása xilitfermentációra

A mikrobiális úton történő xilitelőállítás alapanyaga – a kémiai redukcióhoz hasonlóan – a lignocellulóz biomasszákat savas hidrolízisével nyert D-xilóz. Azonban a lignocellulóz-hidrolizátumok a xilóz mellett tartalmazzak még egyéb cukrokat is: például glükózt, arabinózt, galaktózt. Számos kutatás foglalkozik ezen hidrolizátumok hasznosításával, például élesztőkkel történő xilitfermentációra való felhasználásával. Ezen kutatásokban felhasznált alapanyagok például az eukaliptusz fa, a cukornád-, cukorrépa- és kukoricarost, valamint a kukoricacsutka. A hidrolizátumokban számos toxikus anyag is megtalálható. Ilyen toxikus anyag többek között a furfural, az 5-hidroxi-metilfurfural (HMF) és az ecetsav. Ezek a vegyületek a lignocellulózok savas hidrolízisekor képződnek, arányuk a kezelés módjától és az alkalmazott alapanyagtól függ. A furfural és a HMF az erősebb körülmények között történő hidrolízis során a cukrok degradációjából képződik, így ezek mennyisége enyhe körülmények között végzett kezeléseknél elhanyagolható [36]. Ecetsav minden esetben megjelenik a hidrolizátumban, mennyisége az adott lignocellulóz eredetétől függ. Az ecetsav erős inhibitora a xilóz-metabolizmusnak, az inhibíció mértéke függ az ecetsav koncentrációjától, az ecetsav:xilóz aránytól, valamint a pH értékétől. *Sang-Yong Kim és munkatársai* kísérletei során az 50 g/l xilózt és 12 g/l ecetsavat tartalmazó fermentálékban 90%-kal csökkent a *C. parapsilosis* törzs xilittermelése az ecetsavat nem tartalmazó fermentálékhoz viszonyítva [31]. *Fond és munkatársai* eredményeik alapján megállapították, hogy az ecetsav inhibíciója disszociálatlan formájának köszönhető, így nagyobb pH értéken – ahol a disszociálatlan formájú ecetsav mennyisége kisebb – az inhibíció mértéke kisebb [37].

A hidrolizátumokban található toxikus anyagok mennyiségének csökkentésére alkalmas módszereket számos kutatás során vizsgáltak. A három leggyakrabban alkalmazott módszer a részleges meszezés, a túlmeszezés, és az aktív szénes derítés. *Buhner és munkatársai* a kezeléseket vizsgálták, a xilitfermentációhoz *C. tropicalis* élesztőtörzset használva. A vizsgálatokhoz 120°C-on, kénsavval, különböző beállítások mellett készítettek hidrolizátumokat kukoricarostból. Az alkalmazott savkoncentrációk 0,25; 0,5; 0,75 és 1 térfogatszázalék, az alkalmazott kezelési idők 15; 30; 45; 60; 75 és 90 perc voltak. A detoxifikálás hatását vizsgálták az eredeti, illetve kétszeresen és háromszorosan betöményített hidrolizátum esetén is. Részleges meszezés esetén a hidrolizátumok pH-ját kalcium-hidroxid

segítségével 4-re állították, majd a kivált csapadékot centrifugálták (3000 g, 20 perc) és vákuum segítségével szűrték. Túlmeszezés esetén a hidrolizátum pH-ját kalcium-hidroxid adagolásával 10-re, majd centrifugálást (3000 g, 20 perc) és vákuumszűrést követően tömény kénsavval 4-re állították. Az aktív szenes derítést 50 g/l aktív szénnel, 1 órán át kevertetve végezték mind a részleges-, mind a túlmeszezés után. Az egy óra letelte után a szuszpenziókat centrifugálták (3000 g, 20 perc). A detoxikált hidrolizátumokat xilitfermentációs kísérletekben használták fel. Eredményeik alapján a savas kezelések paramétereinek változtatásával minimalizálható a toxikus komponensek képződése. A furfurol és a HMF koncentrációja a legerélyesebb körülmények között volt a legnagyobb. A háromféle kezelés közül a túlmeszezés nem bizonyult alkalmasnak a hidrolizátumok megfelelő detoxikálására, sőt, a kezelés hatására a hidrolizátumba kerülő kalcium mennyisége is toxikusnak bizonyult. A leghatásosabb kezelésnek a részleges meszezés és aktív szenes derítés együttes alkalmazása adódott. *Buhner és munkatársai* továbbá megállapították, hogy a modellszubsztrát oldathoz képest hemicellulóz-hidrolizátumon kisebb xilithozam érhető el a biológiai redukció során, mely számos tényezőnek köszönhető. Ezen tényezők közé tartozik a toxikus komponensek jelenlétén kívül a kiindulási xilózkoncentráció – modellszubsztrát oldathoz képest – kis értéke, a *xilit-dehidrogenáz* enzim aktivitásának a keletkező etanol hatására bekövetkező növekedése, valamint az egyéb komponensek miatt történő metabolikus útvonal-váltás [36].

2.5.2. Arabinózelőállítás

L-arabinózt kereskedelmi mennyiségben jelenleg egy összetett eljárás során, gumiarábikumból állítanak elő. A folyamat első lépése a gumiarábikum savas hidrolízise, mely eredményeképp a poliszacharid frakció nagy részben monoszacharidokká hidrolizál. A hidrolízis során az alkalmazott körülményektől és a nyersanyagtól függően 40-75%-os hozam érhető el az elméletileg kinyerhető arabinóz tekintetében [38]. Ezután következik számos tisztítási lépés, köztük semlegesítés, ionmentesítés, valamint kromatográfiás lépések, melyek jelentős költséget okoznak. A nagy költségekhez hozzájárul az is, hogy a gumiarábikum drága nyersanyag, és a fellelhető készletek végesek.

Az arabinóz előállításának alternatív nyersanyagául szolgálhatnak a pektin- és/vagy lignocellulóztartalmú mezőgazdasági és agro-ipari melléktermékek, melyek javarészt nagy mennyiségben és alacsony áron állnak rendelkezésünkre. A pektint tartalmazó alapanyagok arabinántartalmából az arabinóz előállítása például endo- és exo-arabinanázok segítségével lehetséges [39]. *Lim és munkatársai* ezzel a módszerrel 80%-os konverziót értek el, ugyanakkor a tiszta arabinán előállításához számos tisztítási lépésre szükség volt [40].

Korábban (1999) *Ahmed és munkatársai* publikáltak egy módszert, mely során *Mycobacterium smegmatis* segítségével alakították a ribitolt először L-ribulózzá, majd ezt L-arabinózzá [41]. A módszer hátránya, hogy a kiindulási anyagként szolgáló ribitol drága, ezáltal a módszer költségei nagyok.

Shibanuma és munkatársai kukoricarost hígsvavas kezelését vizsgálták az arabinóz hidrolízisének kedvező paraméterek megállapítása céljából. A kísérletek során oxálsavat, kénsavat és sósavat alkalmaztak különböző koncentrációkban és tartási idővel, 100°C-os hőmérsékleten, 10% szárazanyag tartalom mellett. A savas hidrolíziseket megelőzően a kukoricarost keményítő tartalmát α -amilázos kezeléssel távolították el. Száz fokon, egy órán át tartó kezelés során a kénsav-koncentrációt 0,05 és 0,5 N, az oxálsav-koncentrációt 0,01 és 2,0 N, a sósav-koncentrációt pedig 0,01 és 0,1 N között növelték. A hidrolizált arabinóz és xilóz arányának figyelembe vételével az oxálsav és a kénsav mutatkozott kedvezőnek. További kísérleteik alapján megállapítható, hogy habár adott arabinózhozam eléréshez kénsavból kisebb koncentráció szükséges, az arabinóz hidrolízisének szelektivitása szempontjából az oxálsav előnyösebb. Hat órás kezelés során oxálsav (0,2 N) esetén 48%-os, míg kénsav (0,12 N) esetén 96%-os xilózkinyerést tapasztaltak. Mindent összevetve, az arabinóz szelektív elválasztása szempontjából legalkalmasabb beállításnak a 0,3%-os oxálsav-koncentráció és egy óra tartózkodási idő mutatkozott. Az arabinóz hozama ekkor 54%-nak, a xilózé csak 10%-nak adódott [42].

A keményítőmentesített kukoricarost hígsvavas hidrolízise során a felülúszóban megjelenő termékek (arabinóz, xilóz, arabinoxilán oligomerek) mennyisége és aránya az alkalmazott körülményekkel – bizonyos keretek között – változtatható és szabályozható. Erélyesebb reakciókörülményeket alkalmazva a mezőgazdasági melléktermékek teljes hemicellulóz tartalmát oldatba vihetjük. Ekkor főként xilózt és arabinózt tartalmazó hidrolizátumhoz jutunk, melyből csak költséges, kromatográfiás lépésekkel választhatók szét az egyes cukorkomponensek. Megoldás lehet, ha más, értéknövelt termékek előállításához, együtt tudjuk felhasználni a különböző cukrokat. Ilyen megoldás lehet például a génmódosított élesztők segítségével történő xilitfermentáció.

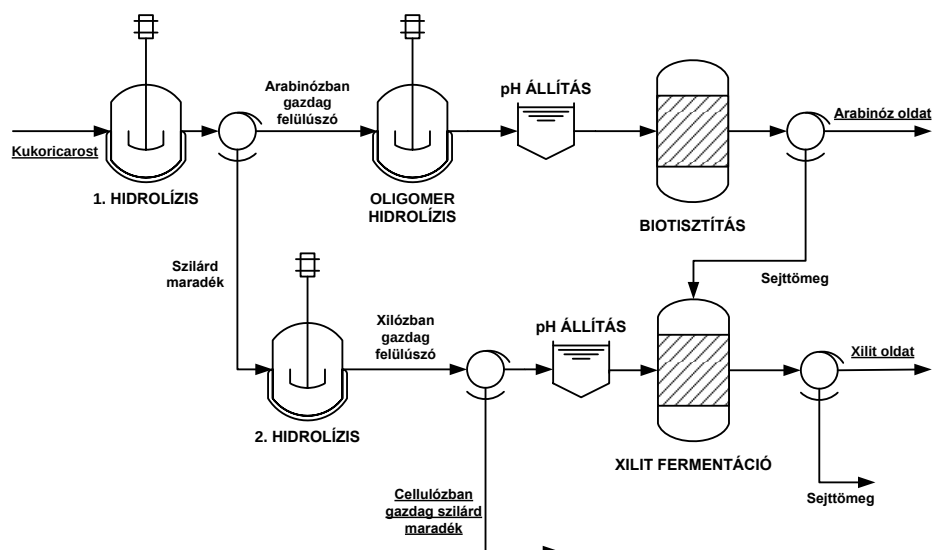
Cheng és munkatársai xilóz anyalúgból történő arabinózelőállítás során sikeresen alkalmazták a fermentációs biotisztítást. A xilóz anyalúg a kukoricacsutkából vagy cukornád bagaszból történő xilózelőállítás során melléktermékként jelenik meg. Cukortartalmát tekintve hozzávetőleg 350-400 g/l xilózt, 150-200 g/l glükózt és galaktózt, valamint 150-180 g/l arabinózt tartalmaz. Kísérleteik során 306 különböző élesztő törzset vizsgáltak meg olyan törzseket keresve, melyek a xilóz anyalúgban található cukor és cukoralkohol komponenseket

az arabinóz kivételével képesek metabolizálni. A vizsgált élesztők közül a *Pichia anomala* Y161 adódott legalkalmasabbnak. A fermentációs biotisztítás hatékonyságát a kiválasztott élesztő tulajdonságain túl a környezeti paraméterek is nagyban befolyásolják. Az optimális fermentációs körülmények megtalálása ezért kiemelt fontosságú. Ennek érdekében rázatott lombikos kísérleteket végeztek, melyek során a hőmérséklet (30, 31, 32, 33, 34°C), a fermentáció ideje (50, 60, 70, 80, 90 óra), valamint a xilóz anyalúg mennyiségének (15, 20, 25, 30, 35 v/v %) hatását vizsgálták az elérhető arabinóz tisztaságának tekintetében. A fermentációt aerob körülmények mellett, 2,5% élesztőkivonattal kiegészített tápközegen végezték. A vizsgált tartományon belül a legnagyobb hatása a xilóz anyalúg mennyiségének volt. A biotisztítás optimális paramétereinek (32,5°C, 75 óra és 21 v/v % xilóz anyalúg) alkalmazásával 87%-os tisztaságot értek el. A tisztaságot az arabinóz és az összes cukor hányadosaként definiálták [16].

3. Célkitűzések

A kukoricarost xilóz- és arabinóztartalmában rejlő potenciál kihasználásához olyan technológiára van szükség, mely során a két cukrot szelektíven ki tudjuk nyerni a rostból, vagy a kinyerés után el tudjuk választani.

A kémiai xilitelőállítás alternatívája a biológiai redukció, melynek optimalizálása elengedhetetlen a kémiai redukcióval való versenyképesség eléréséhez.



3.1. ábra: Kukoricarost biofinomító folyamata [43]

A 3.1. ábrán látható folyamatban a kukoricarost egésze hasznosításra kerül. Munkám során ennek a komplex folyamatnak a részeit vizsgálom, külön-külön, és összekapcsolva. Kiindulási lépésként meghatározom a kukoricarost összetételét. Ezután megvizsgálom, hogy különböző savas kezelési módok alkalmasak-e a rost arabinóz- és xilóztartalmának szelektív kinyerésére. Biotisztítási kísérleteket végzek négyféle élesztőtörzzsel, mely kísérletek célja az arabinóz mellől az egyéb cukrok eltávolítása. Végül, egy erre alkalmas törzzsel xilitfermentációs kísérleteket végzek. Modellszubsztrát-oldaton vizsgálom, hogy milyen hatással van a fermentáció lefutására és az elérhető xilithozamra a levegőztetés mértéke, a kiindulási sejt- és xilózkoncentráció, a pH, illetve metil-alkohol vagy glicerol hozzáadása. Kukoricarost-hidrolizátumon a xilitfermentáció lefutását és a detoxikálás hatását vizsgálom meg.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált anyagok

Kukoricarost: a Hungrana Keményítő- és Izocukorgyártó és Forgalmazó Kft. által végzett nedves őrléses technológiából származott. A beérkezett rost szobahőmérsékleten száradt, ezután szárazanyag tartalma átlagosan 94% volt.

Acetát puffer (0,1 M, pH 4,8): 7,2 g/l nátrium-acetát ($C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$), 2,83 g/l ecetsav, pH korrigálás nátrium-hidroxiddal vagy ecetsavval.

Élesztőkivonat: Merck termék.

Tápoldat: 10 g/l élesztőkivonat, 15 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g/l $(NH_4)_2HPO_4$, glükóz/xilóz/arabinóz/galaktóz-oldat (pontos koncentrációk lásd a 4.3.7, 4.3.9. pontban és az eredményeknél). A cukoroldatok és a tápsóoldat sterilizése elválasztva történt, 120°C-on, 20 perc tartási idővel.

Aktív szén: Norit DX ULTRA 8005.3

Termamil supra enzimmészítmény (Hungrana Kft.)

Jellemző aktivitása: α -amiláz. pH optimuma 4,5-6,0; hőmérséklet optimuma 75-95°C. Javasolt adagolása 0,5 g enzim/ 1 kg szárazanyag.

Amiloglikozidáz enzimmészítmény

Jellemző aktivitása: glükoamiláz. pH optimuma 3,5-5,5, hőmérséklet optimuma 40-60°C. Javasolt adagolása 0,9 ml enzimoldat/ 1 kg szárazanyag.

Felhasznált élesztőtörzsek: *Candida boidinii* (NCAIM Y.01308), *Candida guilliermondii* (NCAIM Y.01050), *Candida parapsilosis* (NCAIM Y.01011), *Hansenula anomala* (NCAIM Y.01499). (Az élesztőtörzsek a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származó aktív tenyészetek voltak).

4.2. Felhasznált berendezések

Szárazanyagtartalom-mérő készülék: Precisa XM 60, Switzerland

Autokláv: Certo ClavA 4050, Stereizier, Austria

Rázató inkubátor: Certomat® IS, B. Braun Biotech International, Germany

Centrifuga: Hettich Universal 32, D78532, Germany

pH mérő: Laboratory Digital pH Meter, OP-211/2, Radelkis, Budapest

Hidrolizáló kádak: Thermo Haake Phoenix és Thermo Haake DC 10

4.3. Alkalmazott módszerek

4.3.1. A szárazanyag tartalom meghatározása

A szárazanyagtartalom-mérő készülék megméri a behelyezett anyag kiindulási tömegét, majd 105°C-ra hevíti, súlyállandóságig. A szárazanyag tartalmat a végső és a kiindulási tömegből számolja, és százalékos formában jeleníti meg.

4.3.2. A folyadékkromatográfiás vizsgálat

A folyadékkromatográfiás vizsgálatot megelőzően a folyadék mintákat 0,45 µm pórusátmérőjű regenerált cellulóz szűrőn szűrtem.

A folyadékkromatográfiás készülék típusa Shimadzu LC-VP HPLC, az alkalmazott oszlopok, mozgófázisuk és hőmérsékletük: BIO-RAD Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA), 5 mM kénsav (Millipore vízzel hígítva), 65°C, valamint Rezex RPM Pb2+, Millipore víz, 85°C. Az áramlási sebesség 0,5 ml/perc. A kalibrációhoz használt standardok: 0,1 és 10 mg/ml között 6 hígítási pont.

4.3.3. A nyersanyagelemzés lépései

4.3.3.1. A keményítőtartalom meghatározása

A keményítőtartalom meghatározását három párhuzamossal végeztem. A kukoricarostot ledaráltam, majd 3% szárazanyag tartalmú szuszpenziókat készítettem belőle acetát pufferrel. A szuszpenziókhoz *α-amiláz* enzimkészítményt adtam két lépésben. A teljes hozzáadott enzimdózis 0,5 g enzim/kg szárazanyag volt. Először az enzim mennyiségének felét adtam hozzájuk, majd 10 percig 120°C-on autoklávban kezeltem őket. Miután lehűltek körülbelül 90°C-ra, hozzájuk adtam a fennmaradó enzimmennyiséget, és 1 órán át 90°C-on vízfürdőn kevertettem őket. Az 1 óra letelte után *amilo-glükozidáz* enzimkészítményt adtam hozzájuk 0,9 ml enzimkészítmény/kg szárazanyag dózisban. Huszonnégy órán át 60°C-on rázattam őket 250 rpm fordulatszámmal. A szuszpenziókat Büchner-tölcséren 150 µm pórusátmérőjű nyílászűrő segítségével szűrtem. A szűrletek cukortartalmát folyadékkromatográfiás vizsgálatral határoztam meg.

4.3.3.2. A szénhidráttartalom meghatározása módosított Hågglund módszerrel [44]

A módosított Hågglund-módszerrel a lignocellulóz alapú biomassza szénhidráttartalmát monomerek formájában felszabadítjuk. A szénhidráttartalmat az előzőleg keményítőmentesített kukoricarostban határoztam meg. A mérést három párhuzamossal végeztem. Fél gramm szárazanyaghoz hozzáadtam 2,5 ml 72%-os kénsavat, 2 órára 25°C-os

vízfürdőre tettem, és körülbelül 20 percenként megkevertem. Ezután hozzájuk adtam 75 ml desztillált vizet, majd az üvegeket autoklávba tettem 1 órára, 120°C-ra. A szuszpenziókat G4-es üvegszűrőn átszűrtem. A szűrletek cukortartalmát folyadékkromatográfiás vizsgálattal határoztam meg.

4.3.4. A kukoricarost keményítőmentesítése

A kukoricarostban maradt keményítőt a különböző kezelések előtt enzimes hidrolízissel távolítottam el. A darált rostból 3% szárazanyag tartalmú szuszpenziót készítettem acetát pufferrel. Az oldatokhoz *α -amiláz* enzimkészítményt adtam, 0,5 g enzim/kg szárazanyag dózisban. Három órán át 90°C-os vízfürdőn kevertettem, majd Büchner-tölcséren, 150 μ m pórusátmérőjű nyílászűrő segítségével szűrtem a szuszpenziókat. A szűrés során képződött lepényeket az eredeti szuszpenzió mennyiségéhez képest háromszoros mennyiségű 80°C-os desztillált vízzel mostam. A szűrletbe kioldott keményítőt ezután kénsavval glükózzá hidrolizáltam: a szűrlet 5 ml-éhez ugyanennyi 8%-os kénsavat adtam, majd autoklávban 120°C-ra hevítettem, és 10 percig ezen a hőmérsékleten tartottam. A szűrletek cukortartalmát a keményítő savas hidrolízise után folyadékkromatográfiás vizsgálattal határoztam meg.

4.3.5. Oligomerek kénsavas hidrolízise monomerekké (utósavazás)

A minta 1-5 ml-éhez ugyanennyi 8%-os kénsavat adtam, majd autoklávban 120°C-on 10 percig kezeltem őket.

4.3.6. A kukoricarost kénsavas kezelése 90, 120 és 140°C-on

Az előzőleg keményítőmentesített kukoricarostból 3% szárazanyag tartalmú szuszpenziókat készítettem desztillált vízzel megfelelően hígított kénsavoldatokkal. Különböző időtartamokig kezeltem őket vízfürdőben 90°C-on, autoklávban 120 vagy 140°C-on. A kezelés után a szuszpenziókat Büchner-tölcséren, 150 μ m pórusátmérőjű nyílászűrő segítségével szűrtem. A szűrletekbe kioldott oligomereket ezután a 4.3.5. pontban leírtak alapján monomerekké hidrolizáltam. A felülúszók és az utósavazott minták cukortartalmát folyadékkromatográfiás vizsgálattal határoztam meg.

4.3.7. Sejtszaporítás (inokulum készítés) 30 g/l cukoroldaton (glükóz-/xilózoldat)

Steril fülke alatt a ferde agaron eltartott élesztősejteket a tápoldat 2 ml-ével belemostam a tápoldatba. A szaporítás 750 ml-es Erlenmeyer-lombikokban, 200 ml tápoldatban történt, 24 órán át, 30°C-on, 220 rpm fordulatszámú rázatással.

4.3.8. A sejtkoncentráció meghatározása

A sejtkoncentráció meghatározásához a mintát desztillált vízzel hígítva optikai denzitást mértem 600 nm-en. A mérésekhez alkalmazott vak minta minden esetben a megfelelően hígított, sejtmentes tápoldat vagy hidrolizátum volt.

4.3.9. Sejttömeg-kalibráció

A sejttömeg-kalibrációt előzőleg 30 g/l xilózoldaton 24 óra alatt felszaporított élesztősejtekkel végeztem. A sejtszuszpenzióból hígítási sort készítettem és optikai denzitásukat megmértem (600 nm). A sejtszuszpenzió pontosan 40 ml-ét lecentrifugáltam (9000 rpm, 5 perc), majd a felülúszót leöntve a kiüledett sejteket desztillált vízzel felszuszpendáltam és ismét lecentrifugáltam. A mosást kétszer megismételtem. Végül a kiüledett sejteket 4 ml desztillált vízzel felszuszpendáltam, és a szuszpenziót előzőleg analitikai mérlegen lemerít bemérőedényekbe mértem. Az edényeket 24 órára 105°C-os szárítószekrénybe tettem, majd miután kihültek, ismét megmértem a tömegüket. A hígítási sorból kapott optikai denzitás értékekhez a megfelelő sejtkoncentráció a 40 ml sejtszuszpenzióban levő sejttömeg alapján a hígításokkal számolható.

4.3.10. Biotisztítás modellszubsztrát-oldaton

Az egyes biotisztításokhoz xilóz-, arabinóz- és galaktóztartalmú oldatokat használtam, az inokulumot minden esetben a 4.3.7. pontban leírtak szerint készítettem.

Steril fülke alatt a felszaporított sejtszuszpenzió 2 ml-ével inokuláltam a tápoldatokat. Törzsenként két-két párhuzamost készítettem. A biotisztítás 100 ml-es Erlenmeyer-lombikban 20 ml-es töltöttség mellett történt: 1 héten keresztül, 30°C-on, 220 rpm fordulatszámú rázatással. A fermentléből naponta mintát vettem, melyből meghatároztam a sejtkoncentrációt. A maradék mintát lecentrifugáltam (9000 rpm, 5 perc), majd a felülúszó összetételét folyadékkromatográfiás módszerrel vizsgáltam.

4.3.11. Biotisztítás kukoricarost-hidrolizátumon *Candida boidinii* sejtekkel

A biotisztításhoz az inokulumot a 4.3.7. pontban leírtak alapján készítettem. A kukoricarostot 10% szárazanyag tartalom mellett 90°C-on 1,25%-os kénsavval 55 percig hidrolizáltam, majd a szuszpenziót Büchner-tölcséren, 150 µm pórusátmérőjű nyilonszűrő segítségével szűrtem. A szűrletből mintát vettem, majd a mintában található oligomereket a 4.3.5. pontban leírtak alapján hidrolizáltam, a szűrlet és az utósavazott minta cukortartalmát folyadékkromatográfiás vizsgálattal határoztam meg. A szűrlet teljes mennyiségét ezután további sav hozzáadása nélkül autoklávba tettem 10 percre, 120°C-ra, az oligomerek monomerekké történő hidolízise

céljából. A hidrolizátum pH-ját kalcium-hidroxiddal 6-ra állítottam, majd a kicsapódó gipszet szűrőpapíron szűrtem. A leszűrt oldatot 10 perc alatt autoklávban, 120°C-on steriliztem. Száz ml-es Erlenmeyer-lombikokba 20-20 ml hidrolizátumot mértem, összesen 6 lombikba, majd háromhoz hozzámértem 10 g/l élesztőkivonatot, 15 g/l KH_2PO_4 -ot, 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -ot, és 3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -ot. Steril fülke alatt a felszaporított élesztőszuszpenzió 2 ml-ével inokuláltam a hidrolizátumokat. A biotranszformációs kísérletet 1 héten keresztül, 30°C-on, 220 rpm fordulatszámú rázatással végeztem. A fermentléből naponta mintát vettem, melynek egy részét hígítva optikai denzitást mértem a sejtkoncentráció meghatározására. A maradék mintát lecentrifugáltam (9000 rpm, 5 perc), majd a felülúszó összetételét folyadékkromatográfiás módszerrel vizsgáltam.

4.3.12. Xilitfermentáció *Candida boidinii* sejtekkel

A xilitfermentációs kísérleteket *Candida boidinii* törzsszel végeztem. Az előzetesen felszaporított sejtsuszpenzió optikai denzitását megmértem (600 nm), majd a tervezett kiindulási sejtkoncentráció beállításához szükséges inokulum-mennyiséget steril centrifugacsőben lecentrifugáltam (9000 rpm, 5 perc). A kiülepedett sejtekről a felülúszót leöntöttem, a sejteket steril desztillált vízzel felsuszpendáltam és ismét lecentrifugáltam. A mosást még kétszer ismételtam a leírt módon. Végül a kiülepedett sejteket steril fülke alatt a tápoldat egy részével belemostam a tápoldatba. A fermentációs kísérleteket 100 ml-es Erlenmeyer-lombikban, különböző töltöttség mellett, 1 héten keresztül, 30°C-on, 125 vagy 220 rpm fordulatszámú rázatással végeztem. A fermentléből naponta mintát vettem, melynek egy részét megfelelően hígítva optikai denzitást mértem a sejtkoncentráció meghatározására, majd a maradék mintát lecentrifugáltam (9000 rpm, 5 perc) és a felülúszó összetételét folyadékkromatográfiás módszerrel vizsgáltam.

4.3.13. Xilitfermentáció *Candida boidinii* sejtekkel kukoricarost-hidrolizátumon

A kukoricarostot első lépésként 10% szárazanyag tartalom mellett 90°C-on 1,1%-os kénsavval 51 percig hidrolizáltam, majd a szuszpenziót Büchner-tölcséren, 150 µm pórusátmérőjű nyílászűrő segítségével szűrtem. A lepényt ezután kétszer átmostam a szuszpenzió mennyiségével megegyező 80°C-os desztillált vízzel, majd szárítószekrénybe tettem 40°C-ra, egy éjszakára. Következő lépésként a kiszáritott lepényt 10% szárazanyag tartalom mellett 120°C-on 1,1%-os kénsavval 30 percig hidrolizáltam, majd a szuszpenziót Büchner-tölcséren, 150 µm pórusátmérőjű nyílászűrő segítségével szűrtem. A szűrletből mindkét lépésnél mintát vettem, melynek cukortartalmát folyadékkromatográfiás módszerrel határoztam meg. A hidrolizátum pH-ját kalcium-hidroxiddal 6-ra állítottam, majd a kicsapódó

gipszet szűrőpapíron szűrtem. A hidrolizátumhoz 5 m/v% aktív szenet adtam, mellyel 30 percig kevertettem szobahőmérsékleten, majd az aktív szenet szűrőpapíron szűrtem. A leszűrt oldatot 10 perc alatt autoklávban 120°C-on steriliztem.

Az sejteket a 4.3.7. pontban leírtak alapján szaporítottam fel, a fermentációk egy részéhez 30 g/l xilózoldaton, a többihez a 10% szárazanyag tartalom mellett, 90°C-on, 1,1% kénsavval 51 percig végzett hidrolízis szűrletén. Ehhez a szűrletet sav hozzáadása nélkül autoklávban kezeltem 10 percig, 120°C-on, majd a pH-ját kalcium-hidroxiddal 6-ra állítottam. A kicsapódó gipsz szűrése után az oldatot autoklávban 120°C-on 10 percig steriliztem. A szaporítást ez esetben is 750 ml-es Erlenmeyer-lombikokban, 200 ml hidrolizátummal végeztem, 30°C-on, 220 rpm fordulatszámú rázatás mellett. Az előzetesen felszaporított sejtszuszpenzió optikai denzitását megmértem (600 nm), majd a tervezett kiindulási sejtkoncentráció beállításához szükséges inokulum-mennyiséget steril centrifugacsőben lecentrifugáltam (9000 rpm, 5 perc). A kiülepedett sejtekről a felülúszót leöntöttem, majd a sejteket steril fülke alatt a hidrolizátum egy részével belemostam a hidrolizátumba. A fermentáció 100 ml-es Erlenmeyer-lombikban különböző töltöttség mellett történt: 1 héten keresztül, 30°C-on, 125 rpm fordulatszámú rázatással. A fermentleából naponta mintát vettem, melynek egy részét megfelelően hígítva optikai denzitást mértem a sejtsűrűség meghatározására, a maradék mintát lecentrifugáltam (9000 rpm, 5 perc), majd a felülúszó összetételét folyadékkromatográfiás módszerrel vizsgáltam.

4.3.14. Összes fenolos komponens meghatározása Folin & Ciocalteu's reagenssel

A megfelelően hígított minta 0,2 ml-éhez hozzáadtam 6 ml desztillált vizet, majd 0,6 ml Folin & Ciocalteu's reagenst. Keverés után 6 percig állni hagytam szobahőmérsékleten, majd hozzáadtam 2 ml 20 m/m%-os nátrium-karbonát oldatot. Keverés után 2 órán át állni hagytam, majd újabb keverés után megmértem az oldatok abszorbanciáját 760 nm-en. A minták összes fenolos komponens tartalma az előzetesen vanillinnal meghatározott kalibráció alapján, a következő képlettel számolható: $A_{760} = 1,6785c + 0,1021$, ahol A_{760} a 760 nm-en mért abszorbancia a hígítással korrigálva, c pedig a minta összes fenolos komponens tartalma, g/l-ben.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Nyersanyag szénhidrát tartalmának meghatározása

Munkám során a Hungrana Zrt.-től kapott kukoricarosttal dolgoztam. A 4.3.3. pontban leírtak alapján meghatároztam a rost keményítő-, cellulóz-, és hemicellulóztartalmát.

5.1. táblázat: A kukoricarost összetétele

komponens	% (száraz tömegre vonatkoztatva)
keményítő	13,1
cellulóz	15,1
hemicellulóz	
xilán (+ galaktán)	21,5
arabinán	11,8
egyéb	38,5

A hemicellulóz frakció xilózt, arabinózt és galaktózt tartalmaz, de a xilóz és galaktóz az általunk alkalmazott folyadékkromatográfiás oszlopon nem válik el, így ezek mennyiségét együtt határoztam meg. Az 5.1. táblázat tartalmazza a kapott eredményeket. A keményítőtartalmat a keményítőtartalom meghatározás során oldatba kerülő glükóz mennyiségéből számoltam. A cellulóztartalmat a keményítőtartalom meghatározás után a rostból felszabadítható glükóz mennyiségéből számoltam. A xilán- és arabinántartalmat a nyers kukoricarost savas hidrolízise (4.3.3.2.) során oldatba kerülő xilóz és arabinóz mennyiségéből számoltam.

5.2. A kukoricarost keményítőmentesítése

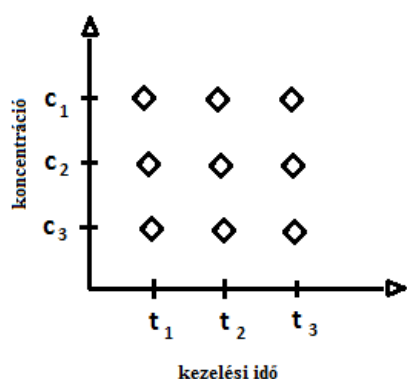
A keményítőmentesítés során az alapvető cél a rostban található keményítő kioldása volt a hemicellulóz frakció minimális hidrolízise mellett. Ehhez a keményítőmentesítést enyhe körülmények között kellett végezni (4.3.4.). Az keményítőmentesítés során oldatba került cukrok mennyiségét az 5.2. táblázat tartalmazza. A glükóz hozama a keményítőmentesítés során 52,2% volt, ami azt jelenti, hogy a cellulóz csak elhanyagolható mértékben hidrolizált, ugyanakkor a keményítő teljes mértékben oldatba került.

5.2. táblázat: A kukoricarost keményítőmentesítése során oldatba került cukrok hozama

komponens	glükóz	xilóz	arabinóz
átlag [%]	52,2	0,7	3,5
szórás [%]	8,1	1,9	1,0

5.3. A kukoricarost kénsavas kezelése

A kénsavas kezelés enyhe körülmények között a kukoricarost hemicellulóz frakcióját viszi oldatba. Számos kutatás – többek között *Badal C. Saha és Rodney J. Bothast* [14]; valamint *Kálmán Gergely* [5] kutatása – bizonyította a kénsavas kezelés sikerességét e tekintetben (2.3.5.1.). Eredményeik arra engednek következtetni, hogy az arabinóz érzékenyebb a savas hidrolízisre, ami lehetőséget adhat arra, hogy a savas kezelés során megfelelő körülményeket beállítva az arabinózt szelektíven vigyük oldatba. Az általam végzett savas kezelések során a kénsav-koncentráció és kezelési idő hatását vizsgáltam az arabinózhozam és a hidrolízis szelektivitása szempontjából. A paraméterek hatását keményítőmentesített kukoricaroston vizsgáltam, 90, 120 és 140°C-on, kísérleti tervek alapján. A kísérleti tervek lehetővé tették az elvégzendő kísérletek számának csökkentését.



5.1. ábra: Kísérleti terv a kukoricarost kénsavas kezeléséhez

A kísérleti terveim 3^2 típusúak voltak, ami azt jelenti, hogy 2 faktor – a kénsav-koncentráció és a kezelési idő – hatását vizsgáltam 3 szinten (5.1. ábra). Az eredmények statisztikai értékelését *Statistica 11* programmal végeztem. A program a betáplált mérési adatok alapján elsőfokú vagy másodfokú modellt állít fel, és ezek megfelelőségét vizsgálja. Így az általam elvégzett savas kezelések esetén a program az arabinóz- és xilózhozamokra állított fel modellt, a kénsav-koncentráció és a kezelési idő függvényében.

A centrumponthoz ($t_2; c_2$ – 5.1. ábra) végzett ismételt mérésekkel teljes ismétlés nélkül végrehajtott terv esetén is lehetőség van a véletlen hiba varianciájának modelltől független becslésére [45]. Ha a modell adekvát, akkor a centrumponthoz tartozó mérési adatok középértéke és az illesztett modell konstans tagjai közötti eltérést csak a véletlen okozhatja, azaz nincsen rendszeres hiba. Azt, hogy az adott lineáris modell adekvát-e, a számolt adatokat tartalmazó táblázat *Lack of fit* sorában található p érték adja meg. Ez a p érték annak a mértéke, hogy a modell mennyire illeszkedik a mért adatokhoz, azaz mennyire felel meg a valóságnak. Amennyiben p értéke nagyobb, mint 0,05, a lineáris modell adekvát, ha kisebb, a lineáris modell nem adekvát 5% szignifikanciaszinten vizsgálva. Adekvát lineáris modell esetén a mérési pontokra felület illeszthető, így az általunk mért pontok között is bármely pont jellemezhető, és az optimális paraméter értékek megállapíthatóak. (Nem adekvát lineáris modell esetén a program által illesztett felület, valamint a különböző paraméterek hatásaira

kapott eredmények nem elfogadhatók.) Amennyiben a lineáris modell nem adekvát, úgy felállítható másodfokú modell is, melynél a program minden esetben képes megfelelően illeszkedő felületet illeszteni a mért adatokra.

Az általam vizsgált savas hidrolízisek során egy adott kezelés sikerességének megállapításához a cukorhozamokon kívül az oldatba került cukrok tömegének összehasonlítása is szükséges volt. Ennek oka, hogy a hemicellulóz frakció nagyobb mennyiségű xilózt tartalmaz, mint arabinózt, és a hozamértékek nem a hemicellulózra vonatkoznak, hanem az összes xilóz és összes arabinóz mennyiségére. A hidrolízisek szelektivitását ezért az arabinóz egyéb cukrokhoz viszonyított arányával érdemes jellemezni. Az értékeléseknél ún. tisztasági hányadost számolok (a későbbiekben a szűrletek „tisztaságaként” említem), melyet az arabinóz és az egyéb cukrok (xilóz, galaktóz, és glükóz) hányadosaként definiáltam. Az általunk használt folyadékkromatográfiás oszlopon a xilóz és galaktóz nem válik el egymástól, így ezek mennyiségét együtt határoztam meg. Mivel a tisztasági hányadosok számolása során nem szükséges külön kezelni a xilóz és galaktóz mennyiségét, így ebben a fejezetben a két komponens együttes mennyiségével számolok, és csak xilózként említem. A kezelések során oldatba kerülő oligomereket a 4.3.5. pontban leírtak alapján hidrolizáltam monomerekké. Erre a hidrolizáló lépésre a jövőben utósavazásként, vagy oligomer-savazásként hivatkozom.

5.3. táblázat: Az általam elvégzett kénsavas kezelések paraméterei

<i>hőmérséklet [°C]</i>	<i>savkoncentráció három értéke [%]</i>	<i>kezelési idő három értéke [perc]</i>
90	0; 0,5; 1	5; 30; 55
90	1; 3; 5	5; 10; 15
90	0; 0,25; 0,5	60; 90; 120
120	0,15; 0,45; 0,75	5; 10; 15
140	0,15; 0,45; 0,75	5; 10; 15

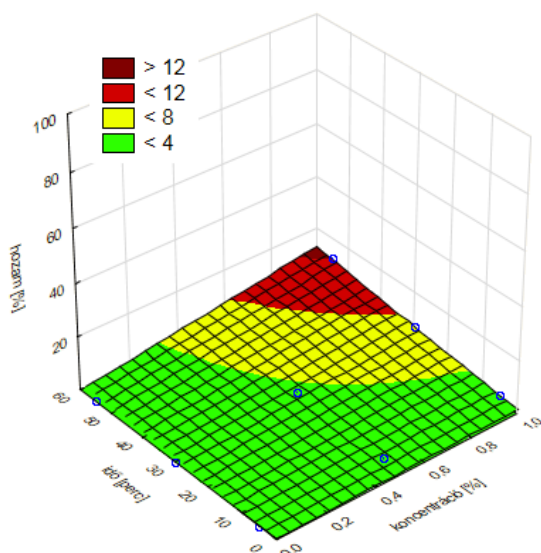
A végrehajtott kénsavas kezelések paramétereit az 5.3. táblázat foglalja össze. A 120 és 140°C-on végrehajtott kezelésekkel (Függelék 8.1. a, b és 8.2. táblázatok) a hemicellulóz frakciót csaknem teljesen sikerült oldatba vinni, emiatt ezek a kezelések az arabinóz szelektív kinyerése szempontjából nem bizonyultak alkalmasnak.

5.3.1. A kukoricarost kénsavas kezelése 90°C-on

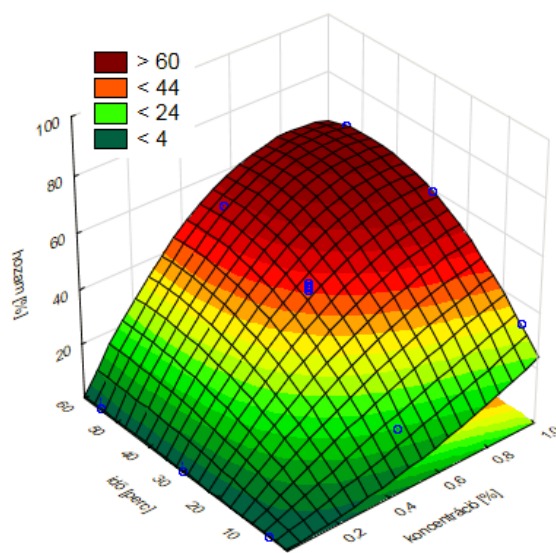
Az itt bemutatott kísérleti terv esetén a kénsav-koncentráció három értéke 0; 0,5 és 1%, a kezelési idő három értéke 5; 30 és 55 perc volt. Az 5.4. táblázat a 90°C-on végzett kísérleti terv esetén monomer formában oldatba kerülő cukrok mennyiségét és hozamát, valamint a kezelési pontokban számolt tisztasági hányadosok értékét tartalmazza. A xilóz hozamára illesztett lineáris modell adekvátnak bizonyult: p értéke 0,09346 (Függelék 8.3. b táblázat), a program által illesztett felület az 5.2. a ábrán látható. Az arabinóz hozamára adekvát lineáris modell nem illeszthető, csak másodfokú: az illesztett felület az 5.2. b ábrán látható.

5.4. táblázat: A kukoricarost 90°C-os kénsavas kezelése során monomer formában oldatba kerülő cukrok mennyisége, hozama, valamint a tisztasági hányadosok értéke (nd: nem detektálható)

savkoncentráció (%)	idő (perc)	glükóz (mg/g szárazanyag)	glükóz (%)	xilóz (mg/g szárazanyag)	xilóz (%)	arabinóz (mg/g szárazanyag)	arabinóz (%)	tisztasági hányados
0,0	5	nd	-	nd	-	0,7	0,5	-
0,0	30	nd	-	nd	-	1,0	0,6	-
0,0	55	nd	-	nd	-	1,2	0,7	-
0,5	5	nd	-	3,8	1,2	26,4	16,1	6,9
0,5	30	1,4	0,6	11,0	3,5	74,6	45,4	6,0
0,5	55	1,4	0,6	16,8	5,3	88,8	54,0	4,9
1,0	5	1,3	0,6	7,3	2,3	52,7	32,1	6,1
1,0	30	1,6	0,7	22,7	7,1	97,9	59,6	4,0
1,0	55	1,7	0,7	39,4	12,4	105,3	64,1	2,6



5.2. a ábra: A 90°C-os kezelések során monomerként oldatba kerülő xilóz hozamára illesztett modell



5.2. b ábra: A 90°C-os kezelések során monomerként oldatba kerülő arabinóz hozamára illesztett modell

A kezelés hatására glükóz a legtöbb mérési pontban csak elhanyagolható mértékben hidrolizált: a legerélyesebb mérési pontban (1% savkoncentráció, 55 perc kezelési idő) az elméletileg kinyerhető mennyiség 0,5%-a került oldatba. Nulla százalék savkoncentrációnál hidrolizált xilóz nem detektálható, az arabinózkinyerés 1% alatti. Fél százalék savkoncentrációnál a xilózhozam 1-6% között, mellette az arabinózhozam 16-55% között változik – a kezelési idővel növekszik. A legmagasabb hozamokat 1% kénsavkoncentrációnál, 55 perc kezelési időnél értem el: itt a xilóz 12,4%-a és az arabinóz 64,1%-a került oldatba, ez 1 g szárazanyagra vonatkoztatva 105,3 mg arabinózt és 39,4 mg xilózt jelent. Nulla százalék savkoncentrációnál az arabinóz mellett egyéb cukor nem volt detektálható a szűrletekben, így itt a tisztasági hányados matematikailag nem értelmezhető. A legnagyobb tisztaságot 0,5% kénsavkoncentrációnál, 5 perc kezelési időnél értem el, itt az értéke 6,9, de az arabinózhozam ebben a kezelési pontban csak 16,1%. Amely kezeléseknél magasabb arabinózhozamot értem el, ott a tisztasági hányados minden esetben kisebb. Az utósavazással elért hozamok minden kezelési pontban nagyobbak, mint az utósavazás nélküliek (Függelék 8.3. táblázat). A legerélyesebb kezelési pontban az arabinóz 83,5%-a, és mellette a xilóz 58,3%-a került oldatba. A hozamok növekedése mellett a tisztasági hányadosok minden pontban kisebbek, mint utósavazás nélkül.

A 90°C-on végzett kezelések tisztasága az oligomerek savazása nélkül lényegesen jobb, mint a 120 és 140°C-on végzett kezeléseké, ugyanakkor az elért arabinózhozamok lényegesen

kisebbség. Ahhoz, hogy hasonló tisztaságú, de magasabb arabinóztartalmú hidrolizátumokat kapjak, a 90°C-os kezeléseket elvégeztem megnövelt kénsav-koncentrációval (1; 3; 5%, Függelék 8.4. a és b táblázatok), valamint megnövelt kezelési idővel (60; 90; 120 perc, Függelék 8.5. a és b táblázatok) is (5.3. táblázat).

A 90°C-os kezelések során elért arabinózhozamok – a legerélyesebb kezelési pontokat tekintve – 60-80% közöttiek voltak, de egyik esetben sem sikerült az arabinózt monomer formában szelektíven oldatba vinni. Az összes végrehajtott kísérleti terv alapján megállapítható, hogy a szűrletek utósavazása rontja a tisztaságukat, ami arra utal, hogy a kezelések során oldatba kerülő oligomereket elsősorban xilóz és csak kisebb mennyiségű arabinóz építi fel. Az általam végrehajtott kísérletek során azt tapasztaltam, hogy kisebb arabinózhozam mellett nagyobb tisztaság érhető el, nagyobb hozam mellett a tisztaság csökken. Az arabinóz mellett minden esetben jelen volt xilóz (és galaktóz). Ez alapján teljesen tiszta arabinózzoldatot nem lehet előállítani a kukoricarost kénsavas hidrolízisével, ugyanakkor egy arabinózban gazdag frakció létrehozható. Ahhoz, hogy ebből az arabinózban gazdag frakcióból az arabinózt kinyerjük, az egyéb cukrokat el kell távolítani az oldatból. Erre adhat lehetőséget az élesztőkkel történő biotisztítás. A kukoricarost-hidrolizátum biotisztítása előtt a kiválasztott élesztőkkel előzetes kísérleteket végeztem a hemicellulóz frakcióban található cukrok fogyasztásának feltérképezésére modellszubsztrát-oldaton.

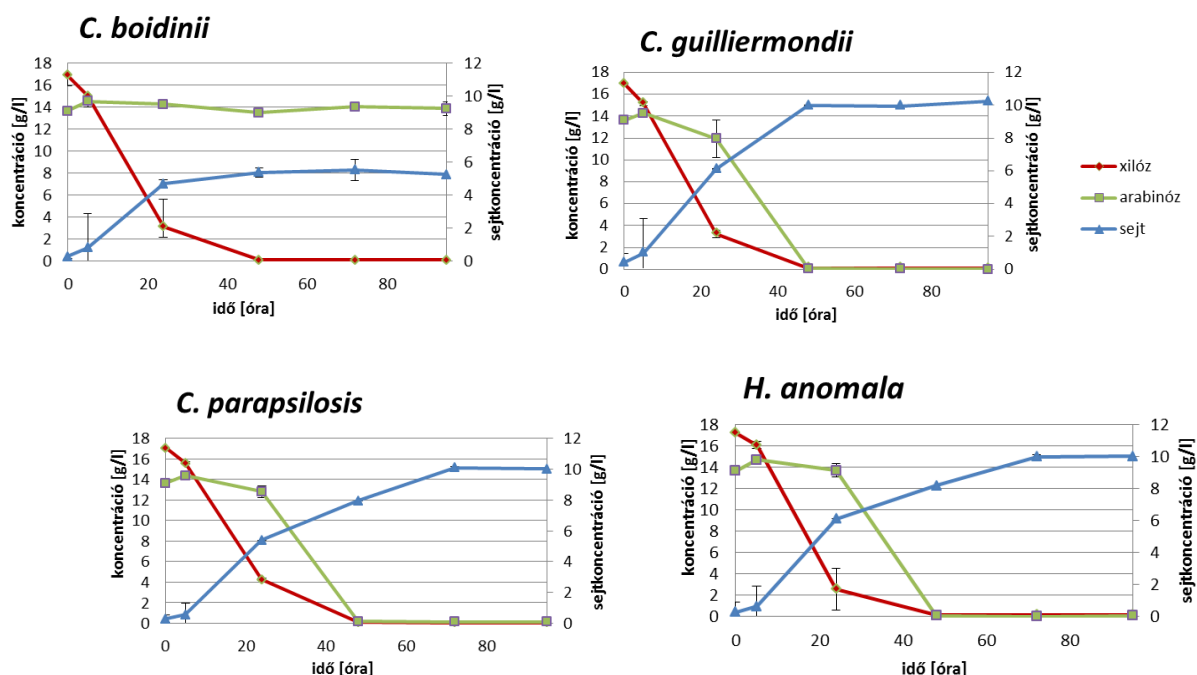
5.3.2. A sejtkoncentráció számítása

Az élesztőkkel végzett biotisztítási és xilitfermentációs kísérletek során vett mintákban a sejtkoncentrációt optikai denzitás méréssel határoztam meg. A számoláshoz használt kalibrációt a 4.3.9. pontban leírt módszer alapján készítettem. Eszerint a koncentráció és abszorbancia közötti összefüggés: $y = 0,4236x - 0,012$, ahol y a sejtkoncentráció g/l egységben, és x a 600 nm-en mért abszorbancia.

5.3.3. Biotisztítás xilóz- és arabinóztartalmú tápoldaton

Az élesztősejtekkel végzett fermentációk első lépése minden esetben a sejtek felszaporítása. Az első két biotisztítási kísérletben a sejteket 30 g/l glükóz-, illetve xilózzoldaton szaporítottam fel, így az értékelésnél az is vizsgálható, hogy hatással van-e, és ha igen, milyen hatással van a sejtek növekedésére, illetve a xilózhasznosítás sebességére a sejtszaporításhoz használt cukor minősége. A biotisztítás tápadatai mindkét esetben 15 g/l xilózt és 15 g/l arabinózt tartalmaztak, a biotisztítási kísérleteket *C. boidinii*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* és *H. anomala* törzsekkel végeztem. Az eredmények (5.3. ábra és Függelék 8.1. ábra) azt mutatták,

hogy a fermentáció során az élesztősejtek szaporodási sebessége xilóztartalmú tápoldaton történő sejtszaporítás után nagyobb, mint glükóztartalmú tápoldat esetén. Ezek alapján a további kísérletekhez a sejteket minden esetben xilóztartalmú tápoldaton szaporítottam fel.

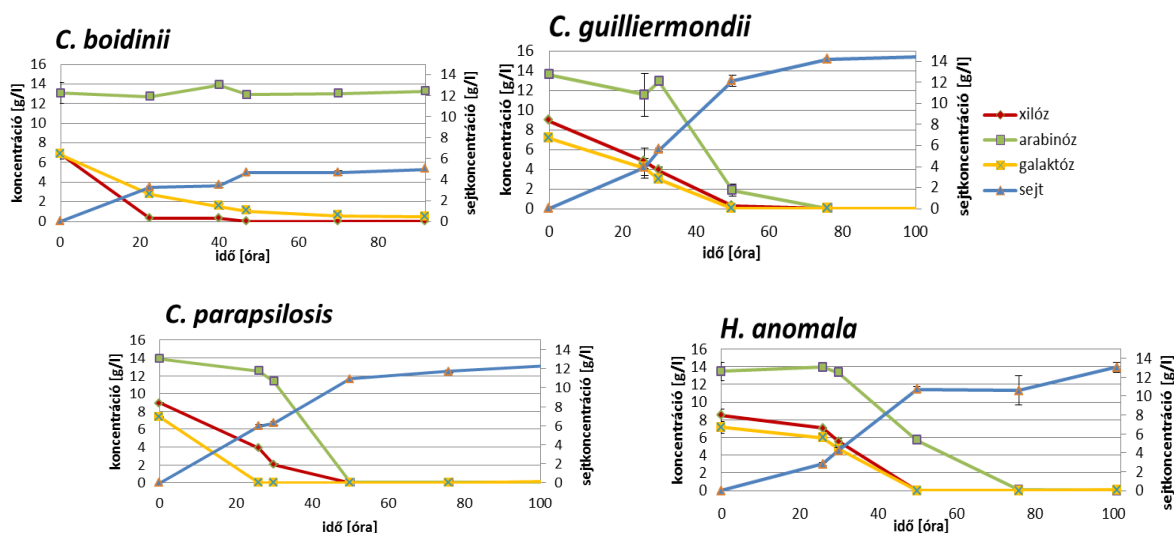


5.3. ábra: A xilóz-, arabinóz- és sejtkoncentráció változása a négy élesztőtörzs esetén, 15 g/l xilóz- és 15 g/l arabinóztartalmú tápoldaton végzett biotisztítási kísérlet során

A négy élesztőtörzzsel végzett kísérlet során *C. boidinii* a xilózt 48 óra alatt teljes mértékben elfogyasztotta az oldatból, de az arabinózt nem metabolizálta (5.3. ábra). Ezzel szemben a másik három törzs 48 óra alatt mind a xilózt, mind az arabinózt teljes mértékben elfogyasztotta. *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* és *H. anomala* esetén megfigyelhető, hogy az élesztők a xilózt gyorsabban fogyasztották, mint az arabinózt, de a 48. órára mindkettőt teljesen elfogyasztották. Eközben a sejtkoncentráció görbéje a három törzs esetén hasonló lefutást mutat, a 95. órában a sejtkoncentráció 10-10,2 g/l közötti, míg *C. boidinii* esetén ennek körülbelül a fele, 5,3 g/l.

5.3.4. Biotisztítás xilóz-, arabinóz-, és galaktóztartalmú tápoldaton

A biotisztítás 15 g/l arabinóz-, 7,5 g/l xilóz- és 7,5 g/l galaktóztartalmú tápoldatban folyt. Galaktózt is tartalmazó tápoldaton azért vizsgáltam a biotisztítás lefolyását, mert a kukoricarostból származó hidrolizátum a xilóz és arabinóz mellett jelentős mennyiségű galaktózt is tartalmazhat.



5.4. ábra: A xilóz-, arabinóz-, galaktóz- és sejtkoncentráció változása a négy élesztőtörzs esetén 7,5 g/l xilóz-, 15 g/l arabinóz-, és 7,5 g/l galaktóztartalmú tápoldaton végzett biotisztítási kísérlet során

C. guilliermondii, *C. parapsilosis* és *H. anomala* a biotisztítás során mindhárom cukrot elfogyasztotta. *C. boidinii* a xilózt, valamint a galaktózt 93%-át elfogyasztotta, ugyanakkor az arabinóz mennyisége nem változott a biotisztítás során (5.4. ábra). *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* és *H. anomala* esetén ez esetben is hasonló a görbék lefutása. Mindhárom élesztő elsőként a xilózt és galaktózt kezdte fogyasztani, és az arabinózt csak később. A 48. órára *C. parapsilosis* mindhárom cukrot teljesen elfogyasztotta, míg *C. guilliermondii* és *H. anomala* az arabinózt csak a 76. órára fogyasztotta el. A sejtkoncentráció értéke a biotisztítás végén *C. boidinii* esetén 5,4 g/l, míg a másik három törzs esetén ez esetben is körülbelül kétszer akkora, 12-14 g/l. A négy élesztőtörzs közül a *C. boidinii* az egyetlen, amelyik az arabinózt egyáltalán nem, a xilózt és galaktózt viszont felhasználta az oldatból.

A biotisztítási kísérletek eredményei alapján a vizsgált négy élesztőtörzs közül a *C. boidinii* bizonyult a szelektív cukorhasznosításra leginkább megfelelőnek, ezért a kukoricarost-hidrolizátum biotisztítását ezzel a törzsszel végeztem.

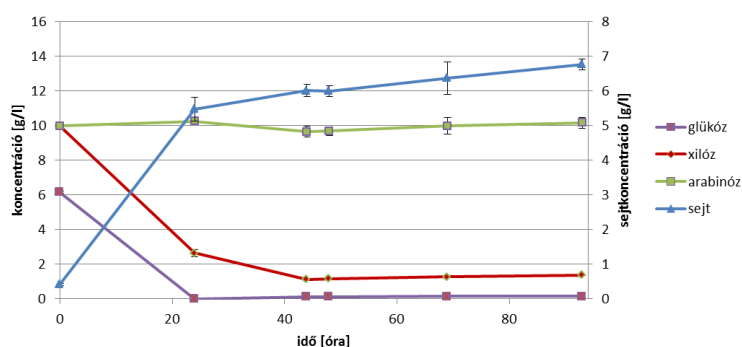
5.3.5. Kukoricarost-hidrolizátum biotisztítása *Candida boidinii*-vel

Az előzőekben modellszubsztrát-oldaton vizsgált biotisztítási kísérletet elvégeztem kukoricarost-hidrolizátumon is. A hidrolizátumot a 4.3.11. pontban leírtak alapján készítettem. A hidrolízis során oldatba került cukrok mennyiségét tartalmazza az 5.5. táblázat.

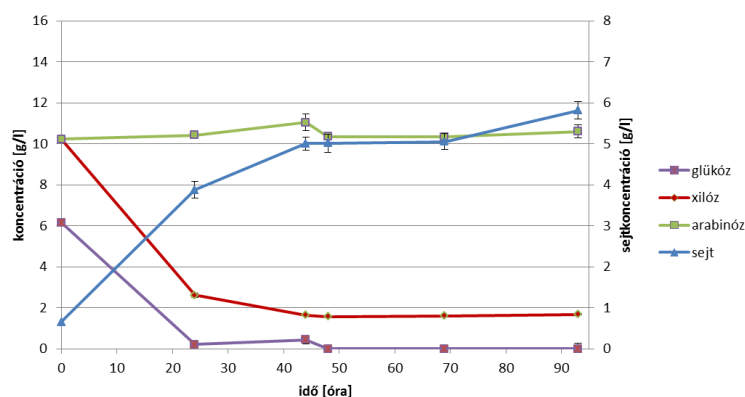
5.5. táblázat: A kukoricarost hidrolízise során monomer formában oldatba kerülő cukrok hozama mg/g-ban, illetve százalékban

	glükóz	xilóz (+galaktóz)	arabinóz
[mg/g szárazanyag]	62,1	102,5	108,3
[%]	17,5	42,4	79,8

A kukoricarost-hidrolizátum biotisztítását elvégeztem tápsó kiegészítéssel (15 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ és 10 g/l élesztőkivonat) és anélkül is (5.5. a és b ábra). A sejtek mindkét esetben folyamatosan növekedtek, miközben a glükózt és a xilóz nagy részét elfogyasztották a fermentleából. A sejtkoncentráció a kísérlet végén 6-7 g/l közötti volt. A xilóz (és galaktóz) egy részét – akárcsak a modellszubsztrát-oldaton végzett biotisztítási kísérlet során – most sem fogyasztotta el az élesztő: tápsó kiegészítés nélkül a xilóz (és galaktóz) 14%-a, tápsó kiegészítéssel a 16%-a maradt a fermentleében. Az arabinózkoncentráció végig változatlan volt, akárcsak a modellszubsztrát-oldaton történő biotisztítások során: az élesztő akkor sem fogyasztotta az arabinózt, amikor a glükóz már elfogyott (24. óra), illetve a xilóz (és galaktóz) mennyisége beállt a végső, állandó értékre (44. óra).



5.5.a ábra: Kukoricarost-hidrolizátum biotisztítása *C. boidinii*-vel, tápsó kiegészítés nélkül



5.5. b ábra: Kukoricarost-hidrolizátum biotisztítása *C. boidinii*-vel, tápsók hozzáadásával

Összességében megállapítható, hogy a kukoricarost-hidrolizátum biotisztításának lefutása megegyezett a modellszubsztrát-oldaton történt biotisztításokkal: a glükózt teljes mértékben, a xilóz és galaktóz körülbelül 83-86%-át elfogyasztotta az élesztő, azonban az arabinóz koncentrációja végig változatlan maradt.

A szakirodalomban található cikkek alapján a *C. boidinii* törzs megfelelő körülmények között képes a xilózt xilitté redukálni, így a továbbiakban a xilitfermentáció lefutását, és az ezt befolyásoló paramétereket vizsgáltam ezzel a törzsszel.

5.3.6. Mosott sejtes xilitfermentáció *C. boidinii*-vel modellszubsztrát-oldaton

Ahogy a 2.5.1.2.2. fejezetből látható, a xilittermelést számos paraméter befolyásolja. Kísérleteim során ezek közül az oxigénellátottság, a kezdeti sejt-, illetve xilózkoncentráció, a pH, valamint a hozzáadott metil-alkohol és glicerín hatását vizsgáltam. A vizsgálatok során rázatott lombikos kísérleteket végeztem, melyeknél az oxigénellátottság a rázás fordulatszámanak, valamint a lombikok töltöttségének változtatásával befolyásolható. A kísérletek 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokban folytak, a töltöttség vizsgált értékei 35, 50 és 65 ml, a rázás fordulatszámai 220 és 125 rpm voltak. A kezdeti sejtkoncentrációk 1, illetve 5 g/l, a kezdeti xilózkoncentrációk 30 és 75 g/l voltak. A fermentációk során beállított paraméterkombinációkat mutatja az 5.6. táblázat.

5.6. táblázat: A mosott sejtes xilitfermentációknál beállított fordulatszám, töltöttség, kezdeti sejt- és xilózkoncentráció értékei, a különböző kombinációknál elért legnagyobb xilithozam ideje és értéke, a legnagyobb xilit- és a kiindulási xilózkoncentráció, valamint a legnagyobb xilithozamhoz tartozó produktivitás értéke

fordulatszám [rpm]	töltöttség [ml/ml]	sejtkoncentráció [g/l]	xilózkoncentráció [g/l]		maximális xilitkoncentráció [g/l]	idő [óra]	kiindulási xilózkoncentráció [g/l]	hozam [%]	produktivitás [g/(l*h)]
125	100/35	1	30		12,2	26	30,7	39	0,5
125	100/50	1	30		11,8	47,5	26,9	43	0,2
125	100/65	1	30		8,4	50	30,4	27	0,2
220	100/35	1	30		8,2	47,5	36,2	22	0,2
220	100/50	1	30		7,8	26	30,7	25	0,3
220	100/65	1	30		7,8	47,5	27,3	28	0,2
125	100/35	5	30		10,6	47,5	25,4	41	0,2
125	100/50	5	30		16,6	21	27,2	60	0,8
125	100/35	1	75		25,9	72,5	67,6	38	0,4
125	100/50	5	75		39,4	50	64,2	61	0,8
125	100/35	1	30	pH 5	11,5	49	29,5	38	0,2
125	100/35	1	30	pH 7	12,6	49	33,1	38	0,3
125	100/35	1	30	6,8 g/l MeOH	14,6	49	30,4	48	0,3
125	100/35	1	30	8,1 g/l glicerín	12,9	49	30,6	42	0,3
125	100/50	5	75	7,8 g/l MeOH	41,3	69	64,8	63	0,6

Az 5.6. táblázatban szereplő xilithozamot az elért legnagyobb xilitkoncentrációból és az elméletileg elérhető maximális xilitkoncentrációból számítottam a következő képlettel:

$$\text{hozam}[\%] = 100\% \times \frac{\text{elért legmagasabb xilitkoncentráció } [\frac{g}{l}]}{\left(\frac{152}{150} \times \text{kiindulási xilózkoncentráció } [\frac{g}{l}]\right)}$$

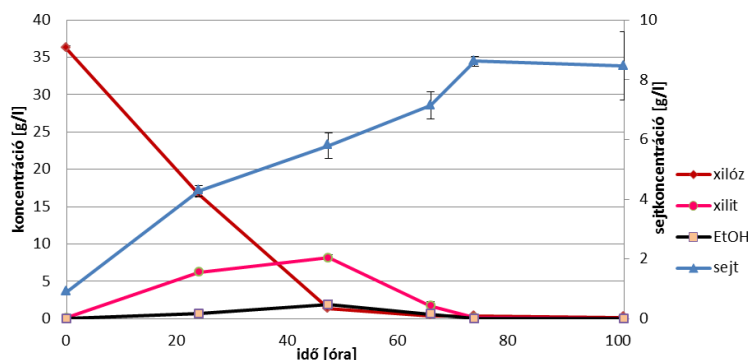
A produktivitást az elért legnagyobb xilitkoncentrációból és az ehhez szükséges időből számoltam a következő képlettel:

$$\text{produktivitás } [\frac{g}{lh}] = \frac{\text{elért legmagasabb xilitkoncentráció } [\frac{g}{l}]}{\text{a legmagasabb xilitkoncentráció eléréséig eltelt idő [h]}}$$

A xilitfermentációk értékelésénél általam használt produktivitás értékek, valamint az ezek közötti eltérések csak tájékoztató jellegűek, mert – a körülbelül 24 óránként vett minták

alapján – nem állapítható meg pontosan, hogy mikor volt a xilitkoncentráció maximális egy adott fermentáció során.

5.3.6.1. A levegőztetés és pH hatása



5.6. ábra: Az 1 g/l kiindulási sejt-, és 30 g/l kiindulási xilózkoncentrációval, 35 ml töltöttség és 125 rpm fordulatszámú rázatás mellett folytatott fermentáció lefutása

Az 5.6. ábrán bemutatott fermentáció során a sejtömeg körülbelül 1 g/l-ről indulva folyamatosan növekedett, miközben a xilóz, körülbelül 48 óra alatt teljes mértékben elfogyott. A fermentáció során a sejtek xilitet állítottak elő, de amint a xilózt már elfogyasztották az oldatból, a xilitet is felhasználták. Ez alapján a fermentációkat a maximális xilitkoncentráció elérésekor le kell állítani. A xilittel párhuzamosan kis mennyiségű etil-alkohol is képződött (47,5 óránál 1,9 g/l), de körülbelül a xilittel egy időben el is fogyott.

Százhuszonöt rpm fordulatszámú rázatásnál a 30 g/l kiindulási xilóz- és 1 g/l kiindulási sejt koncentrációval végzett fermentációk közül az elért xilithozam ötvenmilliliteres töltöttségnél volt a legnagyobb: 43%. A sejtek 47,5 óra alatt 11,8 g/l koncentrációjú xilitet állítottak elő. Harmincöt milliliteres töltöttségnél 26 óra alatt a sejtek 12,2 g/l xilitet termeltek (39% hozam). Hatvanöt milliliteres töltöttségnél az elért legnagyobb xilitkoncentráció 8,4 g/l volt, 50 óra alatt (27% hozam). A legnagyobb xilitkoncentráció elérésekor a sejt koncentráció mindhárom töltöttség esetén körülbelül 2,5 g/l volt, ez alapján megállapítható, hogy a nagyobb hozam nem a nagyobb sejtsűrűségnek volt köszönhető, hanem a levegőztetésnek. Az eredmény megegyezik az irodalomban talált eredményekkel, miszerint kis oxigénellátottság mellett a *xilit-dehidrogenáz* enzim gátolt, így a xilit felhalmozódik, és nem alakul tovább D-xilulózzá, valamint, hogy az oldott oxigénellátottságnak van egy kritikus értéke, melynél a xilithozam nagy, viszont a sejtömeg-hozam kicsi [26], [28].

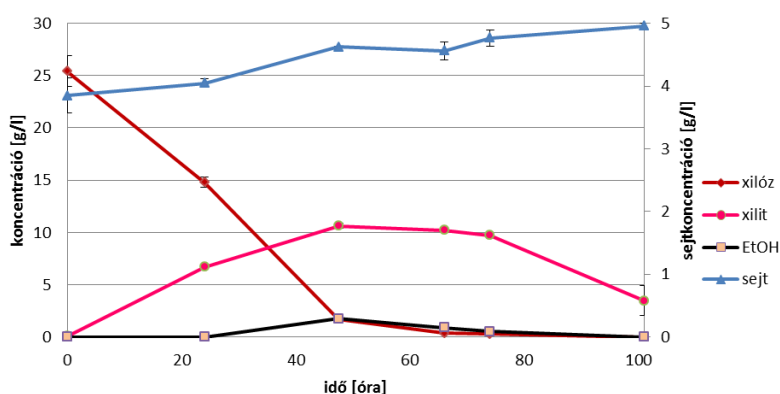
Kétszázhusz rpm fordulatszámú rázatásnál a 30 g/l kiindulási xilóz- és 1 g/l kiindulási sejt koncentrációval végzett fermentációk során az elért xilithozam a töltöttséggel nőtt.

Harmincöt milliliteres töltöttségnél az elért legnagyobb xilitkoncentráció 8,2 g/l volt 47,5 óra alatt (22% hozam). Ötvenmilliliteres töltöttségnél a sejtek 26 óra alatt 7,9 g/l (25% hozam), hatvanöt milliliteres töltöttségnél 47,5 óra alatt 7,8 g/l koncentrációjú xilitet állítottak elő (28% hozam). A hozamok a töltöttség függvényében növekvő tendenciát mutattak, ugyanakkor a legnagyobb xilitkoncentráció elérésekor mért sejtkoncentráció a töltöttséggel csökkent. Tehát a nagyobb hozamot ez esetben sem a nagyobb sejtkoncentráció okozta, hanem az oldott oxigén megfelelő mennyisége.

A 30 g/l kiindulási xilóz- és 1 g/l kiindulási sejtkoncentrációval végzett fermentációk esetén 35 és 50 ml-es töltöttségnél 125 rpm fordulatszámú rázatásnál nagyobb hozamokat kaptam, mint azonos töltöttségnél 220 rpm fordulatszámú rázatás mellett. A produktivitás 125 rpm rázatásnál 35 ml töltöttség esetén nagyobb, 50 ml töltöttség esetén kisebb, mint 220 rpm fordulatszámú rázatás esetén azonos töltöttségeknél. Hatvanöt milliliteres töltöttségnél a hozamok és a produktivitások közel egyenlőnek adódtak a két fordulatszám esetén.

A fermentációk során alkalmazott tápoldatok pH-ja 5,95 volt. Megvizsgáltam a fermentáció során állandó 5, illetve 7 értéken tartott pH hatását. Ezeknél a kísérleteknél minden mintavétel alkalmával egy tizedesjegy pontosságra beállítottam 10% NaOH- vagy 10% HCl-oldattal a pH-t. A fermentációkat 125 rpm fordulatszámú rázatás, 1 g/l kiindulási sejt- és 30 g/l kiindulási xilózkoncentráció mellett végeztem, 35 ml-es töltöttségnél. Az ugyanilyen beállításnál, pH állítás nélkül végzett fermentációkhoz képest a hozam nem lett nagyobb, ugyanakkor a produktivitás mindkét esetben körülbelül a felére csökkent.

5.3.6.2. A megnövelt kiindulási sejtkoncentráció hatása



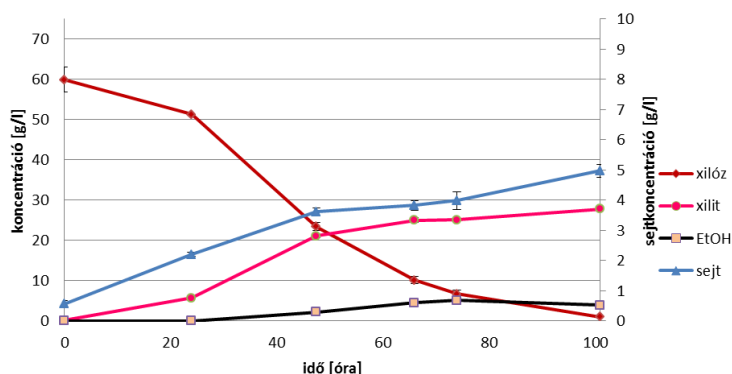
5.7. ábra: Az 5 g/l kiindulási sejt-, és 30 g/l kiindulási xilózkoncentrációval, 35 ml töltöttség és 125 rpm fordulatszámú rázatás mellett folytatott fermentáció lefutása

Az 5 g/l kiindulási sejt- és 30 g/l kiindulási xilózkoncentrációval végzett kísérletek során a sejt-tömeg csak 20-30%-kal növekedett, miközben a xilóz 50 óra alatt csaknem teljes mértékben elfogyott (5.7. ábra). A fermentáció során a sejtek xilitet állítottak elő, de amint a xilózt már elfogyasztották az oldatból, a xilitet is elkezdték felhasználni, akárcsak az 1 g/l kiindulási sejt-koncentrációval végzett fermentáció esetén (5.6. ábra). Etanol ez esetben is képződött, de körülbelül a xilittel egy időben el is fogyott.

Az megnövelt kiindulási sejt-koncentráció hatását 125 rpm fordulatszámú rázatás, 30 g/l kiindulási xilózkoncentráció mellett 35 és 50 ml-es töltöttségnél vizsgáltam. A kiindulási sejt-koncentráció mindkét esetben 5 g/l volt. Harmincöt milliliteres töltöttségnél a legnagyobb xilit-koncentráció 47,5 óránál volt, 10,6 g/l (41% hozam). Ötvenmilliliteres töltöttségnél ez 21 óránál, 16,6 g/l volt (60% hozam). Megnövelt kiindulási sejt-koncentrációval, 35 ml töltöttségnél a hozam mindössze 2%-kal volt nagyobb (41%), mint 1 g/l sejt-koncentrációval (39%). Ötven ml töltöttségnél 5 g/l kiindulási sejt-koncentráció esetén a hozam 17%-al nagyobb volt (60%), mint ugyanolyan beállítások mellett 1 g/l kiindulási sejt-koncentrációval (43%). Az eredmények alapján a nagyobb kiindulási sejt-koncentráció nagyobb hozamot eredményez ugyanolyan beállítások mellett.

5.3.6.3. A megnövelt kiindulási xilózkoncentráció hatása

A megnövelt kiindulási xilózkoncentráció hatását 125 rpm fordulatszámú rázatás és 1 g/l kiindulási sejt-koncentráció mellett, 35 ml-es töltöttségnél vizsgáltam (5.8. ábra). A kiindulási xilózkoncentráció 75 g/l volt.

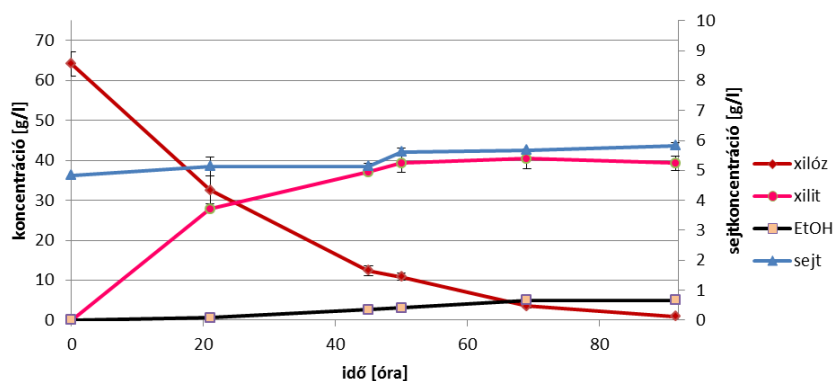


5.8. ábra: Az 1 g/l kiindulási sejt-, és 75 g/l kiindulási xilózkoncentrációval, 35 ml töltöttség és 125 rpm fordulatszámú rázatás mellett folytatott fermentáció lefutása

A fermentáció során a sejtek a xilitet nem fogyasztották, mert a kísérlet végéig a nagy mennyiségű xilóz nem fogyott el az oldatból. Ez esetben is képződött etil-alkohol, ami a

fermentáció ideje alatt szintén nem fogyott el. Az ugyanilyen beállítással, 30 g/l kiindulási xilózkoncentrációjú fermentációval (39% hozam, 0,5 g/(l*h) produktivitás) körülbelül azonos hozamot értem el (38%), ugyanakkor a produktivitás kisebbnek adódott (0,4 g/(l*h)).

5.3.6.4. A megnövelt kiindulási sejt- és xilózkoncentráció együttes hatása



5.9. ábra: Az 5 g/l kiindulási sejt-, és 75 g/l kiindulási xilózkoncentrációval, 35 ml töltöttség és 125 rpm fordulatszámú rázatás mellett folytatott fermentáció lefutása

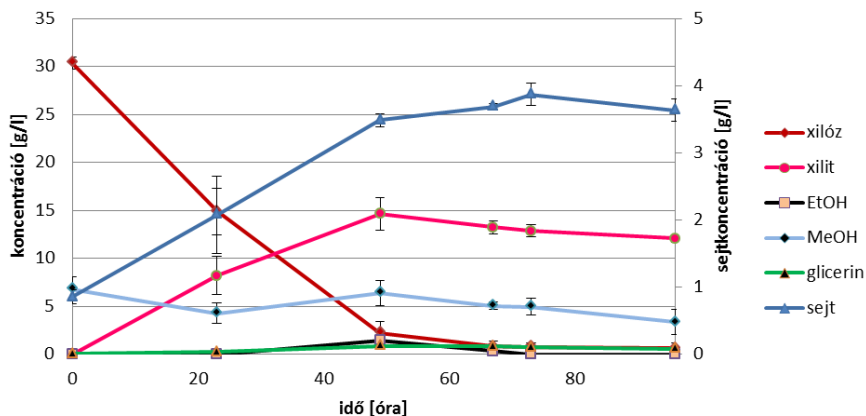
Az 5 g/l kiindulási sejtkoncentrációval és 75 g/l kiindulási xilózkoncentrációval folytatott fermentáció lefutását mutatja az 5.9. ábra. A fermentáció során a sejtömeg csak körülbelül 20%-kal növekedett, miközben a sejtek a xilózt fogyasztották. A xilitet nem fogyasztották a sejtek a fermentáció alatt, mert a nagy mennyiségű xilóz nem fogyott el az oldatból. Etanol ez esetben is képződött, de a fermentáció ideje alatt nem fogyott el.

A megnövelt kiindulási sejt- és xilózkoncentráció hatására az ugyanilyen körülmények között (50 ml-es töltöttség, 125 rpm fordulatszámú rázatás) mellett, megnövelt sejtkoncentrációval végzett fermentációval (60% hozam, 0,8 g/(l*h) produktivitás) körülbelül megegyező hozamot és produktivitást (61 % hozam, 0,8 g/(l*h)) értem el.

5.3.6.5. A hozzáadott metil-alkohol és glicerín hatása

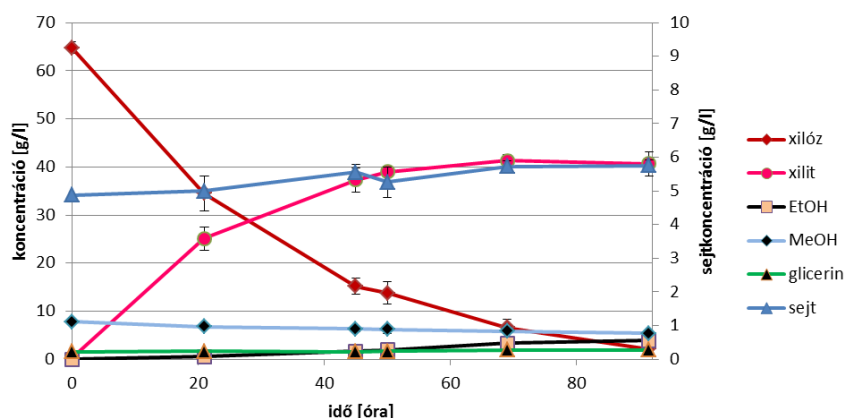
A hozzáadott metil-alkohol hatását 35 ml-es töltöttségnél, 1 g/l kiindulási sejt-, 30 g/l kiindulási xilózkoncentrációval és 6,8 g/l hozzáadott metil-alkohollal, 125 rpm fordulatszámú rázatás mellett végzett fermentáció során vizsgáltam (5.10. ábra). A metil-alkohol a fermentáció alatt körülbelül a felére csökkent, 6,8 g/l-ről 3,3 g/l-re. A fermentációban levő xilóz körülbelül 67 óra alatt fogyott el, innentől a xilit mennyisége is csökkent, a fermentáció végéig körülbelül 20%-kal. Glicerín, és etil-alkohol is képződött: glicerín a 92. óráig 0,6 g/l mennyiségben, etanol az 50. óráig 0,8 g/l mennyiségben, de az etanol a 92. órára el is fogyott.

Az 1 g/l kiindulási sejt- és 30 g/l kiindulási xilózkoncentrációval, 35 ml töltöttségnél és 125 rpm fordulatszámú rázatással végzett fermentációhoz (39% hozam) képest a hozzáadott metil-alkohollal 1,2-szeres hozamot (48%), ugyanakkor körülbelül kétharmad-akkora produktivitást értem el. Az elért legnagyobb xilitkoncentráció 14,7 g/l volt, 49 óra alatt.



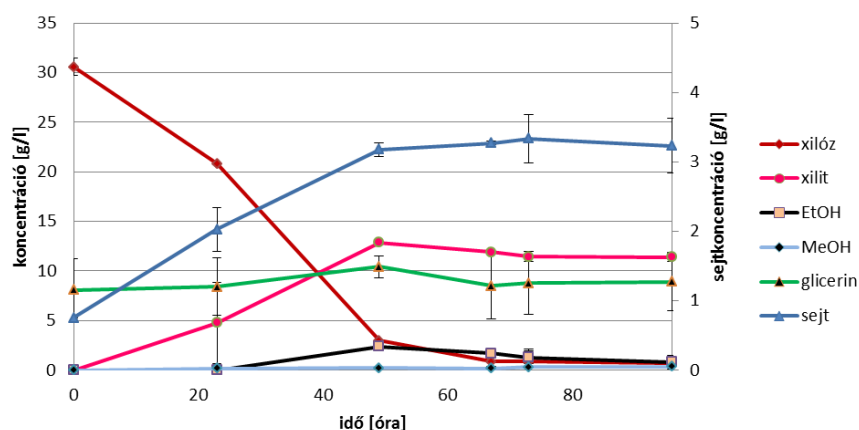
5.10. ábra: Az 1 g/l kiindulási sejt-, 30 g/l kiindulási xilózkoncentrációval, 7 g/l hozzáadott metil-alkohollal, 35 ml töltöttség és 125 rpm fordulatszámú rázatás mellett folytatott fermentáció lefutása

A metil-alkohol hatását vizsgáltam megnövelt kiindulási sejt- és xilózkoncentráció mellett is (50 ml-es töltöttség, 5 g/l kiindulási sejt-, 75 g/l kiindulási xilózkoncentráció, 8 g/l metil-alkohol, 125 rpm fordulatszámú rázatás, 5.11. ábra). A xilóz körülbelül 92 óra alatt fogyott el, ez alatt a sejtek végig xilitet termeltek és a sejtömeg csak kis mértékben növekedett. A metanol hatására az ugyanilyen beállításnál, metanol hozzáadása nélkül végzett fermentációhoz (61% hozam, 0,8 g/(l*h) produktivitás) képest csak körülbelül 2%-kal nagyobb hozamot, 63%-ot értem el, és a produktivitás is kisebb volt: 0,6. Az elért legnagyobb xilitkoncentráció is körülbelül azonos volt: metil-alkohol nélkül 39,4 g/l, metanollal 41,3 g/l volt.



5.11. ábra: Az 5 g/l kiindulási sejt-, 75 g/l kiindulási xilózkoncentrációval, 8 g/l hozzáadott metil-alkohollal, 50 ml töltöttség és 125 rpm fordulatszámú rázatás mellett folytatott fermentáció lefutása

A hozzáadott glicerín hatását 35 ml-es töltöttséggel, 1 g/l kiindulási sejt-, 30 g/l kiindulási xilózkoncentrációval és 8 g/l hozzáadott glicerinnel, 125 rpm fordulatszámú rázatással végzett fermentáció során vizsgáltam (5.12. ábra). A sejtek a 80. óráig szaporodtak, közben fogyasztották a xilózt. A xilóz 50 óránál fogyott el a fermentléből, a xilit mennyisége innentől csökkent, a fermentáció végéig 15%-kal. A legnagyobb elért xilitkoncentráció 12,9 g/l, 49 óra alatt (42% hozam és 0,3 g/(l*h) produktivitás). Az ugyanilyen beállítású, glicerín hozzáadása nélküli fermentációval (39% hozam, 0,5 g/(l*h) produktivitás) összehasonlítva az elért hozamok körülbelül egyformának adódtak, a produktivitás azonban hozzáadott glicerín esetén kisebb lett.



5.12. ábra: Az 1 g/l kiindulási sejt-, 30 g/l kiindulási xilózkoncentrációval, 8 g/l hozzáadott glicerinnel, 35 ml töltöttség és 125 rpm fordulatszámú rázatás mellett folytatott fermentáció lefutása

5.3.7. Xilitfermentáció kukoricarost-hidrolizátumon *C. boidinii*-vel

A kukoricarost-hidrolizátumon végzett fermentációk során a cukorkoncentrációkon kívül – a korábbi fermentációktól eltérően – inhibitorok koncentrációját is meghatároztam. A hangyasav, ecetsav, hidroximetil-furfurol (HMF), és furfurol koncentrációját folyadékkromatográfiás módszerrel, az összes fenolos komponens koncentrációját a 4.3.14. pontban leírt módszerrel, Folin & Ciocalteu's reagenssel határoztam meg. A hidrolizátumban található inhíbeáló komponensek eltávolítására aktív szenes kezelést alkalmaztam, mert *Buhner és társai* eredményei alapján ez bizonyult a leghatásosabb detoxikálási módszernek [36].

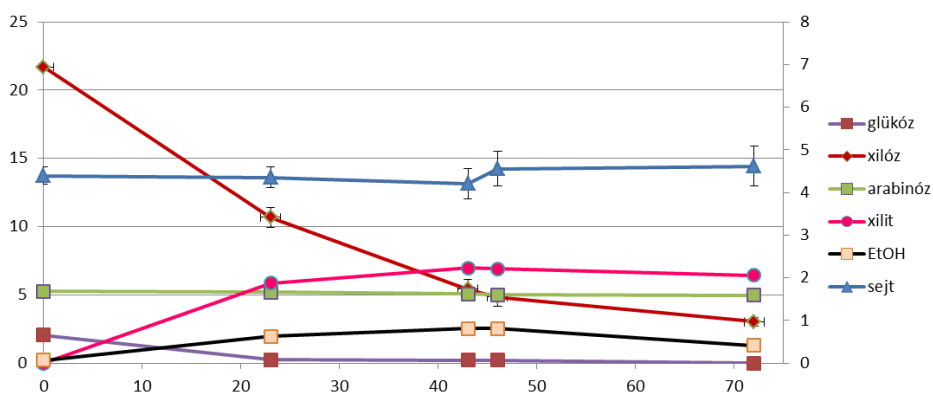
Az 5.13. ábrán bemutatott fermentációhoz a hidrolizátumot a 4.3.13. pontban leírtak alapján készítettem. A hidrolizátumban található cukrok koncentrációját a különböző lépések között, valamint ezek változását az 5.7. táblázat tartalmazza.

5.7. táblázat: A kukoricarost-hidrolizátumban található glükóz, xilóz, arabinóz és inhibitorok koncentrációja a kukoricarost hidrolízis, pH állítás, detoxikálás és sterilizálás után (a *-gal jelölt pontban nem történt mérés)

	<i>koncentráció [g/l]</i>	<i>glükóz</i>	<i>xilóz</i>	<i>arabinóz</i>	<i>hangyasav</i>	<i>ecetsav</i>	<i>HMF</i>	<i>furfurol</i>	<i>totál fenol</i>
hidrolizátum		2,5	23,8	5,2	0,0	2,1	0,0	0,0	5,3
pH állítás után		2,4	22,5	5,0	0,0	2,2	0,0	0,0	-*
aktív szenes kezelés után		2,3	22,4	5,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,2
sterilizálás után		2,0	21,7	5,3	0,1	2,2	0,0	0,0	0,3

A kukoricarost-hidrolizátumban található inhibitor vegyületek közül az ecetsav koncentráció sem a pH állítás, sem az aktív szenes kezelés hatására nem változott: a pH állítás és sterilizálás után is 2,2 g/l volt. Ezzel szemben az összes fenolos komponens koncentrációja a hidrolizátumban 5,3 g/l volt, majd a pH állítás és aktív szenes kezelés hatására 0,2 g/l-re csökkent. A hidrolizátumban furfurolt és HMF-t nem detektáltunk. A sterilizálás során a xilózkoncentráció csökkent, de furfurolt és HMF-t továbbra sem detektáltunk a hidrolizátumban. A hidrolizátum detoxikálása és sterilizálása során a glükóz koncentrációja 25%-kal, a xilózé 10%-kal csökkent, az arabinózé nem változott jelentős mértékben (5.8. táblázat). A sejteket xilózoldaton szaporítottam fel (4.3.7.), majd a fermentációt 5 g/l kiindulási sejtkoncentrációval, 50 ml-es töltöttség és 125 rpm fordulatszámú rázatás mellett

végeztem. A 72 óra alatt a sejtek csak elhanyagolható mértékben növekedtek: 4,4 g/l-ről 4,6 g/l-re nőtt a sejtkoncentráció. A fermentáléban található glükóz a 23. órára teljesen elfogyott, a xilóz mennyisége pedig folyamatosan csökkent, a fermentáció végén a koncentrációja 3 g/l volt. Az arabinóz koncentrációja a korábbi – biotisztítási (5.3.10-11.) – kísérletekhez hasonlóan nem változott a fermentáció során. A sejtek xilitet termeltek, a 43.óráig 7 g/l-t, de közben etil-alkohol is képződött: 2,5 g/l (43.óra). Az elért legnagyobb xilitkoncentráció alapján a hozam 32% és a produktivitás 0,7 g/(l*h).



5.13. ábra: A kukoricarost-hidrolizátumon, 5 g/l kiindulási sejtkoncentrációval, 50 ml-es töltöttség és 125 rpm fordulatszámu rázatás mellett végzett fermentáció lefutása

Az ugyanilyen beállítások mellett, modellszubsztrát-oldaton (30 g/l xilózoldat) végzett fermentáció során a sejtek által termelt xilit legnagyobb koncentrációja 16,6 g/l volt (60% hozam), 21 óra alatt (0,8 g/(l*h) produktivitás). Az általunk elvégzett vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy az általunk egyetlen csúcsként detektált xilóz és galaktóz körülbelül 80%-a xilóz, a többi galaktóz. Ha ezzel korrigálunk a hozamszámításnál, akkor az 5.13. ábrán bemutatott fermentáció esetén 40%-os hozamot kapunk.

A detoxikálás során a hidrolizátumban található ecetsav mennyisége nem változott jelentős mértékben, míg a fenolos komponensek mennyisége az aktív szén kezelés hatására 0,5 g/l alá csökkent. A modellszubsztrát-oldaton kapott fermentációs eredményekhez képest elért kisebb hozamot valószínűleg az ecetsav jelenléte okozta (sterilizés után 2,2 g/l). Az ecetsav erős inhibitora a xilitfermentáció során lejátszódó folyamatoknak: 30 g/l kiindulási xilóz-, 5 g/l kiindulási sejtkoncentráció, 60 ml-es töltöttség és 125 rpm fordulatszámu rázatás mellett végzett elő-kísérletekben 2,5 g/l ecetsav hatására a hozam 25%-nak adódott, míg ecetsav hozzáadása nélkül, azonos körülmények között 59%-os hozamot értünk el.

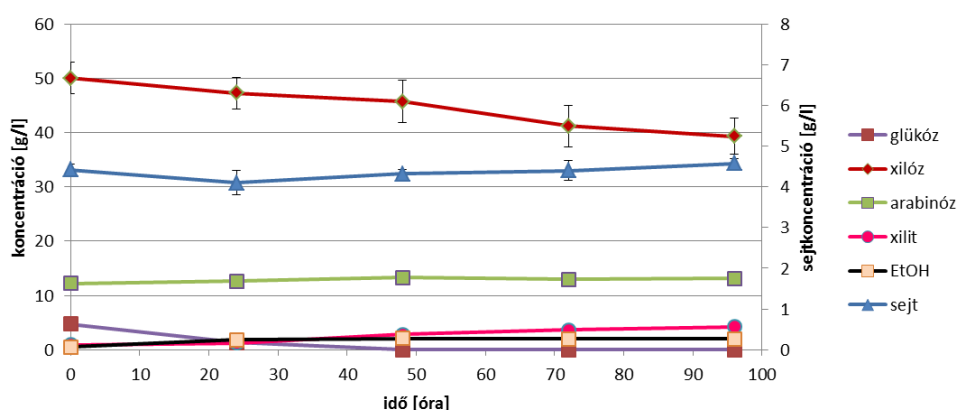
5.3.8. Xilitfermentáció betöményített kukoricarost-hidrolizátumon *C. boidinii*-vel

Az 5.14. ábrán bemutatott fermentációhoz a hidrolizátumot szintén a 4.3.13. pontban leírtak alapján készítettem, az előzőkben bemutatottakhoz képest azzal a különbséggel, hogy az aktív szén kezelés előtt bepároltam a hidrolizátumot, körülbelül kétszeres töménységűre. A bepárolt hidrolizátumban található cukrok és inhibitorok koncentrációját mutatja az 5.8. táblázat.

5.8. táblázat: A betöményített hidrolizátumban található glükóz, xilóz, arabinóz és inhibitorok koncentrációja a detoxikálás és sterilizálás után (a *-gal jelölt pontokon nem történt mérés)

	koncentráció [g/l]	glükóz	xilóz	arabinóz	hangyasav	ecetsav	HMF	furfurol	total fenol
aktív szén kezelés után		7,1	59,3	14,4	0,0	5,7	0,0	0,0	0,7
sterilizálás után		4,7	50,0	12,2	0,6	9,7	0,0	0,0	1,4

A hidrolizátum sterilizálása során a glükóz koncentrációja 34%-kal, a xilózé 16%-kal, az arabinózé 15%-kal csökkent (5.8. táblázat). A sejteket ez esetben a 4.3.13. pontban leírtak alapján készített ún. első hidrolizátumon (1,1 % kénsav, 90°C, 51 perc tartási idő, szűrés, majd pH állítás 6-ra) szaporítottam fel. A fermentációt ezután 50 ml-es töltöttség, 125 rpm fordulatszámú rázatás és 5 g/l kiindulási sejtkoncentráció mellett végeztem.



5.14. ábra: A betöményített kukoricarost hidrolizátumon, 5 g/l kiindulási sejtkoncentrációval, 50 ml-es töltöttség és 125 rpm fordulatszámú rázatás mellett végzett fermentáció lefutása

A fermentáció során a sejtek nem szaporodtak, és a xilóznak csak 21%-át fogyasztották el: a 94. órában a xilózkoncentráció 39,3 g/l volt (5.14. ábra). A sejtek által termelt xilit mennyisége a fermentáció alatt folyamatosan nőtt, de a legnagyobb koncentrációja így is csak

4,3 g/l volt, a 94. órában, ami 8%-os hozamot és 0,05 g/(l*h) produktivitást jelent. A sejtek közben kis mennyiségű etanolt is termeltek: a 94. órában 2 g/l volt az etanol-koncentráció. A kis hozamot okozhatta a hidrolizátumban található ecetsav nagy koncentrációja (a sterilizálás után 9,7 g/l), mely a már korábban említettek szerint inhibitoroként hat a xilitfermentációs folyamatokra.

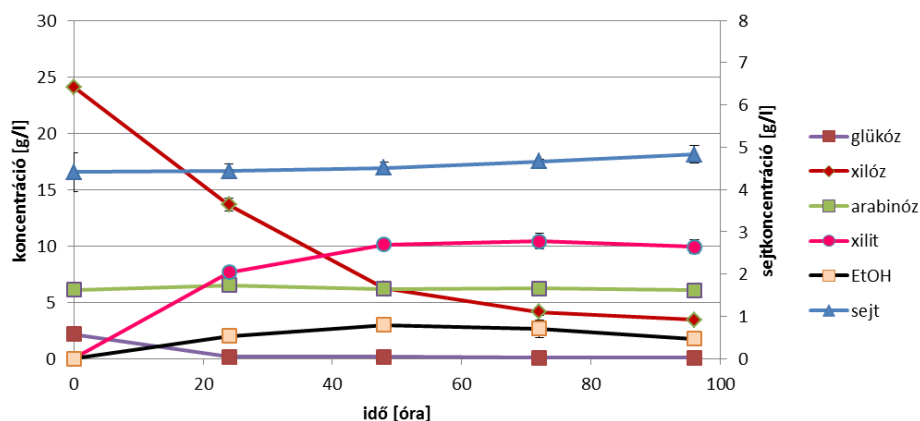
5.3.9. Xilitfermentáció kukoricarost-hidrolizátumon felszaporított *C. boidinii* sejtekkel

Az 5. 15. ábrán bemutatott fermentációhoz a hidrolizátumot a 4.3.13. pontban leírtak alapján készítettem. A sejteket ez esetben is a 4.3.13. pontban leírtak alapján készített ún. első hidrolizátumon (1,1 % kénsav, 90°C, 51 perc tartási idő, szűrés, majd pH állítás 6-ra) szaporítottam fel. A fermentációt ezután 50 ml-es töltöttség, 125 rpm fordulatszámú rázatás és 5 g/l kiindulási sejtkoncentráció mellett végeztem. A hidrolizátumban található cukrok és inhibitorok koncentrációját mutatja az 5.9. táblázat.

*5.9. táblázat: A kukoricarost-hidrolizátumon felszaporított C. boidinii sejtekkel végzett fermentációhoz használt hidrolizátumban található glükóz, xilóz, arabinóz és inhibitorok koncentrációja a hidrolízis, pH állítás és detoxikálás után (a *-gal jelölt ponton nem történt mérés)*

	<i>koncentráció [g/l]</i>	<i>glükóz</i>	<i>xilóz</i>	<i>arabinóz</i>	<i>hangyasav</i>	<i>ecetsav</i>	<i>HMF</i>	<i>furfural</i>	<i>total fenol</i>
hidrolizátum		3,0	28,0	6,6	0,0	2,3	0,0	0,0	—*
pH állítás után		3,0	28,4	6,8	0,0	2,6	0,0	0,0	5,0
aktív szén kezelés és sterilizálás után		2,2	24,1	6,1	0,0	1,5	0,0	0,0	0,3

A pH állítás hatására a cukrok és inhibitorok koncentrációja ez esetben sem változott jelentős mértékben, ugyanakkor a sterilizálás hatására a glükóz koncentrációja 27%-kal, a xilózé 15%-kal, az arabinózé 10%-kal csökkent. A pH állítás után a hidrolizátumban található fenolos komponensek koncentrációja 5,0 g/l volt, ami az aktív szén kezelés hatására a sterilizálás után már csak 0,3 g/l volt. Az ecetsav koncentrációja azonban az aktív szén kezelés és sterilizálás után 1,5 g/l volt, így az értékelésnél ez esetben is figyelembe kell venni az ecetsav jelentős inhibáló hatását.



5.15. ábra: A kukoricarost-hidrolizátumon, 5 g/l kiindulási sejtkoncentrációval, 50 ml-es töltöttség és 125 rpm fordulatszámú rázatás mellett végzett fermentáció lefutása

A fermentáció során a sejtek nem szaporodtak, de a glükózt 24 óra alatt teljesen elfogyasztották, és a xilóz koncentrációja is folyamatosan csökkent (5.15. ábra). A fermentáció alatt a sejtek termeltek etanolt, a 48. órában a koncentrációja 3 g/l volt. A 48. óráig a sejtek 10 g/l xilitet termeltek (41% hozam, 0,2 g/(l*h) produktivitás). Ha a korábban már említett galaktóz tartalommal korrigálunk a hozamszámításnál, 52%-os hozamot kapunk, ami az ugyanilyen körülmények között modellszubsztrát-oldaton (30 g/l xilózoldat) végzett fermentáció során elért 60%-os hozamnál csak 8%-kal kisebb. Amennyiben a hidrolizátumban jelen levő ecetsavat, vagy egy részét el tudjuk távolítani, úgy – az inhíbeáló hatás csökkentésével, vagy megszüntetésével – a hozam tovább növelhető.

6. Összefoglalás

A kukoricarost arabinóztartalma szelektíven kinyerve értékes terméke lehet a biofinomító folyamatnak. A rost arabinántartalma 11,8% (száraz tömegre vonatkoztatva). Jelenleg nem áll rendelkezésre olyan technológia, mely utólagos, költséges tisztítási lépések nélkül képes lenne az arabinóz megfelelően szelektív kinyerésére. Munkám során az egyik cél a kukoricarost különböző – savas – kezeléseinek vizsgálata volt, az arabinózhozam, valamint a kezelések szelektivitása szempontjából.

Az általam végzett kénsavas kezelések során a kukoricarostot 90, 120 és 140°C-on kezeltem különböző koncentráció és kezelési idő beállítások mellett. A 120 és 140°C-os kezelések során a hemicellulóz frakciót csaknem teljes mértékben oldatba vittem, így ezek a kezelések túl erélyesek az arabinóztartalom szelektív hidrolíziséhez. A 90°C-os kezelések során – enyhébb körülmények között – nagyobb tisztaságot, ugyanakkor lényegesen kisebb arabinózhozamokat értem el. Ahhoz, hogy a szűrletek tisztaságának megtartása mellett nagyobb arabinózhozamokat érjek el, végeztem 90°C-on megnövelt kénsav-koncentrációval, illetve megnövelt kezelési idővel is kísérleteket. A savkoncentráció és a kezelési idő növelésével is sikerült nagyobb arabinózhozamokat elérnem, de a szűrletek tisztasága mindkét esetben kisebbnek adódott. Minden savas kezelés során végeztem ún. utósavazást – az oldatba kerülő oligomerek monomerekké történő hidrolízise céljából. Az utósavazás hatására a tisztasági hányadosok értéke minden esetben jelentősen csökkent. Ez alapján megállapítható, hogy a kezelések során jelentős mennyiségű xilóz és arabinóz került oldatba oligomer formában, és ezek az oligomerek nagyobb mennyiségű xilózt tartalmaztak, mint arabinózt. A savas kezelések eredményei, valamint a felállított modellek alapján elmondható, hogy a vizsgált körülmények között tiszta arabinózzoldat nem állítható elő, ugyanakkor egy arabinózban gazdag frakció létrehozható.

Ahhoz, hogy az így előállított arabinózban gazdag frakcióból az arabinózt kinyerhessük, az egyéb cukrokat el kell távolítani az arabinóz mellől az oldatból. Erre adhat lehetőséget az élesztőkkel történő biotisztítás. A kukoricarost-hidrolizátum biotisztítása előtt előzetes kísérleteket végeztem négy kiválasztott élesztőtörzzsel modellszubsztrát oldaton a hemicellulóz frakcióban található cukrok fogyasztásának feltérképezésére. A biotisztítási kísérletekhez használt négy élesztőtörzs (*Candida boidinii*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Hansenula anomala*) közül csak a *C. boidinii* bizonyult az arabinóz biotisztítására alkalmasnak. *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* és *H. anomala* a biotisztítás során mindhárom cukrot teljes mértékben elfogyasztotta, míg *C. boidinii* a xilózt, valamint a

galaktóz 93%-át elfogyasztotta, ugyanakkor az arabinózt nem metabolizálta a biotisztítás során. A biotisztítást elvégeztem *C. boidinii* törzzsel kukoricarost-hidrolizátumon is, mely 10 g/l arabinózt, 6 g/l glükózt és 10 g/l xilózt (és galaktózt) tartalmazott. A biotisztítás során az élesztő az arabinózt nem, ellenben a glükózt teljes mértékben, a xilóz és galaktóz 83-86%-át elfogyasztotta.

A kémiai xilitelőállítás alternatívája a biológiai redukció, melynek optimálása elengedhetetlen a kémiai redukcióval való versenyképesség eléréséhez. A szakirodalomban található cikkek alapján a *C. boidinii* törzs megfelelő körülmények között képes a xilózt xilitté redukálni, ezért modellszubsztrát-oldaton vizsgáltam, hogy milyen hatással van a fermentáció lefutására és az elérhető xilithozamra a levegőztetés mértéke, a kiindulási sejt- és xilózkoncentráció, a pH, illetve metil-alkohol vagy glicerín hozzáadása. A kísérletek során a töltöttség vizsgált értékei 35, 50 és 65 ml (100 ml-es Erlenmeyer lombikban), a rázatás fordulatszámai 220 és 125 rpm voltak. A kezdeti sejt koncentrációk 1, illetve 5 g/l, a kezdeti xilózkoncentrációk 30 és 75 g/l voltak.

Az 1 g/l kiindulási sejt koncentráció, 30 g/l kiindulási xilózkoncentráció mellett végzett fermentációk közül a legnagyobb xilithozamot 50 ml-es töltöttség és 125 rpm rázatás mellett értem el (43%). A fermentáció alatt fixen tartott pH érték (pH 5 és pH 7) hatására a hozam nem növekedett az ugyanilyen körülmények között, a fermentáció során nem fixen tartott pH értékű fermentációhoz képest. Harmincöt milliliteres töltöttség mellett a megnövelt kiindulási sejt koncentráció (5 g/l) hatására a sejtek csak kis mértékben szaporodtak a fermentáció alatt, a xilithozam körülbelül 2%-kal nagyobb lett (41%), mint az azonos beállítású, 1 g/l kiindulási sejt koncentrációjú fermentációnál (39%). Harmincöt milliliteres töltöttségnél a megnövelt kiindulási cukorkoncentráció (75 g/l kiindulási xilózkoncentráció, 38% hozam) nem okozott hozamnövekedést az ugyanilyen beállítások mellett, 30 g/l kiindulási xilózkoncentrációval folytatott fermentációhoz képest (39%). Harmincöt milliliteres töltöttségnél a hozzáadott metil-alkohol (6,8 g/l) körülbelül 9%-kal nagyobb hozamot eredményezett (48%), míg a hozzáadott glicerín (8,1 g/l) körülbelül 3% hozamnövekedést okozott (42%) az ugyanilyen beállítások mellett, kofaktorok hozzáadása nélkül végzett fermentációhoz képest (39% hozam).

Ötvenmilliliteres töltöttségnél a megnövelt kiindulási sejt koncentrációval (5 g/l) végzett fermentáció során jelentősen nagyobb hozamot értem el (60%), mint 1 g/l kiindulási sejt koncentrációval (43%). A megnövelt kiindulási xilóz- (75 g/l) és sejt koncentráció (5 g/l) együttes hatását 50 ml-es töltöttségnél vizsgáltam. A megnövelt sejt koncentrációs

fermentációval (50 ml-es töltöttség, 60% hozam) körülbelül megegyező hozamot, 61%-ot értem el.

A megnövelt kiindulási sejt- (5 g/l) és xilózkoncentrációval (75 g/l), valamint hozzáadott metil-alkohollal (7,7 g/l) folytatott fermentáció során az ugyanilyen körülmények között, megnövelt sejtkoncentrációval végzett fermentációhoz (60%) hasonló hozamot értem el (63%).

Ezek alapján elmondható, hogy a megnövelt kiindulási sejtkoncentráció növeli az elérhető hozamot, a megnövelt kiindulási xilózkoncentráció, és a fix értéken tartott pH nincs jelentős hatással a hozam alakulására, a hozzáadott kofaktorok pedig kis mértékben növelhetik a hozamot.

Végeztem xilitfermentációs kísérleteket kukoricarost-hidrolizátumon is, ez esetben a detoxikálás hatását vizsgáltam. A hidrolizátumban számos toxikus anyag is megtalálható (például ecetsav, fenolos komponensek), melyek a lignocellulózok savas hidrolízisekor képződnek, arányuk a kezelés módjától függ. A hidrolizátumban található inhibeáló komponensek eltávolítására aktív szenes kezelést alkalmaztam. Az inhibitor vegyületek közül az ecetsav koncentráció sem a pH állítás, sem az aktív szenes kezelés hatására nem változott jelentős mértékben, ugyanakkor az összes fenolos komponens koncentrációja a pH állítás és aktív szenes kezelés hatására csaknem nullára csökkent. A hidrolizátumban furfurolt és HMF-t nem detektáltunk. A hidrolizátumon végzett fermentációt 5 g/l kiindulási sejtkoncentrációval végeztem, és 32%-os hozamot értem el. A folyadékkromatográfiás vizsgálat során az általunk egyetlen csúcsként detektált xilóz és galaktóz körülbelül 80%-a xilóz, a többi galaktóz, így ha ezzel korrigálunk a hozamszámításnál – 40%-os hozamot kapunk.

Végeztem xilitfermentációs kísérletet betöményített kukoricarost-hidrolizátumon is. Ez esetben a kiindulási xilózkoncentráció 50 g/l, a kiindulási sejtkoncentráció 5 g/l volt. A nagy xilóz- és sejtkoncentráció ellenére mindössze 8%-os hozamot értem el, amit valószínűleg az ecetsav nagy koncentrációja okozott: az aktív szenes kezelés és sterilizálás után 5,7 g/l volt az ecetsav koncentrációja.

Végül végeztem kísérletet kukoricarost-hidrolizátumon felszaporított élesztősejtekkel is. A sejteket a kukoricarost enyhe körülmények között végzett savas kezelése során nyert arabinózból gazdag hidrolizátumon szaporítottam fel. A sejtek a szaporítás során a glükózt, xilózt és galaktózt fogyasztották az oldatból, az arabinózt nem metabolizálták. A xilitfermentáció kiindulási xilózkoncentrációja 24 g/l, sejtkoncentrációja 5 g/l volt. Az ecetsav-koncentráció a pH állítás után 2,6 g/l volt. A fermentáció során 41%-os hozamot értem el, ami a galaktóztartalommal történő korrigálás után 52%-nak adódik.

A biotisztítások és xilitfermentációk eredményei alapján elmondható, hogy az általam vizsgált négy élesztőtörzs közül a *C. boidinii* alkalmas a biotisztításra és a xilitfermentációra is, mind modellszubsztrát-oldaton, mind kukoricarost-hidrolizátumon. A jövőben vizsgálandók az irodalomban található, ecetsav-eltávolításra alkalmas módszerek, mert az ecetsav inhíbeáló hatása csökkenti a fermentáció során elérhető hozamot. További cél a léptéknövelés vizsgálata, elsőként nagylaboratóriumi fermentorban, majd a megfelelő körülmények meghatározása után nagyobb léptékben is. Vizsgálandó továbbá, hogy a biotisztítással kapott arabinózoldatból az arabinóz, illetve a xilitfermentációból származó fermentléből a xilit milyen körülmények között kristályosítható ki, valamint, hogy a rost hidrolízise után maradt cellulózban gazdag szilárd frakció hogyan hasznosítható etanolfermentációra.

7. Irodalomjegyzék

- [1] L. A. M. B. Metz, O.R. Davidson, P.R. Bosch, R. Dave, *Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. 2007.
- [2] B. Hahn-Hägerdal and M. Galbe, "Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today," *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 12, pp. 549–556, 2006.
- [3] G. Taylor, "Biofuels and the biorefinery concept," *Energy Policy*, vol. 36, no. 12, pp. 4406–4409, Dec. 2008.
- [4] J. H. Clark, V. Budarin, F. E. I. Deswarte, J. J. E. Hardy, F. M. Kerton, A. J. Hunt, R. Luque, D. J. Macquarrie, K. Milkowski, A. Rodriguez, O. Samuel, S. J. Tavener, R. J. White, and A. J. Wilson, "Green chemistry and the biorefinery: a partnership for a sustainable future," *Green Chem.*, vol. 8, no. 10, pp. 853–860, 2006.
- [5] G. Kálmán, "Új lehetőségek a kukorica termesztése és feldolgozása során keletkező melléktermékek hasznosítására." 2008.
- [6] N. Park, S. Yoshida, and Y. Kawabata, "Screening test for xylanolytic activities of commercially available enzymes and release of arabinose from arabinoglucuronoxylan by the enzymes," *J. Appl. Glycosci.*, vol. 48, no. 3, pp. 253–262, 2001.
- [7] T. B. Granström, K. Izumori, and M. Leisola, "A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 74, no. 2, pp. 273–276, Feb. 2007.
- [8] C. Fehér, *Kukorica maghéjat feldolgozó biofinomító üzem technológiai modellezése Aspen Plus programmal*. 2011.
- [9] I. Barótfi, "Biomassza energetikai hasznosítása," *Energ. Központ Kht., Budapest*, 1998.
- [10] F. Cherubini, "The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals," *Energy Convers. Manag.*, vol. 51, no. 7, pp. 1412–1421, Jul. 2010.
- [11] H. Ohara, "Biorefinery," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 62, no. 5–6, pp. 474–477, Oct. 2003.
- [12] Z. Barta, "Üzemanyagalkohol-termelés, Kevrt szubsztráton végzett szimultán cukrosítás és fermentáció, továbbá a downstream műveletek modellezése Aspen Plus-szal," 2007.
- [13] C. Fehér, Z. Barta, and K. Réczey, "A biofinomító koncepció és egy lehetséges technológia számítógépes szimulációja," in *XXXIV. Kémiai Előadói Napok*, 2011.
- [14] B. C. Saha, "Hemicellulose bioconversion," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30, no. 5, pp. 279–291, May 2003.
- [15] B. C. Saha and R. J. Bothast, "Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 76, no. 2, pp. 65–77, Feb. 1999.
- [16] H. Cheng, H. Wang, J. Lv, M. Jiang, S. Lin, and Z. Deng, "A novel method to prepare L-arabinose from xylose mother liquor by yeast-mediated biopurification," *Microb. Cell Fact.*, vol. 10, no. 43, pp. 1–11, Jan. 2011.
- [17] I. Krog-Mikkelsen and O. Hels, "The effects of L-arabinose on intestinal sucrase activity: dose-response studies in vitro and in humans," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 94, pp. 472–478, 2011.

- [18] N. Park, S. Yoshida, and A. Takakashi, "A new method for the preparation of crystalline L-arabinose from arabinoxylan by enzymatic hydrolysis and selective fermentation with yeast," *Biotechnol. Lett.*, vol. 23, no. 1, pp. 411–416, 2001.
- [19] H. Schneider, P. Wang, Y. Chan, and R. Maleszka, "Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*," *Biotechnol. Lett.*, vol. 3, no. 2, pp. 89–92, 1981.
- [20] M. Dumas and F. Bonte, "Uses of D-xylose, the Esters Thereof and Oligosaccharides Containing Xylose for Improving the Functional of Epidermal Cells," *United States Pat.*, vol. 1, 1999.
- [21] E. Vandeska, S. Amartei, S. Kuzmanova, and T. Jeffries, "Fed-batch culture for xylitol production by *Candida boidinii*," *Process Biochem.*, vol. 31, no. 3, pp. 265–270, 1996.
- [22] G. Livesey, "Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties," *Nutr. Res. Rev.*, vol. 16, no. 2, pp. 163–191, Dec. 2003.
- [23] T. Silva, "The use of xylitol as a strategy for prevention of dental caries," *Rev. Odonto ...*, vol. 24, no. 2, pp. 205–212, 2009.
- [24] T. B. Granström, K. Izumori, and M. Leisola, "A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 74, no. 2, pp. 277–281, Feb. 2007.
- [25] C. Ko, P. Chiang, and P. Chiu, "Integrated xylitol production by fermentation of hardwood wastes," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 83, pp. 534–540, 2008.
- [26] S. Kim, J. Kim, and D. Oh, "Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida parapsilosis*," *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 83, no. 3, pp. 267–270, 1997.
- [27] S. I. Mussatto, C. J. S. M. Silva, and I. C. Roberto, "Fermentation performance of *Candida guilliermondii* for xylitol production on single and mixed substrate media," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 72, no. 4, pp. 681–686, Oct. 2006.
- [28] E. Vandeska, S. Kuzmanova, and T. W. Jeffries, "Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida boidinii* under different oxygen transfer rates," *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 80, no. 5, pp. 513–516, Jan. 1995.
- [29] E. Winkelhausen, S. a. Amartei, and S. Kuzmanova, "Xylitol Production from D-Xylose at Different Oxygen Transfer Coefficients in a Batch Bioreactor," *Eng. Life Sci.*, vol. 4, no. 2, pp. 150–154, Apr. 2004.
- [30] H. Lee, C. Sopher, and K. Yau, "Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed sugars in *Candida guilliermondii*," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 66, no. 1, pp. 375–379, 1996.
- [31] S. Kim, D. Oh, and J. Kim, "Evaluation of xylitol production from corn cob hemicellulose hydrolysate by *Candida parapsilosis*," *Biotechnol. Lett.*, vol. 21, no. 1, pp. 891–895, 1999.
- [32] D. Virg and D. A. Felipe, "Effect of glucose: xylose ratio on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 81, pp. 1294–1300, 2006.
- [33] T. Granström, U. Airaksinen, X. Wu, and M. Leisola, "*Candida guilliermondii* grows on rare pentoses—implications for production of pure xylitol," *Biotechnol. Lett.*, vol. 24, no. 1, pp. 507–510, 2002.
- [34] V. Vongsuvanlert and Y. Tani, "Xylitol production by a methanol yeast, *Candida boidinii* (Kloeckera sp.) No. 2201," *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 67, no. 1, pp. 35–39, 1989.

- [35] P. V Arruda and M. G. a Felipe, "Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*," *Curr. Microbiol.*, vol. 58, no. 3, pp. 274–8, Mar. 2009.
- [36] J. Buhner and F. a Agblevor, "Effect of detoxification of dilute-acid corn fiber hydrolysate on xylitol production," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 119, no. 1, pp. 13–30, Oct. 2004.
- [37] O. Fond, N. Jansen, and G. Tsao, "A model of acetic acid and 2, 3-butanediol inhibition of the growth and metabolism of *Klebsiella oxytoca*," *Biotechnol. Lett.*, vol. 7, pp. 727–732, 1985.
- [38] J. M. Loeza-Corte, J. R. Verda-Calvo, F. Cruz-Sosa, E. J. Vernon-Carter, and S. Huerta-Ochoa, "L-arabinose production by hydrolysis of mesquite gum by a crude extract with a-L-arabinofuranosidase activity from *Aspergillus niger*," *Rev. Mex. Ing. Química*, vol. 6, pp. 259–265, 2007.
- [39] Y.-R. Lim, S.-J. Yeom, Y.-S. Kim, and D.-K. Oh, "Synergistic production of L-arabinose from arabinan by the combined use of thermostable endo- and exo-arabinanases from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 5, pp. 4277–4280, Mar. 2011.
- [40] H. Cheng, B. Wang, J. Lv, M. Jiang, S. Lin, and Z. Deng, "Xylitol production from xylose mother liquor: a novel strategy that combines the use of recombinant *Bacillus subtilis* and *Candida maltosa*," *Microb. Cell Fact.*, vol. 10, no. 5, pp. 1–12, Jan. 2011.
- [41] Z. Ahmed, T. Shimonishi, S. H. Bhuiyan, M. Utamura, G. Takada, and K. Izumori, "Biochemical preparation of L-ribose and L-arabinose from ribitol: a new approach," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 88, no. 4, pp. 444–8, Jan. 1999.
- [42] K. Shibamura, K. Takamine, S. Maseda, S. Osaki, J. I. Abe, and S. Hizukuri, "Partial Acid Hydrolysis of Corn Fiber for the Production of L-Arabinose," *J. Appl. Glycosci.*, vol. 46, no. 3, pp. 249–256, 1999.
- [43] C. Fehér, Z. Gázsó, M. Molnár, Z. Barta, and I. Réczey, "KUKORICAROST BIOFINOMÍTÓ SZEMLELETŰ FELDOLGOZÁSA ARABINÓZ ÉS XILIT ELŐÁLLÍTÁSA CÉLJÁBÓL." 2013.
- [44] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker, "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass," *Lab. Anal. Proced. Natl. Renew. Energy Lab. Golden, CO.*, 2008.
- [45] S. Kemény, A. Deák, K. Komka, and E. Vágó, *Hogyan használjuk a STATISTICA programot?* 2011.

8. Függelék

8.1. a táblázat: A kukoricarost 120°C-os kénsavas kezelése során monomer formában oldatba kerülő cukrok mennyisége, hozama, valamint a tisztasági hányadosok értéke

savkoncentráció (%)	idő (perc)	glükóz (mg/g szárazanyag)	glükóz (%)	xilóz (mg/g szárazanyag)	xilóz (%)	arabinóz (mg/g szárazanyag)	arabinóz (%)	tisztasági hányados
0,15	5	0,1	0,0	27,5	8,0	103,7	57,3	3,8
0,15	10	0,2	0,1	40,8	11,9	118,5	65,5	2,9
0,15	15	0,3	0,1	47,3	13,8	121,1	66,9	2,5
0,45	5	1,1	0,4	96,8	28,2	137,1	75,8	1,4
0,45	10	2,8	1,0	127,1	37,0	140,4	77,6	1,1
0,45	15	4,5	1,7	146,7	42,7	143,1	79,1	0,9
0,75	5	2,6	0,9	154,0	44,9	145,3	80,4	0,9
0,75	10	6,6	2,4	203,7	59,3	150,6	83,3	0,7
0,75	15	7,6	2,8	233,6	68,1	157,0	86,8	0,7

8.1. b táblázat: A kukorica rost 120°C-os kénsavas kezelése során monomer és oligomer formában oldatba kerülő cukrok mennyisége, hozama, valamint a tisztasági hányadosok értéke

savkoncentráció (%)	idő (perc)	glükóz (mg/g szárazanyag)	glükóz (%)	xilóz (mg/g szárazanyag)	xilóz (%)	arabinóz (mg/g szárazanyag)	arabinóz (%)	tisztasági hányados
0,15	5	15,6	5,7	125,4	36,5	134,6	74,4	1,0
0,15	10	18,6	6,8	166,8	48,6	144,1	79,7	0,8
0,15	15	19,0	7,0	187,9	54,7	147,2	81,4	0,7
0,45	5	22,0	8,0	270,8	78,9	166,9	92,3	0,6
0,45	10	23,5	8,6	277,4	80,8	166,6	92,1	0,6
0,45	15	24,1	8,8	282,5	82,3	168,4	93,1	0,5
0,75	5	24,9	9,1	289,3	84,3	172,6	95,5	0,5
0,75	10	25,2	9,2	282,1	82,2	166,0	91,8	0,5
0,75	15	25,4	9,3	288,9	84,2	168,3	93,1	0,5

8.2. táblázat: A kukoricarost 140°C-os kénsavas kezelése során monomer formában oldatba kerülő cukrok mennyisége, hozama, valamint a tisztasági hányadosok értéke

savkoncentráció (%)	idő (perc)	glükóz (mg/g szárazanyag)	glükóz (%)	xilóz (mg/g szárazanyag)	xilóz (%)	arabinóz (mg/g szárazanyag)	arabinóz (%)	tisztasági hányados
0,15	5	5,2	1,9	142,7	41,6	146,8	81,2	1,0
0,15	10	7,1	2,6	188,3	54,9	154,5	85,4	0,8
0,15	15	5,1	1,9	202,6	59,0	152,3	84,2	0,7
0,45	5	16,4	6,0	299,8	87,3	163,7	90,5	0,5
0,45	10	21,0	7,7	321,0	93,5	168,7	93,3	0,5
0,45	15	23,6	8,6	335,7	97,8	173,7	96,0	0,5
0,75	5	23,2	8,5	317,3	92,4	165,1	91,3	0,5
0,75	10	28,5	10,4	334,9	97,6	172,4	95,3	0,5
0,75	15	30,7	11,2	342,9	99,9	178,0	98,4	0,5

8.3. a táblázat: A kukoricarost 90°C-os kénsavas kezelése során monomer és oligomer formában oldatba kerülő cukrok mennyisége, hozama, valamint a tisztasági hányadosok értéke

savkoncentráció (%)	idő (perc)	glükóz (mg/g szárazanyag)	glükóz (%)	xilóz (mg/g szárazanyag)	xilóz (%)	arabinóz (mg/g szárazanyag)	arabinóz (%)	tisztasági hányados
0,0	5	3,0	1,3	nd	-	1,5	0,9	0,5
0,0	30	3,3	1,4	2,3	0,7	1,9	1,2	0,3
0,0	55	3,7	1,5	2,5	0,8	2,4	1,5	0,4
0,5	5	11,3	4,7	13,8	4,4	35,4	21,5	1,4
0,5	30	19,7	8,2	57,1	18,0	93,7	57,0	1,2
0,5	55	25,3	10,5	89,8	28,2	113,6	69,1	1,0
1,0	5	22,0	9,1	31,5	9,9	64,3	39,2	1,2
1,0	30	27,1	11,2	115,2	36,2	124,2	75,6	0,9
1,0	55	31,0	12,8	185,3	58,3	137,2	83,5	0,6

8.3. b táblázat: A kukoricarost 90°C-os kénsavas kezelésekor elért xilózhozamok statisztikai elemzése: a lineáris tagok és kölcsönhatásuk, valamint a modell alkalmasságát jellemző paraméterek

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)koncentráció [%] L	79,3714	1	79,37142	3781,048	0,000009
(2)idő [perc] L	33,4431	1	33,44313	1593,144	0,000035
1*2	25,4401	1	25,44013	1211,901	0,000052
Lack of Fit	0,5878	5	0,11756	5,600	0,093460
Pure Error	0,0630	3	0,02099		
Total SS	138,9055	11			

8.4. a táblázat: A kukoricarost 90°C-os, megnövelt kénsav-koncentrációjú kezelése során monomer formában oldatba kerülő cukrok mennyisége, hozama, valamint a tisztasági hányadosok értéke

savkoncentráció (%)	idő (perc)	glükóz (mg/g szárazanyag)	glükóz (%)	xilóz (mg/g szárazanyag)	xilóz (%)	arabinóz (mg/g szárazanyag)	arabinóz (%)	tisztasági hányados
1,0	5	nd	-	7,95	2,50	51,41	31,29	6,5
1,0	10	1,4	0,6	12,2	3,8	72,6	44,2	7,3
1,0	15	1,4	0,6	15,2	4,8	84,2	51,2	6,9
3,0	5	1,5	0,6	26,1	8,2	90,8	55,3	5,0
3,0	10	1,6	0,7	36,5	11,5	107,9	65,7	4,5
3,0	15	1,9	0,8	58,7	18,4	117,1	71,3	3,9
5,0	5	1,5	0,6	45,0	14,2	101,9	62,0	3,8
5,0	10	1,9	0,8	76,0	23,9	126,2	76,8	3,5
5,0	15	2,3	1,0	90,2	28,4	127,5	77,6	3,7

8.4. b táblázat: A kukoricarost 90°C-os, megnövelt kénsav-koncentrációjú kezelése során monomer és oligomer formában oldatba kerülő cukrok mennyisége, hozama, valamint a tisztasági hányadosok értéke

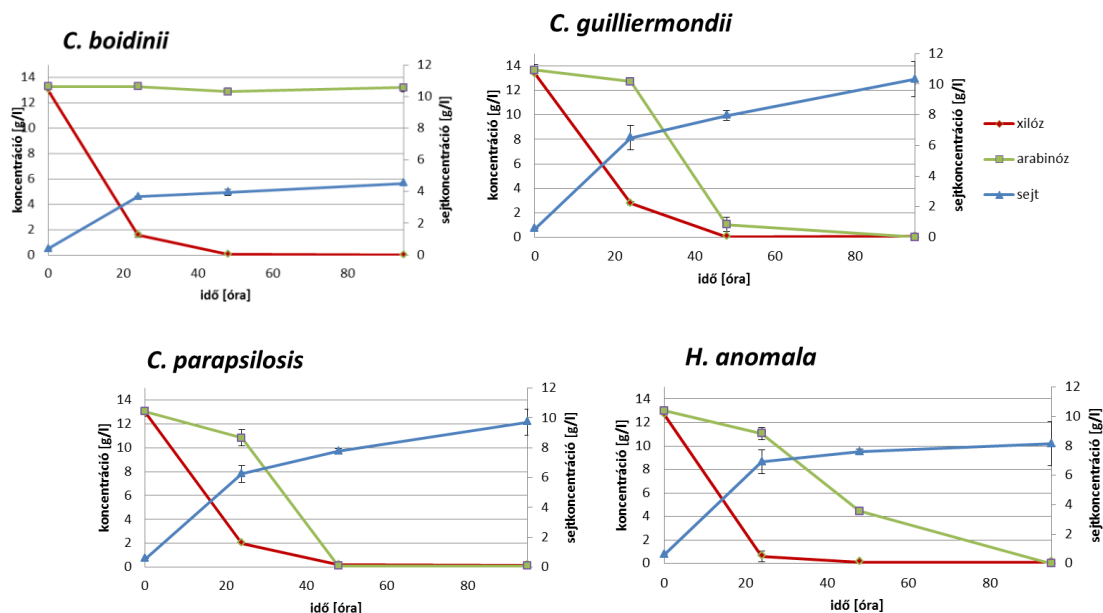
savkoncentráció (%)	idő (perc)	glükóz (mg/g szárazanyag)	glükóz (%)	xilóz (mg/g szárazanyag)	xilóz (%)	arabinóz (mg/g szárazanyag)	arabinóz (%)	tisztasági hányados
1,0	5	13,0	5,4	34,1	10,7	67,8	41,2	1,4
1,0	10	20,4	8,4	62,2	19,6	96,7	58,9	1,2
1,0	15	19,7	8,1	73,7	23,2	104,9	63,8	1,1
3,0	5	19,7	8,1	111,5	35,1	119,9	73,0	0,9
3,0	10	25,7	10,6	158,9	50,0	137,8	83,9	0,7
3,0	15	32,5	13,4	235,1	73,9	155,4	94,6	0,6
5,0	5	24,8	10,3	170,7	53,7	130,1	79,2	0,7
5,0	10	17,7	7,3	250,6	78,8	158,5	96,5	0,6
5,0	15	20,2	8,4	256,3	80,6	159,7	97,2	0,6

8.5. a táblázat: A kukoricarost 90°C-os, megnövelt kezelési idejű kénsavas kezelése során monomer formában oldatba kerülő cukrok mennyisége, hozama, valamint a tisztasági hányadosok értéke

savkoncentráció (%)	idő (perc)	glükóz (mg/g szárazanyag)	glükóz (%)	xilóz (mg/g szárazanyag)	xilóz (%)	arabinóz (mg/g szárazanyag)	arabinóz (%)	tisztasági hányados
0,00	1	nd	-	1,1	0,3	1,3	0,8	1,2
0,00	1,5	nd	-	1,2	0,4	1,8	1,1	1,5
0,00	2	nd	-	1,3	0,4	2,1	1,3	1,7
0,25	1	1,4	0,6	10,1	3,2	66,2	40,3	5,8
0,25	1,5	1,4	0,6	15,4	4,9	81,7	49,7	4,9
0,25	2	1,4	0,6	16,4	5,1	83,1	50,6	4,7
0,5	1	1,4	0,6	23,4	7,4	97,3	59,2	3,9
0,5	1,5	1,5	0,6	33,0	10,4	98,9	60,2	2,9
0,5	2	1,6	0,7	43,1	13,5	107,4	65,4	2,4

8.5. b táblázat: A kukoricarost 90°C-os, megnövelt kezelési idejű kénsavas kezelése során monomer és oligomer formában oldatba kerülő cukrok mennyisége, hozama, valamint a tisztasági hányadosok értéke

savkoncentráció (%)	idő (perc)	glükóz (mg/g szárazanyag)	glükóz (%)	xilóz (mg/g szárazanyag)	xilóz (%)	arabinóz (mg/g szárazanyag)	arabinóz (%)	tisztasági hányados
0,00	1	3,8	1,6	2,8	0,9	2,6	1,6	0,4
0,00	1,5	3,8	1,6	2,9	0,9	3,4	2,0	0,5
0,00	2	4,1	1,7	3,3	1,0	3,8	2,3	0,5
0,25	1	19,4	8,0	51,8	16,3	85,0	51,7	1,2
0,25	1,5	24,0	9,9	77,8	24,5	102,9	62,6	1,0
0,25	2	20,8	8,6	76,2	24,0	99,7	60,7	1,0
0,5	1	23,7	9,8	111,4	35,0	117,9	71,8	0,9
0,5	1,5	26,1	10,8	163,9	51,6	132,4	80,6	0,7
0,5	2	32,5	13,4	211,3	66,5	147,0	89,5	0,6



8.1. ábra: A xilóz-, arabinóz- és sejt koncentráció változása a négy élesztőtörzs esetén, 15 g/l xilóz- és 15 g/l arabinóztartalmú tápoldaton végzett biotisztítási kísérlet során