



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
UNIVERSITAS SCIENTIARUM SZEGEDIENSIS
MÉRNÖKI KAR

MEZŐGAZDASÁGI HULLADÉKOK ENZIMES LEBONTÁSA

TDK DOLGOZAT

Vitay Dóra

Biomérnök BSc.

hallgató

Témavezető:

Prof. Dr. Hodúr Cecília

egyetemi tanár

SZEGED

2014

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALOM	5
2.1. Mezőgazdasági hulladékok és melléktermékek	5
2.2. A dohánynövény	6
2.3 Cellulóz, hemicellulóz	8
2.4 Enzimek, enzimes lebontás	9
2.5. Ultraszűrés	12
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
3.1 A dohány	13
3.2 Enzimkészítmények	14
3.2.1 Celluláz	14
3.2.2 Cellobiáz	14
3.2.3 Xilanáz	14
3.3 Enzimes lebontás módja:	14
3.4 Redukáló cukortartalom meghatározása	15
3.5 Fehérjetartalom meghatározása	16
3.6 Visszatartás értékének meghatározása	16
3.7 Enzimaktivitási vizsgálatok	17
3.8 Membránszűrés	17
4. EREDMÉNYEK	19
4.1. pH érték változásának hatása celluláz és cellobiáz enzimek működésére	19
4.2. Enzimes lebontás xilanáz enzimmel	22
4.3. Enzimes lebontások összehasonlítása	24
4.4. Enzimvisszanyerés és újrahasznosítás	26
4.4.1. Membránszűrés	26
4.4.2 Enzim újrahasznosítás	31
5. ÖSSZEFOGLALÁS	33

6. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	34
7. IRODALOMJEGYZÉK	35
8. KÉPJEGYZÉK:	36

1. BEVEZETÉS

A megújuló energiaforrások felismerése és kiaknázása napjaink egyik igen kutatott területe, mivel a fosszilis energiahordozók, amelyeket az élet számos részén szinte nélkülözhetetlennek hiszünk, fogyóban vannak. Ezek közül az egyik legnagyobb fogyasztást a motor hajtóanyagok jelentik. Ha sikerülne ezt az iparágat teljesen „megújulóvá” tenni, az a fosszilis energiahordozók majdnem teljes kiszorítását jelentené az iparokban. Az is fontos a megfelelő hajtóanyag megtalálásában, hogy olcsó előállítása mellett a különböző motorok kisebb átalakításokkal vagy akár átalakítás nélkül hasznosítani tudják, ezzel elősegítve gyors elterjedését.

Az egyik ilyen, kismértékben már elterjedt hajtóanyag a bioetanol. A felhasználhatóság mellett igen fontos még a gazdaságos előállítás. Az energianövényeket már régóta használják erre, de a különböző iparágak növényi hulladékainak felhasználása még környezettudatosabbá tehetné a bioetanol gyártását. Az egyik ilyen lehetséges iparág a dohányipar.

A dohánytermékek készítése, több lépésből álló, hosszú feldolgozási folyamat. A feldolgozás első fázisa a szárítás. A szárítást követően a fermentáló üzemekben folytatódik a dohánylevelek feldolgozása. A fermentációs folyamat egyes alapanyagok esetében hónapokig, szivardohányoknál egy-másfél évig is eltarthat. A gépesítés és műszerezettség fejlődése lehetővé tette, hogy a fermentációs idő lecsökkenjen. A környezeti feltételek könnyebben szabályozhatók és ellenőrizhetők lettek. Újabb fajták kerültek köztermesztésbe, melyek minőségét és összetételét vizsgálva felmerül a lehetőség a dohánynövény egyéb irányú felhasználására. Ennek előnye, hogy a dohányzás okozta egészségügyi problémák miatt visszaszorulóban lévő dohányipar a növény új, kedvező felhasználásával a dohánytermesztéssel foglalkozó gazdaságok további működését teszi lehetővé.

Korábban a nikotin kinyerése és mezőgazdasági, valamint gyógyszeripari alkalmazása tűnt a legfontosabb új iránynak. Napjainkban azonban a dohánynövény megfelelő összetételű és mennyiségű fehérjetartalma miatt, fehérjealapú élelmiszer készítése is lehetségesnek tűnik az energianövényként felhasználás mellett. (Szedljak, 2011)

Kísérleti munkánk fő célkitűzése az volt, hogy a dohánynövény milyen módon használható fel bioetanol forrásként. Bioetanol előállítására minden szénhidráttartalmú anyag alkalmas, így a cukorban, keményítőben, lignocellulózban és hemicellulózban gazdag alapanyagok, mint amilyen a dohány növény is. A bioetanol előállításának egyik fontos lépése

az alapanyagul felhasznált növény poliszacharid tartalmának lebontása az élesztők számára könnyen felhasználható monoszacharid molekulákká.

A munkánk során kitűzött célt az alábbi részfolyamatok során kívántuk megvalósítani:

- poliszacharidok enzimes lebontási vizsgálata
 - cellobiáz
 - xilanáz
- enzimvizsszanyerési lehetőség vizsgálata
- visszanyert enzim aktivitási vizsgálata

2. IRODALOM

2.1. Mezőgazdasági hulladékok és melléktermékek

A mezőgazdasági termelés elsődleges célja a primer biomassa (zöld növényi termék) megtermelése, illetve ennek felhasználásával, átalakításával a szekunder biomassa (állati termék) előállítás. A harmadlagos biomassa a biológiai eredetű anyagok ipari felhasználásának termékei, melléktermékei, hulladécai, emberi települések hulladécai.

Magyarországon a mezőgazdaságban keletkező melléktermék és termelési hulladék mennyisége közelít az évi 60 millió tonnához. A 14,5 millió tonna növényi hulladékból 7 millió tonna a hasznosított, az állati eredetű kb. 45 millió tonna melléktermék és hulladék közel 49%-át, azaz 22 millió tonnát hasznosítanak. (Fenntartható mezőgazdasági rendszerek és környezettechnológia, 2008)

A mezőgazdaságban keletkező növényi és állati eredetű hulladékok és melléktermékek kezelése és hasznosítása igen változatos, a fő területek: ipari hasznosítás, mezőgazdasági hasznosítás, energetikai hasznosítás.

A mezőgazdasági hulladékok iparszerű hasznosítására különféle technológiákat dolgoztak ki, többek között szalmából cellulóz gyártása, boripari törkölyből cserzőanyagok gyártása, dohányipari hulladékból ipari nikotin előállítása. A növénytermesztés során keletkező hulladékokat az eredeti állapotban, silózva vagy szárítva állattakarmányozásra, nem megfelelő minőség esetén trágyázásra használják fel. Mivel a mezőgazdasági hulladékok szerves anyagok, ezért energia célú felhasználása is lehetséges. Az energetikai hasznosítás égetéssel, pirolízissel vagy biogáz nyeréssel történhet. (Buday-Sántha, 2009)

Egyes becslések, valamint statisztikai adatok alapján a hazai, energiaforrásként felhasználható biomassa éves mennyisége ágazatonként a következő:

- Növénytermesztés: 7-8 millió tonna melléktermék, 0,5-1 millió tonna főtermék

- Állattenyésztés: 7-8 millió tonna szárazanyag
- Élelmiszeripar: 150–200 ezer tonna szárazanyag
- Erdőgazdaság: 3–4 millió tonna faanyag
- Települési hulladék: 25–30 millió tonna (ebből 7–8 millió m³ szilárd hulladék). (Bai, 2002)

A Föld biomassza készlete nem egyenletes elosztású. A szárazföldön keletkező biomassza tömeg 40%-a erdőkben, a többi tundrákon, szavannaterületeken, mocsaras vagy füves vidékeken található. A mezőgazdaságban keletkező mennyiség kb. 9%-át teszi ki az összes biomassza készletnek. (Gyulai, 2006)

Hazánkban az évente termelődő biomassza mennyisége 350-360 millió tonnára becsülhető, ebből 105-110 millió tonna újraképződik és felhasználásra kerül.

Bioetanolt többféle alapanyagból lehet előállítani. A legelterjedtebbek a fermentálható cukrot, főleg szacharózt tartalmazó növények, mint például a cukornád, cukorrépa, kukorica, stb. Ilyen növény a dohány is (*Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum*), amelyet a világ több mint 100 országában termesztenek és használnak fel.

2.2. A dohánynövény

A dohány (*Nicotiana*) nemzetség rendszertanilag a magvas virágos növények (Spermatophyta) csoportjába, a zárvatermők (Angiospermae) rendjébe, a kétszikűek (Dicotyledones) osztályába, ezen belül pedig a burgonyafélék (Solanaceae) családjába tartozik.



1. ábra: Dohánynövény rajza (forrás: [1])

A dohánynak több fajtája létezik, ezek mindegyike az Észak-és Dél-Amerikában, Délnyugat-Afrikában, Ausztráliában és a Csendes Óceán déli részén őshonos burgonyafélék (Solanaceae) családjába tartozik. A fajok közt lágy szárú, egyéves növényeken kívül előfordulnak több éves fás növények is. A legismertebb dohány faj a hazánkban is termesztett *Nicotiana tabacum* (közönséges dohány).

A növény magjából sajtolt olajat gázolaj üzemű motorok hajtására alkalmasnak találták. (Usta N. 2005) A dohánylevelek 1,7-4% olajat tartalmaznak száraz tömegükre vonatkoztatva (Koiwai A. 1983) amely zsírsav-észterek formájában kinyerhető, amelyek a biodízel fő alkotóelemei (Vicente G. 2007)

A dohány származása szerint meleg égővi növény, alkalmazkodása a különféle éghajlati viszonyokhoz kiváló, ezért több mint száz országban folyik a termesztése. A dohánynövény általában 1-2 m magasra nő, igen érzékeny a hőmérsékleti, illetve páratartalom viszonyokra, illetve a termőföld minőségére. Növekedéséhez a 20-30°C közötti hőmérséklet és 80-85% közötti levegő páratartalom az optimális. Főleg nitrogénben szegény táptalajokon fejlődik jól. (I.A.Ross 2005)



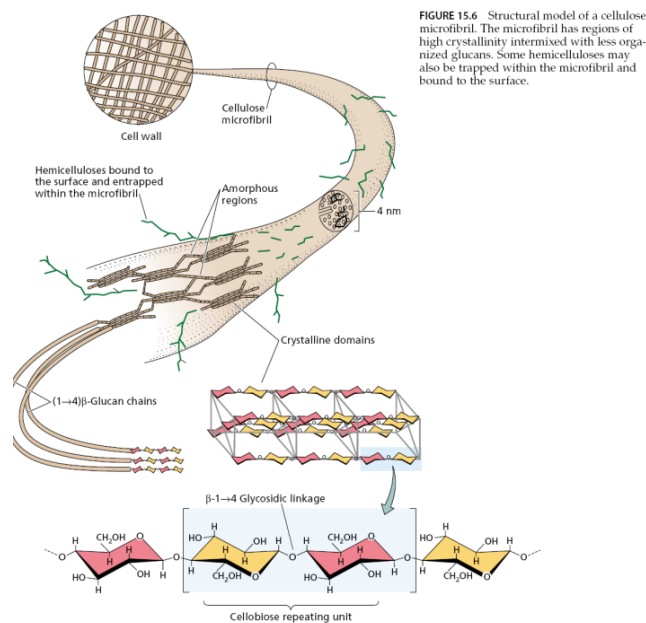
2. ábra: Dohánynövény (forrás: [2])

A dohány a szabad földbe palántázva kerül, és az eredetileg mélyen gyökérző növény bojtos gyökerhez lesz hasonló, melynek legnagyobb része a talaj felső rétegében helyezkedik el. A dohánylevelek szárpozíciójuk szerint három csoportba oszthatók: alj- vagy homoklevelek, anya- vagy deréklevelek, hegy- vagy csúcslevelek. A levelek száma növényenként 20-30 között változik, a levél erezte hálózatos, fő- és mellék erek rendszeréből áll, és ezeket szintén tartalmazzák a dohányipari termékek.

Felhasználását tekintve, az ókortól használták, főleg Amerikában pszichoaktív szerként, de a későbbi időkben és napjainkban is rekreációs droggént használják. Többféle fogyasztási módja ismert. Elsősorban nikotintartalma miatt fogyasztják, amely növeli az agy dopaminszintjét és emiatt függőséget okoz. A dohány összetevői az egészségre károsan hatnak, nagy kockázatot jelentenek a rák, a keringési betegségek, légzőszervi megbetegedések kialakulásában

2.3 Cellulóz, hemicellulóz

A növényi sejtfal alapanyaga a cellulóz, ez a legegyszerűbb szerkezetű és egyben a legalacsonyabb energiaszintet képviselő poliszacharid, D-glükózegységekből β (1,4)-kötésekkel alakul ki az alapját képző diszacharid, a cellobióz. A cellobióz diszacharidok további polimerizációval hosszú 1-4-glükán láncokká alakulnak, majd ezek a láncok mikrofibrillumokat alkotnak. A mikrofibrillumok köteggé csoportosulnak, így kialakítva egy igen nagy teherbírású szerkezetet, amely kristályos és amorf szerkezetű doméneket is tartalmaz. A cellulóz szintézise a plazmamembránban lévő cellulóz szintáz enzim katalizálja



3. ábra: A cellulóz mikrofibrillum felépítése (forrás: [3])

A hemicellulóz is a növényi sejtfal egyik fő felépítő anyaga, úgynevezett mátrix-poliszacharid, a cellulóz mikrofibrillumok elhelyezkedésében és összetartásában van nagy szerepe. A hemicellulóz nem egy anyagot takar, több hasonló anyag gyűjtőneveként használjuk. A főbb hemicellulózok közé tartozik a xiloglükán, a glükoarabinoxilán, a xilán, a

glükomannán, és az arabinoxilán. A különböző növények hemicellulóz összetétele igen jelentős lehet. A mátrix poliszacharidok, így a hemicellulózok is a golgi membránról lefűződő vezikulumok segítségével jutnak el a sejtfalba a keletkezési helyükről. (S.J. Horn et al, 2012)

A sejtfalmátrixban jelentős szerepe van a pektinnek is, amely szerkezetileg bonyolultabb a fentebb említett két poliszacharidnál.

2.4 Enzimek, enzimes lebontás

Az évente képződő nagy mennyiségű cellulóz tartalmú szerves anyag lebontásában legnagyobb szerepet a különféle mikroorganizmusok játsszák. A baktériumok, gombák, protozoák különféle környezeti körülmények közt, különféle igényekkel rendelkeznek. Eszerint előfordulnak köztük, aerob és anaerob, mezofil és termofil szervezetek is. A cellulóz-bontó mikrobák elsősorban a talajban, növényi hulladékokban, lápokban, mocsarakban, természetes vizek üledékében fordulnak elő.

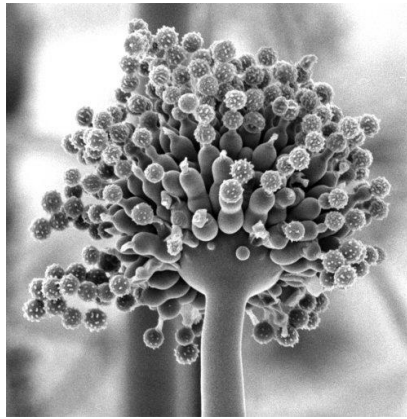
A celluláz illetve hemicelluláz enzimek fermentációs úton történő előállítása az ipari biotechnológia egyik legfontosabb folyamata. A gyakorlatban a tömlősgombák (Ascomycetes) közé tartozó *Trichoderma reesei* fonalas gombát használják celluláz termelésre. A legjobban termelő *Trichoderma reesei* törzsek képesek akár 100g/L koncentrációban extracelluláris fehérjét kiválasztani, ezt a mennyiséget 90%-ban cellulázok és hemicellulázok teszik ki. A *Trichoderma* fajok a talajban szinte minden éghajlaton megtalálhatók, többségük Észak-Amerika és Európa területéről származik. (S.J. Horn et al. 2012)



4. ábra: *Trichoderma reesei* fénymikroszkópos képe (forrás: [4])

Az enzimtermelésre is használt mikroorganizmusok közül kiemelkedő jelentőségű még az *Aspergillus niger*, a penész egy fajtája. Előfordul a talajokban, komposztban és fekete

telepei fedezhetők fel zöldségek, gyümölcsök és romlott ételek felszínén. A biotechnológiai iparban számos alkalmazása ismert, citromsav és glukonsav előállítását is *Aspergillus niger* segítségével végzik. A feketepenyész alkalmas alfa-amiláz, cellobiáz, glükóz-izomeráz, pektináz, alfa-galaktozidáz és glükó-amiláz előállítására



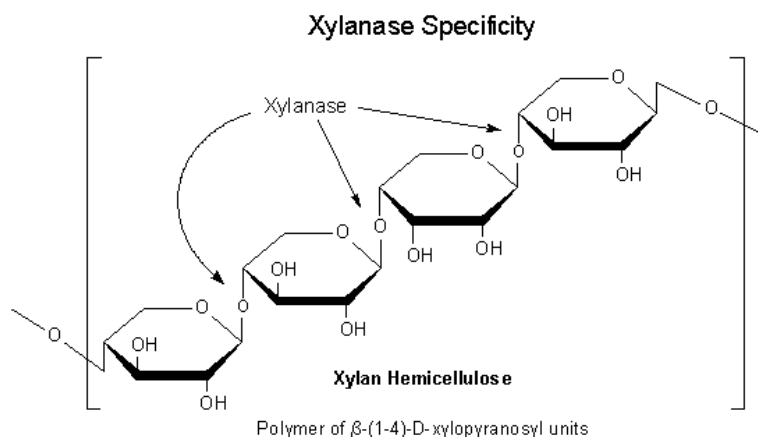
5. ábra: *Aspergillus niger* elektronmikroszkópos képe (forrás: [5])

A cellulóz β -1,4-glikozidos kötéseinek bontására celluláz enzim alkalmazható. A celluláz dózisének növelésével a hidrolízis mértéke és hozama egy ideig növelhető, de jelentősen nőnek a költségeket is. A celluláz enzim terhelése a hidrolízis során változik, ez függ a szubsztrát típusától és koncentrációjától. Az amorf és hibás kristályos részek potenciális támadási pontok a celluláznak a szubsztráthoz kapcsolódás során. A kapcsolódás után a celluláznak lokalizálni és izolálnia kell a megfelelő cellulózláncokat. (Q.Gan et al. 2002)

A cellobiáz (β -glükózidáz) enzim katalizálja a cellobióz két anhidro-glükóz egysége közötti kötés hasítását, továbbá egy glükóz egység eltávolítását az oligoszacharidok nem-redukáló végéről. A β -glükózidáz a cellulóz teljes hidrolíziséhez szükséges enzimkomponens. A glükóz a cellobiázt gátolja. (Dienes, 2006)

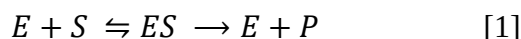
A hemicellulózok lebontására a legelterjedtebb körben használt enzim a xilanáz, amely a hosszú, polimerizálódott xilózból álló láncokat bontja a láncon belüli β -1,4-glikozidos kötések hidrolízisével. Legismertebb felhasználási helye a papíripar, ahol a termék lágyítására és fehéritésére használják. Használják még komposztálás, silózás elősegítésére is, illetve elterjedt az élelmiszeriparban is. Főleg *Trichoderma* fajokkal (*Trichoderma lanuginosus*) termeltetik, illetve néhány esetben *Bacillus* és *Streptomyces* fajokkal. A *Trichoderma lanuginosus* extracellulárisan termeli a 22-24 KDa nagyságú enzimet. (M.G. Tabka et al. 2006) Működését tekintve főleg a savas, illetve semleges kémhatáson működik

megfelelően, de az optimális körülmények enzimkészítményenként változhatnak, hiszen e tulajdonságok nagyban függenek az enzimet termelő mikroorganizmustól. (J. Hu et al. 2011)



6. ábra: Xilanáz enzim hasítási helyei (forrás: [6])

Az enzimek a biológiai rendszerek katalizátorai. Segítségükkel a kémiai reakciók gyorsabban zajlanak le, azonban csak olyan reakciókat képesek gyorsítani, amelyek termodinamikai szempontból lehetségesek. Az enzim katalízis alapja hasonló a kémiai katalízishez, azaz a lejátszódó folyamat aktiválási energiájának valamilyen módon való csökkentésén alapul. Ezek a fehérék jellegzetes szerkezetükkel biztosítják a felületet a szubsztrát megkötésére, a helyet ahol a folyamat végbemegy, az enzim aktív centrumának nevezzük. Egy enzim általában egy aktív centrum doménnel rendelkezik. Az enzimek általános mechanizmusa, hogy fizikailag kapcsolódnak a szubsztráttal, majd ez az enzim-szubsztrát komplex olyan változásokat szenved, amely során a szubsztrát terméké alakul, míg az enzim eredeti formájában lép ki a reakcióból. Az enzim-szubsztrát képződése visszafordítható folyamat, azaz a szubsztrát az átalakulása előtt még leszakadhat az enzimről, azonban ha a kémiai változás megindul, a folyamat biztosan és visszafordíthatatlanul végbemegy [1].



Az enzimek sokfélesége és különböző működési mechanizmusa miatt nehéz összehasonlítani tulajdonságaikat. Ennek egységesítésre szolgál a katalitikus egység (katal). 1 katal azt az anyagmennyiséget jelöli (mol), amelyet az adott enzim 1 másodperc alatt termel. Mivel általában ez a szám igen kicsi minden enzim esetében, elterjedtebb a unit mértékegység, amely 1μmol-ra vonatkozik.

2.5. Ultraszűrés

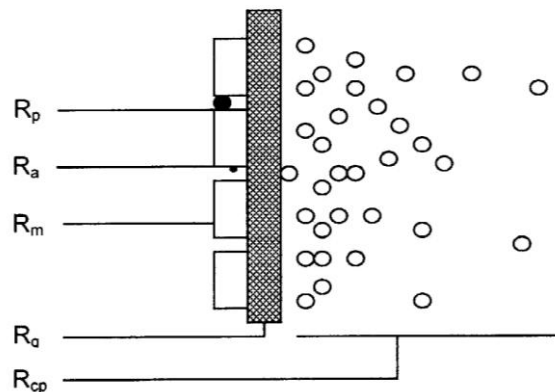
A membránok permszelektív gátak, amelyek sokféle szeparációs eljárásra alkalmasak. Ezek közül az egyik legelterjedtebb membrános szétválasztási módszer a membránszűrés.

A membránok két legjellemzőbb teljesítményi értéke a szelektivitás és az áteresztőképesség, vagy más néven fluxus. A fluxus az a térfogat (V, m^3), amelyet a membrán egységnyi felülete (A, m^2) egységnyi idő (t, s) alatt átereszt [2].

$$J = \frac{dV}{A \cdot dt} = \frac{\frac{dX}{dx}}{\eta \cdot R} \quad [2]$$

A permeabilitás vagy más néven ellenállás, (R, m^{-1}) számos változótól függő paraméter. Optimális esetben az ellenállást csak a membrán jelenti, de a gyakorlati mérések bizonyítják, hogy a szűrt anyag is jelentősen befolyásolja a szűrés eredményességét. A teljes ellenállásba beleszámít természetesen a membrán ellenállása (R_m), a koncentráció-polarizáció (R_{cp}), a kialakuló gélréteg (R_g), az adszorpció (R_a), illetve az eltömődés okozta ellenállás (R_p) is, ahogy ezeket a 8. ábrán s láthatjuk [3].

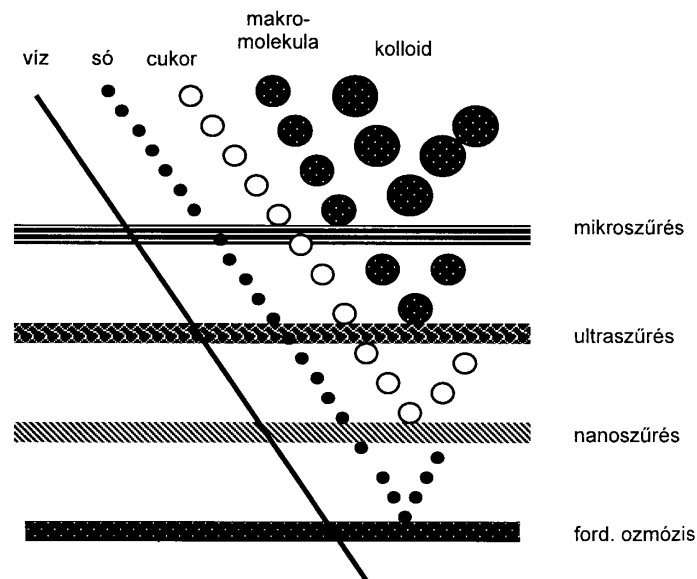
$$R = 1 - \frac{c_p}{c_f} \quad [3]$$



7. ábra: Membránellenállások szemléltetése (forrás: BálaFiné dr. Bakó, 2002))

A membránszűrés eljárásokat leválasztási mérettartomány szerint csoportosíthatjuk. Nagybottól a kisebb felé: mikroszűrés, ultraszűrés, nanoszűrés, fordított ozmózis. Ezeknél a folyamatoknál alkalmazzuk a nyomáskülönbség elvét, azaz a membrán két oldala között olyan nyomáskülönbséget hozunk létre, hogy számunkra megfelelő fluxust kapjunk. Minél kisebb a pórusméret, annál nagyobb nyomást kell alkalmazni. A kísérleteim során ultraszűrést

használtam, mivel ennek mérettartományába esnek a fehérjék, és a célom a fermentlében lévő enzimek elválasztása volt a keletkezett cukorterméktől. (R. Reis et al. 2001; Yi H. et al. 2012)



8. ábra: Membánszűrési módok szemléltetése (forrás: BálaFiné dr. Bakó)

Az ultraszűrést főleg makromolekulák elválasztására alkalmazzák, ezért a művelet során olyan membránok használatosak, amelyek pórusmérete 1-500 nm-ig terjed, és általában aszimmetrikus kialakításúak. A leggyakrabban előforduló membrán alapanyagok a poliéter szulfon, poliakrilnitril és származékai, cellulóz származékok, poliimid, alifás poliamidok, poliéter-éterketon, illetve ezeken kívül elterjedően van a különböző szerves kémiai anyagok használata. (BálaFiné dr. Bakó K. 2002)

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A dohány

A kísérletek során alapanyagul használt dohány egy magyar termelőtől származik. Kétféle dohánymintát használtunk, az egyik a „kísérleti” dohány (KD), amely a szárát és a leveleket is tartalmazza. A kísérleti dohány és az iparban használt dohány között a termesztés módja a különbség. A kísérleti dohány töveit közelebb ültették egymáshoz, a nagyobb egységnyi területre eső biomassza hozam érdekében és itt a teljes dohánynövény a mintába kerül.

A másik minta a „melléktermék” dohány (MD), amely a dohányipari felhasználás utáni fennmaradó részeket, főleg a származékot és a kis nikotintartalmú leveleket tartalmazza. A mintákat felhasználásig fagyaszttva tartottuk. A dohány előkészítése és a felület növelése céljából aprítást alkalmaztunk, konyhai aprító segítségével.

3.2 Enzimmészítmények

3.2.1 Celluláz

Kísérleteink során Sigma-Aldrich gyártmányú, *Trichoderma reesei* által termeltetett folyadék formátumú enzimmészítményt használtunk, melynek sűrűsége $1,2 \text{ g/cm}^3$ 25°C -on. Aktivitását tekintve 700 unit enzimmennyiséget tartalmaz grammonként

3.2.2 Cellobiáz

Kísérleteink során Sigma-Aldrich gyártmányú, *Aspergillus niger* által termeltetett folyadék formátumú enzimmészítményt használtunk, melynek sűrűsége $1,2 \text{ g/cm}^3$ 25°C -on. Aktivitását tekintve 250 unit enzimmennyiséget tartalmaz grammonként

3.2.3 Xilanáz

Kísérleteink során Sigma-Aldrich gyártmányú, *Trichoderma longibrachiatum* által termeltetett endo-1,4- β -xilanázt használtunk. A készítmény por formátumú és aktivitását tekintve 1 unit enzimmennyiséget tartalmaz milligrammonként.

3.3 Enzimes lebontás módja:

Erlenmeyer lombikba 4 g dohányra 50 cm^3 desztillált vizet mértünk. Az elkészített szuszpenziókat a rázatos vízfürdőbe helyeztük, és hozzáadtuk a kísérlettervben meghatározott enzimmennyiségeket. A pH értékeket a kezelés alatt folyamatosan ellenőriztük, és a szükséges pH értéken tartottuk 0,1M citromsav vagy 0,1M nátrium-hidroxid oldat segítségével.

A folyamatok során a 0. 24. 48. 72. és 96. órában mintát vettünk (1 cm^3) a redukáló cukor mennyiségének meghatározására, illetve későbbi ellenőrzés lehetőségére.

Összesen 12 darab 250 cm^3 -es lombikot használtunk, amelyekben a fermentálandó anyagok voltak. A pH beállítása után a lombikokat parafilmmel zártuk le és egy Tecator 1024-es típusú automatikus rázató vízfürdőbe helyeztük. A hőmérsékletet a kísérletnek megfelelően beállítottuk és kevertettük. Az ilyen módszerű fermentálások során a pH beállítása 24 óránként történt.



9. ábra: Rázott vízfürdő működés közben (fotó: Vitay Dóra)



10. ábra: Maradványok fermentálás után (fotó: Vitay Dóra)

A nagyobb léptékű cukrosításra és az enzimvisszanyerés vizsgálatára az INFROS HT által gyártott Miniforst, fűthető, kevertetett bioreaktort használtuk. A fermentor össztérfogata 2,5 liter, de a kísérlet során csak 1 liternyi fermentálandó anyagot helyeztünk a készülékbe. Ennél a mennyiségnél is megfelelő volt a keverőlapát elhelyezkedése és minden érintkező illetve adagoló megfelelően helyezkedett el és működött. A berendezés alkalmas a fermentáció során állandó pH tartására, mivel egy beépített pH mérő mellett tartalmaz automatikus sav és lúg adagolót is. Ezeket a fermentorokat 160 rpm keverési sebességgel használtuk, 50°C-ra állítva a termosztátot és 5,0-s pH érték mellett 24 óráig ment a fermentáció.

3.4 Redukáló cukortartalom meghatározása

A spektrofotometriás mérésen alapuló cukortartalom meghatározásához 1%-os 3,5-dinitroszulfonsav (DNSA) reagenst és 40%-os kálum-nátrium-tartarát oldat használtunk. A

mintavételek során minden esetben készítettünk egy vak oldatot, amelyet a kísérletről függően desztillált vízből, vagy az enzimet nem tartalmazó mintából készítettünk.

A mérés során minden lombikból párhuzamosan 1 ml mintát vettünk eppendorf csőbe, majd ezeket 10 percig 5000 rpm sebességgel centrifugáltuk, hogy a nagyobb szemcsék kiváljanak, és tisztább oldatot kapjunk. A centrifugált minták felülúszóját lepipettáztuk és a felülúszóból külön eppendorf csőbe pipettáztunk 300μl-t, majd ehhez adtunk 300μl DNSA-reagenst. Az eppendorf csöveket lezárva 15 percre 90°C-os vízfürdőbe helyeztük. A vízfürdő után 100μl 40%-os K-Na-tartarát oldatot adtunk hozzá, majd hagytuk lehűlni a mintákat.

Miután a minták lehültek, 10-szeresére hígítottuk majd ennek a hígított oldatnak a fényabszorpcióját mértük 540 nm-en. Minden esetben a méréshez a megfelelő „vak” oldatot alkalmaztuk nulla pontként.

A cukorkoncentrációk pontos, számszerű meghatározásához egy kalibrációs egyenest használtunk, amelynek egyenlete [4]:

$$y = 12,104x + 0,0129 \quad [4]$$

Ebből a koncentráció mg/ml egységben a következő módon számolható [5]:

$$c = (12,104 * A + 0,0129) * 10 \quad [5]$$

3.5 Fehérjetartalom meghatározása

A minták fehérjetartalmának meghatározásához szintén spektrofotometriás módszert alkalmaztunk. A minták abszorbanciáját mértük 280nm-en, ahol a fehérjék átlagos moláris extinkciós koefficiense $1,6 \times 10^5$ mol/cm. Így, desztillált vízre nullázva (mivel annak fehérjekoncentrációja valószínűsíthetőleg nulla) a Lambert-Beer törvény segítségével meghatározhattuk a koncentrációt [6].

$$A = \varepsilon * c * L \quad [6]$$

Ahol A a 280nm-en mér abszorbancia érték, ε a moláris extinkciós koefficiens, c a koncentráció, L pedig a fény útjának (ez esetben a kuvetta vastagságának) hossza cm-ben. A moláris extinkciós koefficiens a koncentrációtól független, anyagra jellemző állandó.

3.6 Visszatartás értékének meghatározása

A fehérjekoncentrációkból a visszatartást a következő módon számoltuk ki [7],

$$\text{visszatartás} = R = \left(1 - \frac{c_{\text{permeátum}}}{c_{\text{feed}}} \right) * 100 \quad [7]$$

amely összefüggésben $c_{\text{permeátum}}$ a permeátum frakció fehérje koncentrációját, c_{feed} a betáplált minta fehérje koncentrációját jelenti.

3.7 Enzimaktivitási vizsgálatok

Az enzimaktivitási mérésekhez minden esetben az enzimet tartalmazó frakcióból, a koncentrátumból 45 cm^3 -t adtunk $0,5 \text{ g}$ cellulóزالapú kisméretűre összedarabolt szűrőpapírhoz. A lebontást 50°C -ra állítva és kevertetve, óránkénti mintavétel mellett hajtottuk végre.

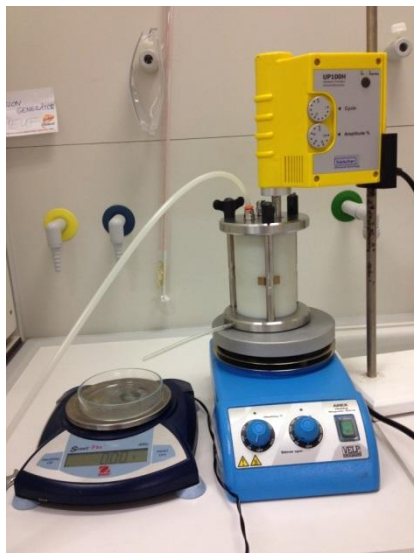
3.8 Membránszűrés

Kísérleteink során ultraszűrést alkalmaztunk az enzimek leválasztására. A választott membrán 5KD -os pórusmérettel rendelkező aszimmetrikus poliéterszulfon membrán. A membránt minden esetben használat előtt egy napig desztillált vízben áztattuk.

A berendezés, amellyel a szűrést végeztünk állt egy fémvázból, amely alsó részén egy műanyagcső szolgált a permeátum kivezetésére. Belsejébe lehetett helyezni a membránt, amely szélére tömítőgyűrűt helyezve került a műanyag henger, majd erre újabb tömítőgyűrűt helyezve került a fedőlap, amelyet szárnyas csavarokkal rögzítettünk. A berendezés tetején különböző kivezetések és nyílások kaptak helyet. A túlnyomást biztosító nitrogénpalackból vezető csőnek szolgáló bevezetés, egy mintavevő nyílás, valamint egy biztonsági szelep. A mintavevő nyílás természetesen lezárható. A berendezést egy mágnesek keverőre helyeztük, mivel a fedőben helyet kapott egy mágneses keverőrúd is, amely megfelelő távolságban helyezkedik el a membrántól, hogy ne sértse meg azt. A berendezés kivezetéséhez egy mérlegre helyezett Petri-csészét tettünk.



11. ábra: Membránszűrő berendezés működésre kész állapotban (fotó: Vitay Dóra)



12. ábra: Membránszűrő berendezés ultrahangos készülékkel (fotó: Vitay Dóra)

A mérési paraméterek a következők voltak: transzmembrán nyomás: 3,5 bar, fordulatszám: 350 rpm, membrán jellemzők: 5KD, PES, betáplált anyagmennyiség: 100 cm³

A fluxus értékeket, azaz, hogy egységnyi felületen egységnyi idő alatt mennyi szűrlet/permeátum áramlik át, a következő módon számolhatjuk ki [8]:

$$J = \frac{V}{A \cdot \Delta t} \left[\frac{L}{m^2 \cdot h} \right] \quad [8]$$

Ahol J a fluxust, A a membrán felületét, Δt pedig a V mennyiségű víz átáramlásának idejét [9].

$$R = \frac{\Delta p}{J \cdot \eta} \quad [9]$$

Ahol R az ellenállás, Δp a szűrés során alkalmazott nyomáskülönbség (Pa), J a fluxus (m³m⁻²s⁻¹), η pedig a szűrt anyag viszkozitása (Pas). Ezen képlet segítségével megállapítottuk a membrán ellenállását (R_m) az első, desztillált vizes mérés eredményeiből, a teljes ellenállást (R_t) a minta szűrése során kapott eredményekből számolhattuk ki, míg az eltömődés mértékét (R_f) a tisztítás utáni desztillált vizes szűrés eredményeiből kaphattuk meg. A gélréteg ellenállás kiszámítása során a már ismert ellenállásokat használtuk fel a következő módon [10]:

$$R_g = R_t - R_f - R_m \quad [10]$$

Az első mérés során a keverésen és a nyomáson kívül más, szűrést befolyásoló hatást nem alkalmaztunk.

Az ultraszűrést megismételtük, ultrahangos erőter kialakításával is. Az ultrahang készüléket (UP 100 H Ultrasonic processor, Hielscher, Germany) egybeépítettük a membránszűrő berendezéssel (MEUF) úgy, hogy a membrán ultraszűrő készülék fedlapjában lévő eredeti feltöltő nyílás helyére egy alul külső, felül belsőmenetes acélpersely került, melybe belehelyeztük az ultrahangkészülék szonárját. Folyamatosan működtettük 60% amplitúdóval, illetve 3,5 bar nyomáson és 350 RPM kevertetés mellett.

4. EREDMÉNYEK

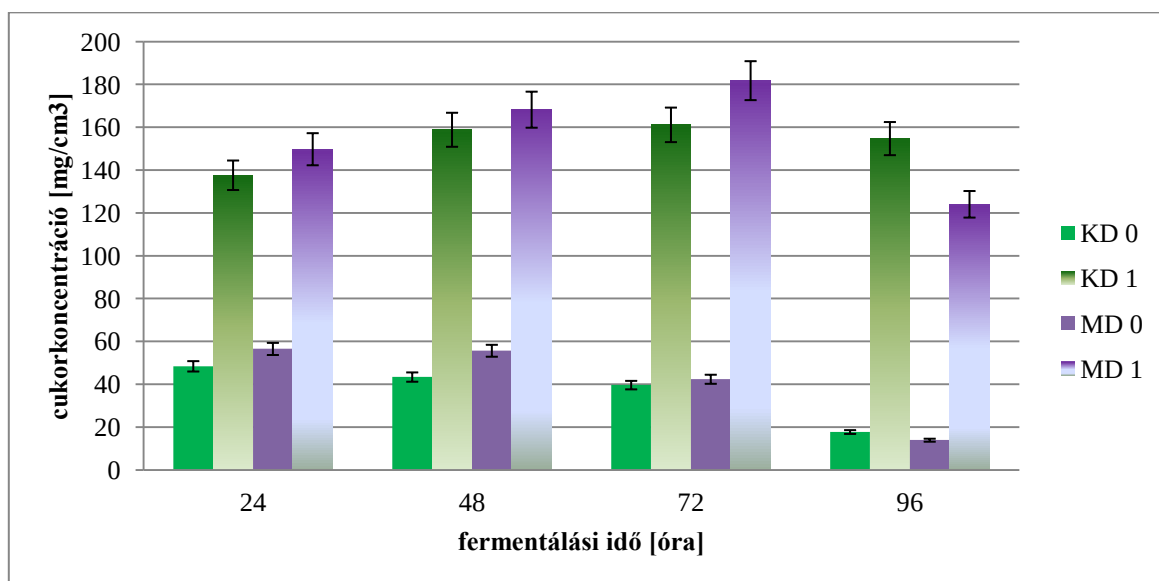
4.1. pH érték változásának hatása celluláz és cellobiáz enzimek működésére

Az enzimes lebontás pH-függésének vizsgálatához a korábbi kísérleti eredményekből meghatározott optimális enzimmennyiségeket alkalmaztuk. Kísérleteinket két eltérő pH tartományban végeztük el. A celluláz és cellobiáz enzimek gyártó (Sigma-Aldrich) által meghatározott pH optimuma 5,0, de nemzetközi irodalmi adatokra hivatkozva (Benkun Qi, et al. 2011) a 4,8 pH értéken is elvégeztük a fermentációt (S. J. Horn et al, 2011). A kísérletek 96 órán keresztül folytak, 24 óránként pH méréssel, mintavétellel, valamint redukáló cukortartalom méréssel, amelyet a [4] és [5] egyenlet segítségével határoztuk meg. Az alábbi táblázatban láthatóak a minták összetételei.

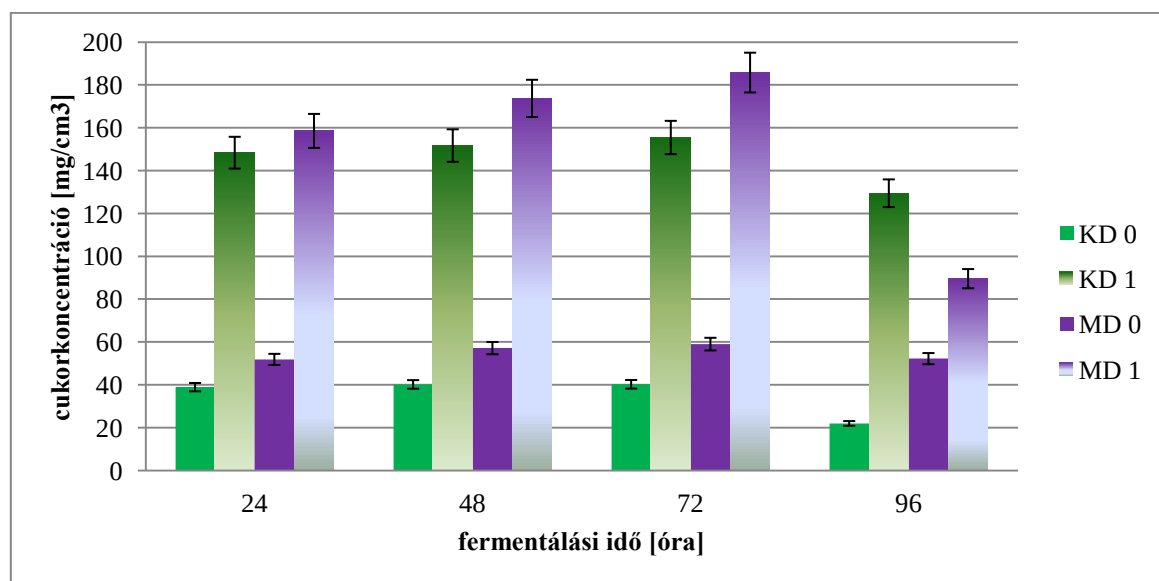
1. táblázat: Kísérleti minták összetétele a pH függés hatásának vizsgálatához

	dohány [g]	H ₂ O [cm ³]	celluláz [cm ³]	celluláz [Unit]	cellobiáz [cm ³]	cellobiáz [Unit]
MD0	4	50	0	0	0	0
MD1	4	50	0,466	391,44	0,386	115,8
KD0	4	50	0	0	0	0
KD1	4	50	0,372	312,48	0,458	137,4

A 13-14. ábrán megfigyelhető, hogy már kis mennyiségben termelődött redukáló cukor az enzimek készítmények nélküli minták esetében is (0 h) mindkét dohány mintánál, de ezek cukorkihozatala jelentősen kevesebb az enzimek készítményekkel kezelt minták cukorhozamához képest. Az enzimmel bontott kísérleti dohány és az enzimmel bontott melléktermékdohány esetében a cukortermelődés a pH 4,8-as tartományban bizonyult jobbnak. Mindkét pH tartománynál jól látható az ábrán, hogy a dohányminták fermentálásához elegendő a 72 óra, mivel ezután a fermentálási idő növelésével a cukorkoncentráció csökkenő tendenciát mutat.



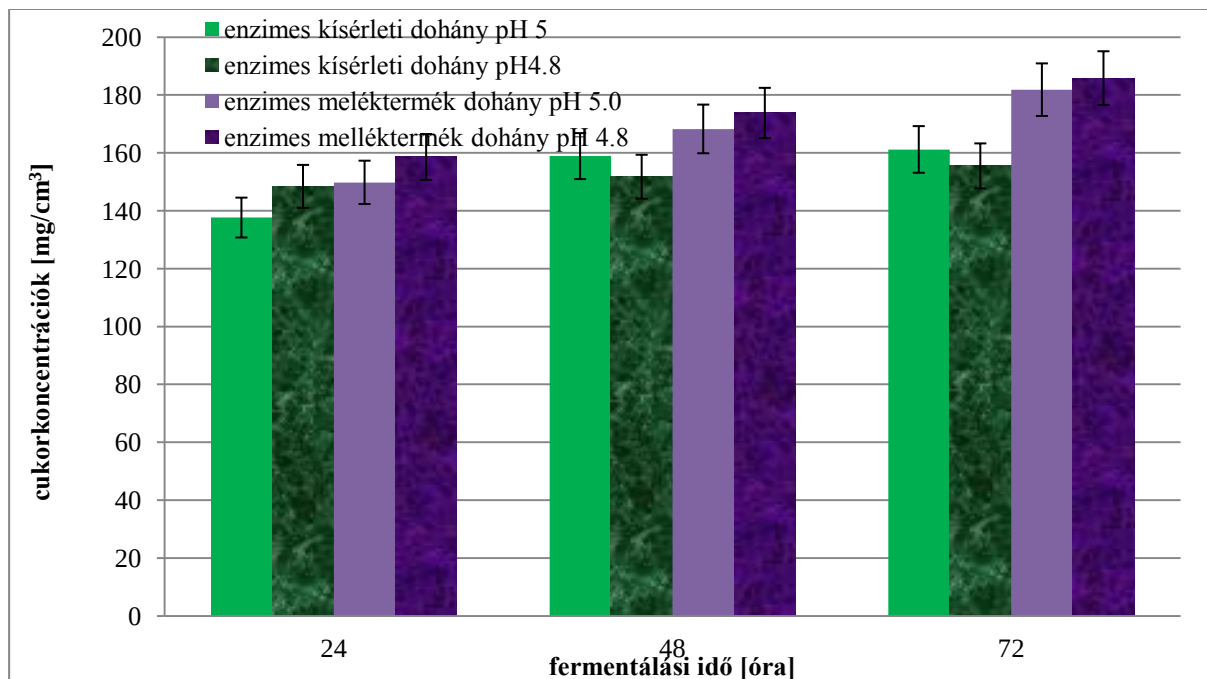
13. ábra: pH 5 értéken végzett enzimes lebontás eredményei az idő függvényében
(MD – melléktermék dohány, KD – kísérleti dohány, 0 –enzim nélkül, 1- enzimmal)



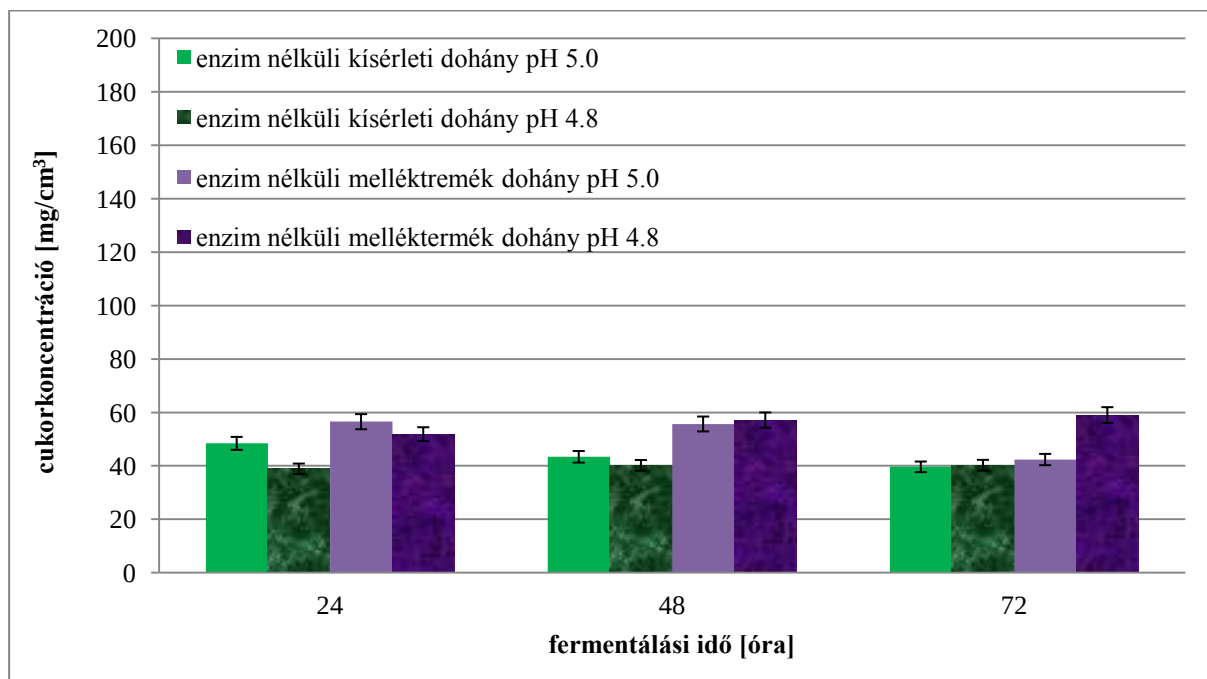
14. ábra: pH 4,8 értéken végzett enzimes lebontás eredményei az idő függvényében
(MD – melléktermék dohány, KD – kísérleti dohány, 0 –enzim nélkül, 1- enzimmal)

A 13. és 14. ábrán bemutatott eredmények összehasonlításából általánosan megállapíthatjuk (15-16. ábra), hogy az enzimmal kezelt dohánymintáknál a pH 4,8-as tartományban értünk el nagyobb cukorkihozataalt. A méréseinknél tapasztalt különbségek azonban nem jelentenek szignifikáns eltérést a két pH érték viszonylatában.

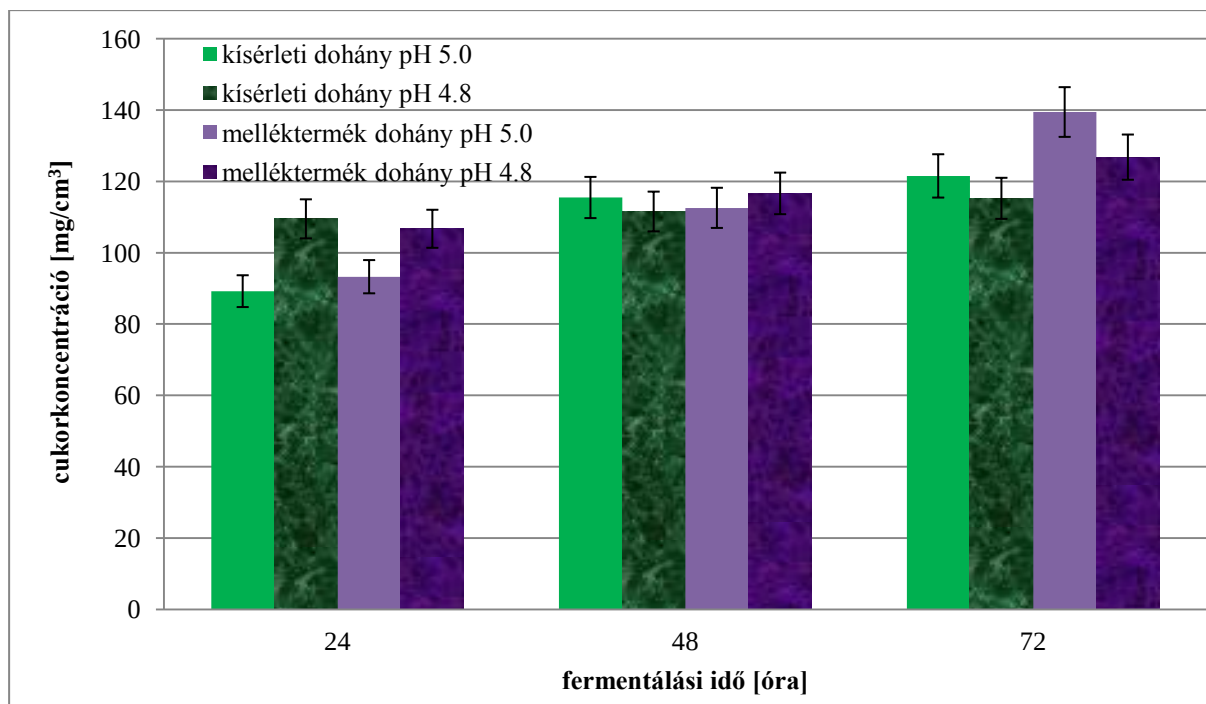
Ipari megvalósítás szempontjából célszerű fermentálási időnek mondhatjuk akár a 24 akár a 48 órát is, de hosszabb időtartamú enzimes kezelés nem látszik indokoltnak mérési adataink alapján.



15. ábra: Enzim jelenlétében a pH 4,8 és pH 5,0 értéken kapott cukorkoncentrációk összehasonlítása a fermentálási idő függvényében



16. ábra: Enzim hozzáadása nélkül a pH 4,8 és pH 5,0 értéken kapott cukorkoncentrációk összehasonlítása a fermentálási idő függvényében



17. ábra: Enzim hozzáadása nélkül a pH 4,8 és pH 5,0 értékeken kapott cukorkoncentrációk összehasonlítása a fermentálási idő függvényében

A 17. ábráról azt a következtetést tudjuk levonni, hogy gyakorlatilag nincs számottevő különbség a két pH érték között, tehát valószínűsíthető, hogy ezért oszlik meg a vélemény a szakirodalmakban is. Mivel a mintavételek között a pH értékek minimális ingadozást mutattak, feltételezhető, hogy a 24 órás pH ellenőrzést gyakrabban lenne célszerű elvégezni az optimális pH tartomány megtartása érdekében.

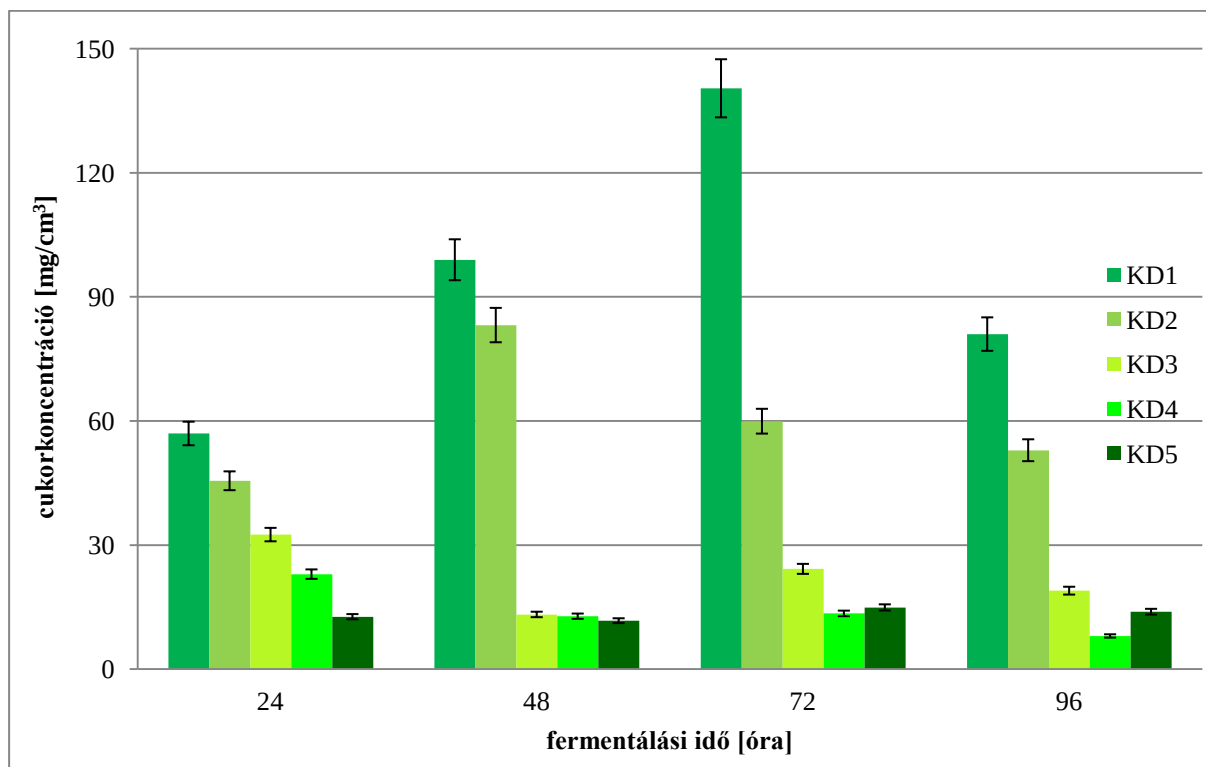
4.2. Enzimes lebontás xilanáz enzimmel

Xilanázos kísérleteink során az volt a fő kérdés, hogy képes-e ez az enzim is a dohány minták bontására, illetve ha igen, milyen mennyiségben érdemes alkalmazni. Ennek vizsgálatára először egy felező „hígítási” sort készítettünk a következő módon: 4g dohánymintához különböző enzimmennyiségeket adagoltunk. Mivel a készítmény a celluláz és cellobiáz készítményekkel ellentétben por formátumban állt rendelkezésünkre, a mennyiségeket milligrammban mértük. A következő táblázatban foglaltuk össze a minták összetételeit.

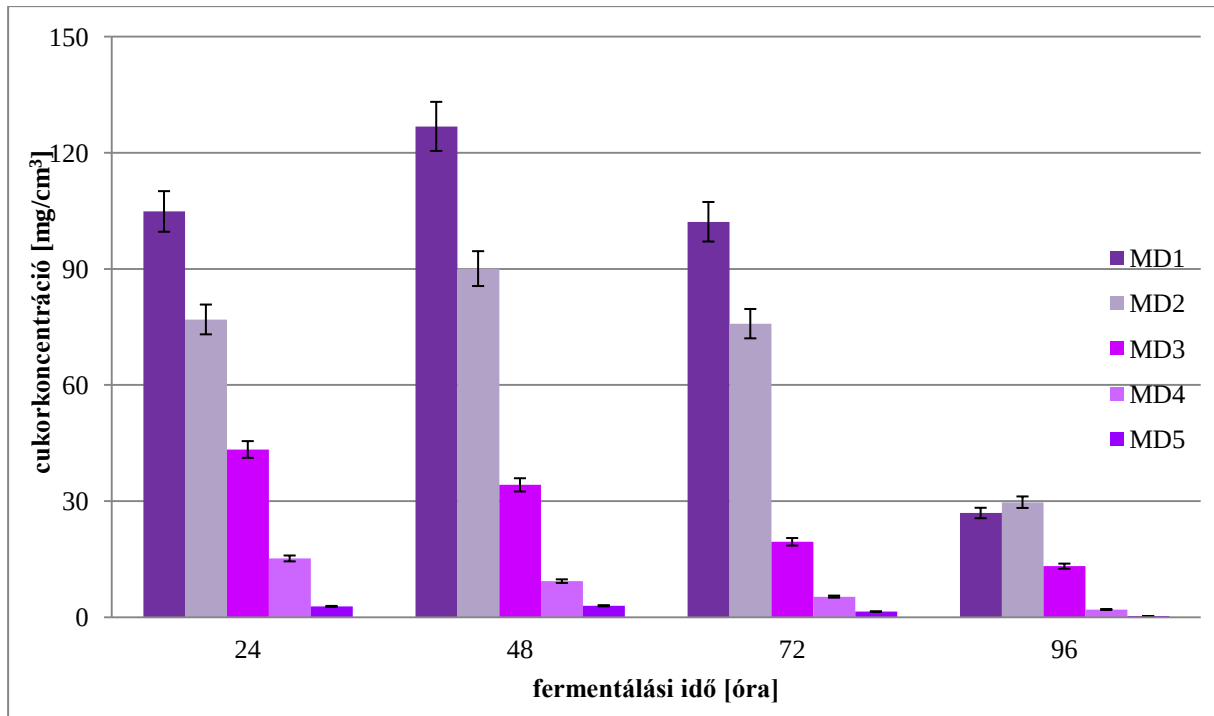
2. táblázat: Kísérleti minták összetétele a xilanáz enzim hatásának vizsgálatához

Minta sorszáma	Xilanáz Enzim [mg]	Xilanáz enzim [unit]	Dohány [g]	Víz [cm ³]
0	0	0	4	50
1	200	200		
2	100	100		
3	50	50		
4	25	25		
5	12,5	12,5		

Az enzim, a gyártó által megadott működési optimumán pH=4,5, hőmérséklet 30°C végeztük a kísérleteket, mindkét típusú dohánymintával külön-külön kísérletsorozatban. A mintavételezés, redukáló cukor mérése a [4] és [5] egyenletek segítségével, és a pH beállítása a korábbi kísérletekkel azonos módon, 24 óránként történt 96 óráig. A 18. és a 19. ábrán a mért eredmények összefoglalása látható.



18. ábra: Xilanáz enzimmel végzett bontási kísérletek cukorkihozatalai az idő függvényében kísérleti dohány esetén (KD1-KD5 a 2. táblázatban látható mintaszámokra vonatkoznak)



19. ábra: Xilanáz enzimmel végzett bontási kísérletek cukorkihozatalai az idő függvényében melléktermék dohány esetén (MD1-MD5 a 2. táblázatban látható mintaszámokra vonatkoznak)

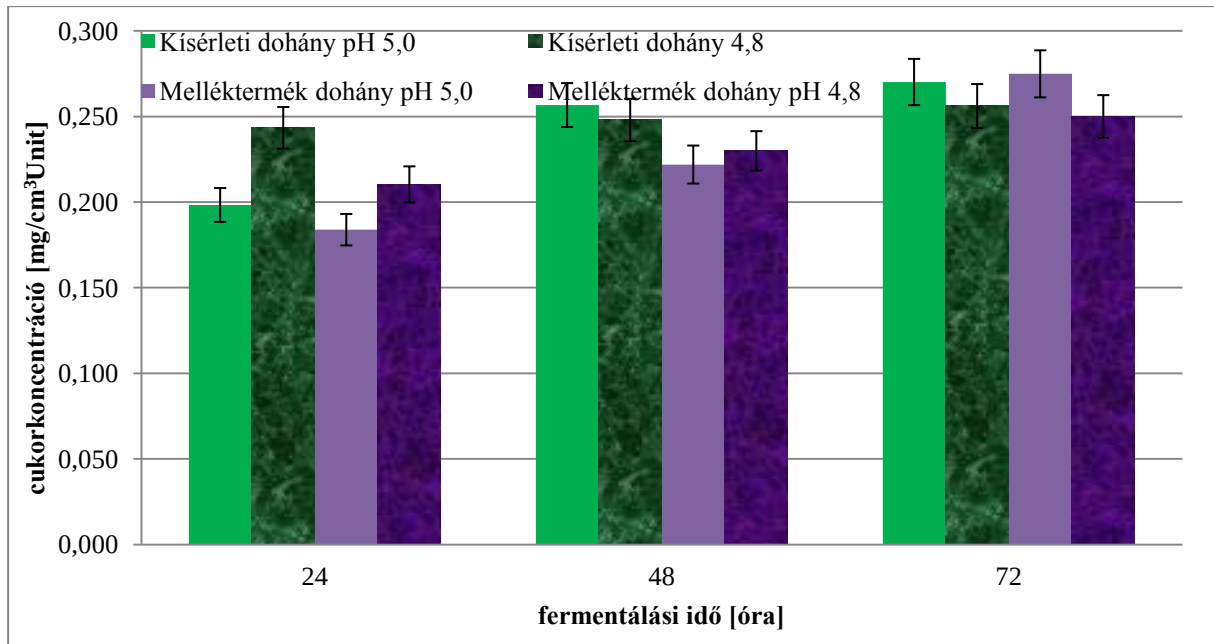
A fenti ábrákon jól látszik, hogy mindkét dohányminta esetében a 200 mg enzimet tartalmazó minták cukorkihozatala lett a legnagyobb. A kísérletsorozatunk következő lépése a xilanáz mennyiségének optimalizálása egy újabb kísérletterv segítségével, már a 200 és a 100 mg enzimmennyiség közé eső, valamint a 200 mg fölé eső tartományban.

Ezen kívül még megállapíthatjuk azt is, hogy a fermentálást a xilanáz esetében is elegendő 72 óráig végezni, illetve ebben az esetben is elmondhatjuk, hogy célszerű fermentálási időnek a 24 vagy 48 óra tekinthető.

4.3. Enzimes lebontások összehasonlítása

A két különböző enzim által termelt cukorkihozatal összehasonlíthatóság érdekében meghatároztunk a fajlagos cukorkihozatalt, vagyis az egységnyi bevitt enzimegységre vonatkoztatott cukor mennyiségeket – $[mg_{\text{cukor}} \text{cm}^{-3} \text{Unit}^{-1}]$.

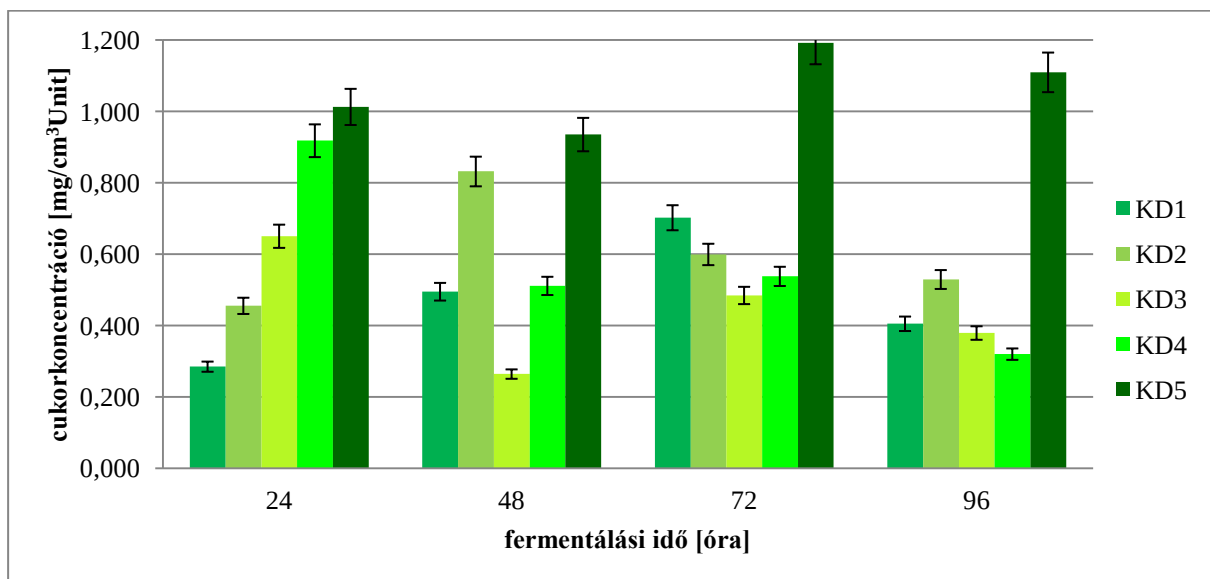
A celluláz-cellobiáz enzimrendszer esetében ezek a fajlagos értékek a 0,2 - 0,3 $mg_{\text{cukor}} \text{cm}^{-3} \text{Unit}^{-1}$ értékek között változtak. A kísérleti dohány mintáknál nagyobb lebomlási sebességet tudtunk kimutatni, a melléktermék dohányból származó mintáinknál, amelyek lényegesen nehezebben hozzáférhető cellulóz rostokat tartalmaznak, ezt a fajlagos értékszintet (0,25 $mg_{\text{cukor}} \text{cm}^{-3} \text{Unit}^{-1}$) csak a 72 órás mintavételnél tudtuk kimutatni (20. ábra).



20. ábra: Celluláz és cellobiáz enzimek által termelt cukorkihozatali eredmények pH 4,8 és pH 5,0 értékek mellett

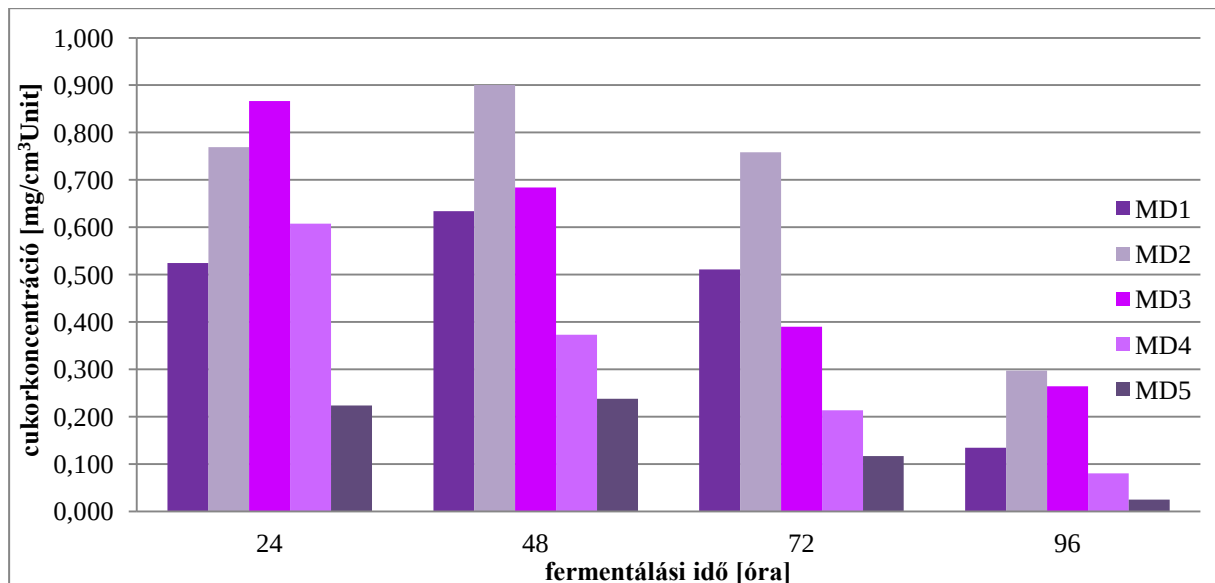
Tekintettel arra, hogy a xilanáz enzimmel végzett lebontási kísérleteinket még nem az optimum értéken végeztük, ezért ott mindkét minta esetében több kísérleti beállítás is a rendelkezésünkre állt a fajlagos cukorkihozatal számításához (21. és 22. ábra).

A kétféle minta eredetéből és így tulajdonságából adódó különbség itt is kimutatható. Amíg a kísérleti dohánymintáknál, vagyis ott ahol a könnyebben hozzáférhető cellulóz rostokból több található a mintában, a legkisebb enzimegység adja fajlagosan a legelőnyösebb cukorkihozatali értékeket.



21. ábra: Xilanáz enzimmel végzett kísérletek fajlagos cukorkihozatalai az idő függvényében melléktermék dohány esetén (MD1-MD5 a 2. táblázatban látható mintaszámokra vonatkoznak)

A melléktermék dohányból származó mintáknál viszont a közepes enzimadagolású beállításoknál nyertük a legnagyobb fajlagos cukorkihozatali értékeket (22. ábra).



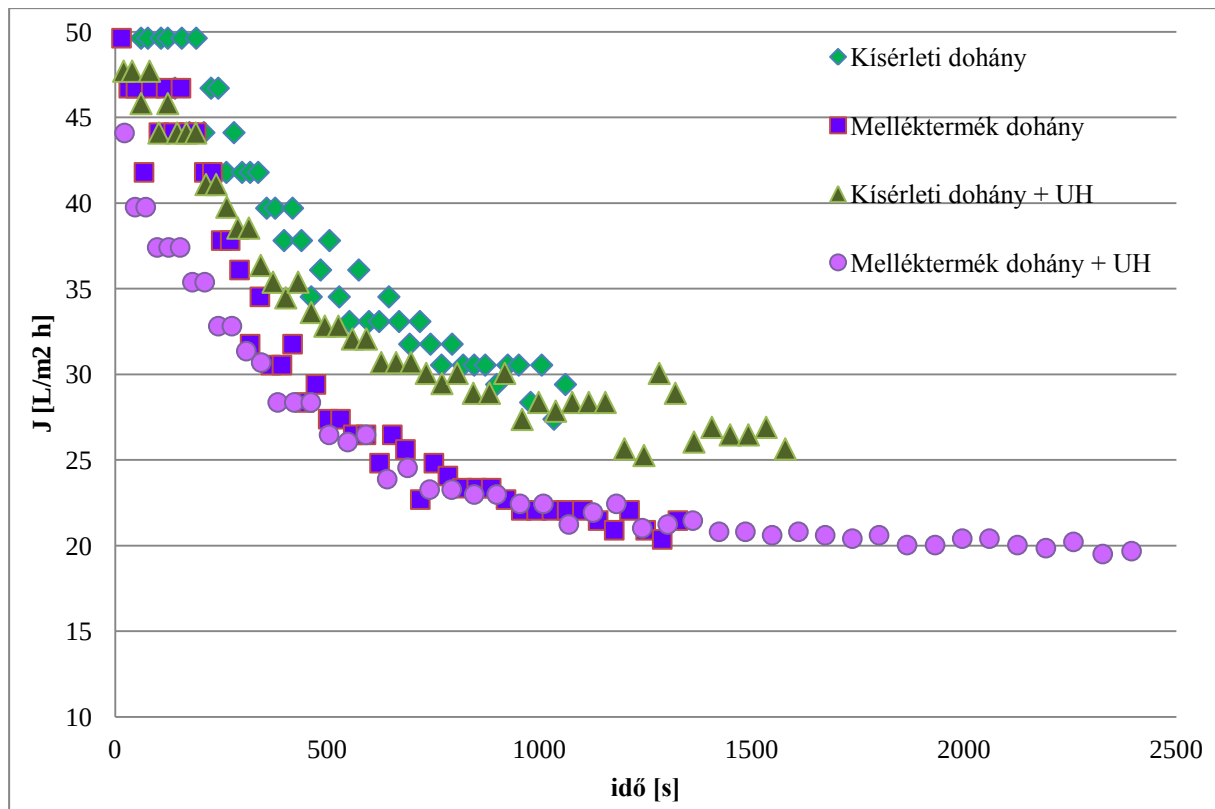
22. ábra: Xilanáz enzimmel végzett kísérletek cukorkihozatalai az idő függvényében melléktermék dohány esetén (MD1-MD5 a 2. táblázatban látható mintaszámokra vonatkoznak)

4.4. Enzimvisszanyerés és újrahasznosítás

4.4.1. Membránszűrés

A nagyobb léptékű kísérleteknél az alkalmazott enzimek mennyisége is egyre számottevőbbé válik, és az enzimek visszanyerése és visszaforgatásának lehetősége gazdaságilag kedvezőbbé teheti az eljárást. A lehetséges szeparációs eljárások a membránszűrési eljárások, ezek közül az ultraszűrés tűnik kézenfekvőnek, mert itt a membrán leválasztási értékének nagysága miatt, a cukor komponenseket átengedi és a fehérje frakciókat visszatartja.

A minták membránszűrése során a következő fluxus– idő diagramot kaptuk a [8] egyenlet segítségével.

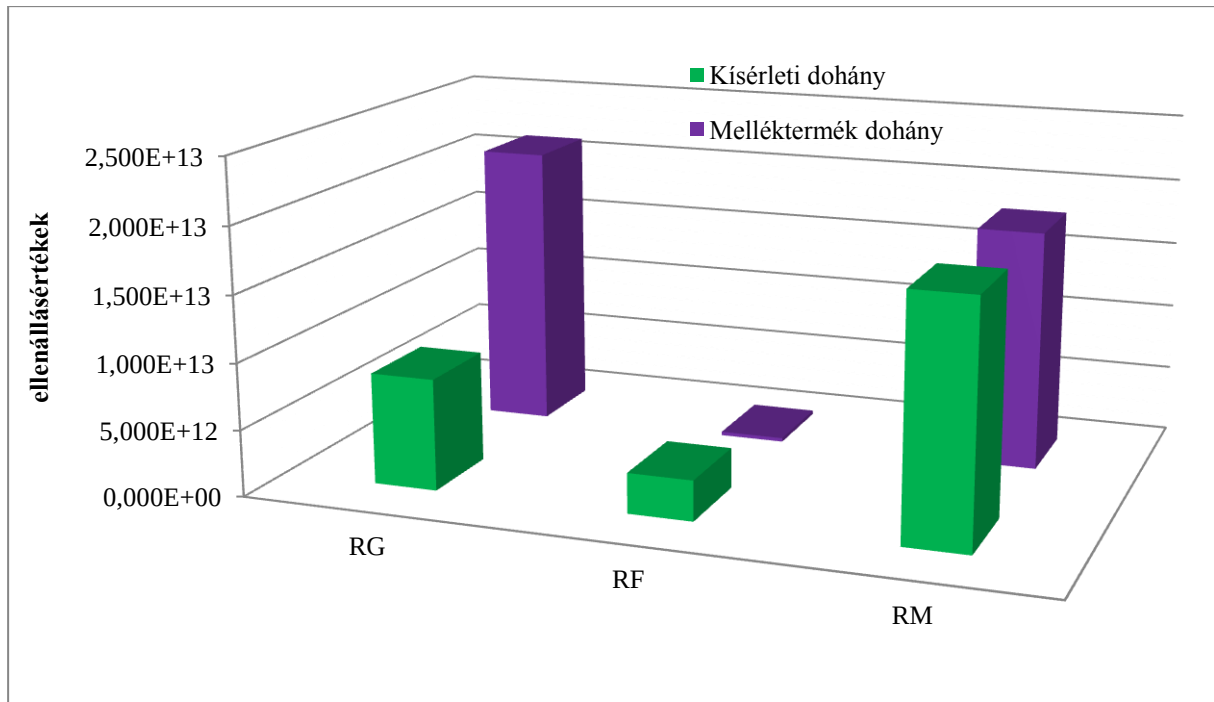


20. ábra: Fluxus értékek az idő függvényében a fermentlevek membránszűrése esetén ultrahang erőter alkalmazása nélkül és UH erőter alkalmazása mellett

Jól látható a 20. ábrán, hogy a szűrés kezdeti értékei azonosak voltak, de a kísérleti és melléktermék dohányból származó minták fluxus értékei jól elkülönülnek egymástól.

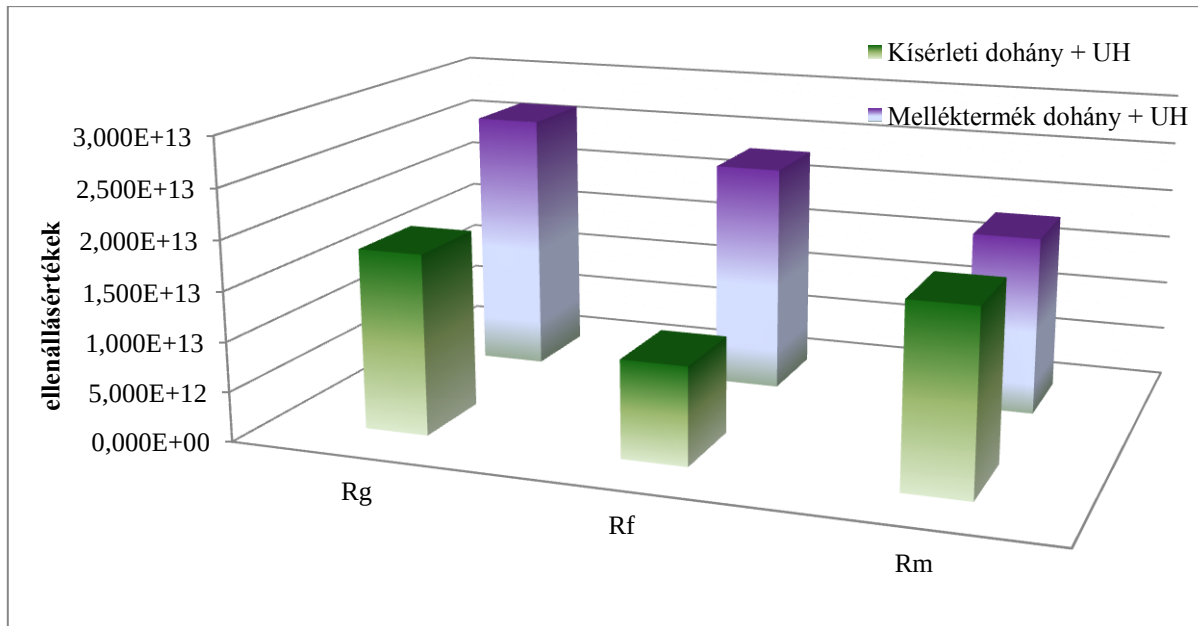
A viszonylag kis fluxus értékek növelésének reményében, különösen a gélréteg ellenállás csökkentése céljából, a szűrés betáplálási oldalán ultrahang-teret hoztunk létre, ám az eredmények nem tükrözték elvárásainkat. Az ultrahang erőterben végrehajtott membránszeparáció fluxus értékei nem mutattak nagyobb értékeket, mint az erőter nélküli kísérleteink adatai.

A további vizsgálatok érdekében kiszámoltuk az ellenállásokat, a [9] és [10] egyenletek segítségével, amelyeket a következő, 21-23. ábrán szemléltettünk.



21. ábra: Ellenállásértékek a fermentlevek membránszűrése során (Rg – gélréteg ellenállás, Rf – eltömődési ellenállás, Rm – membrán ellenállás)

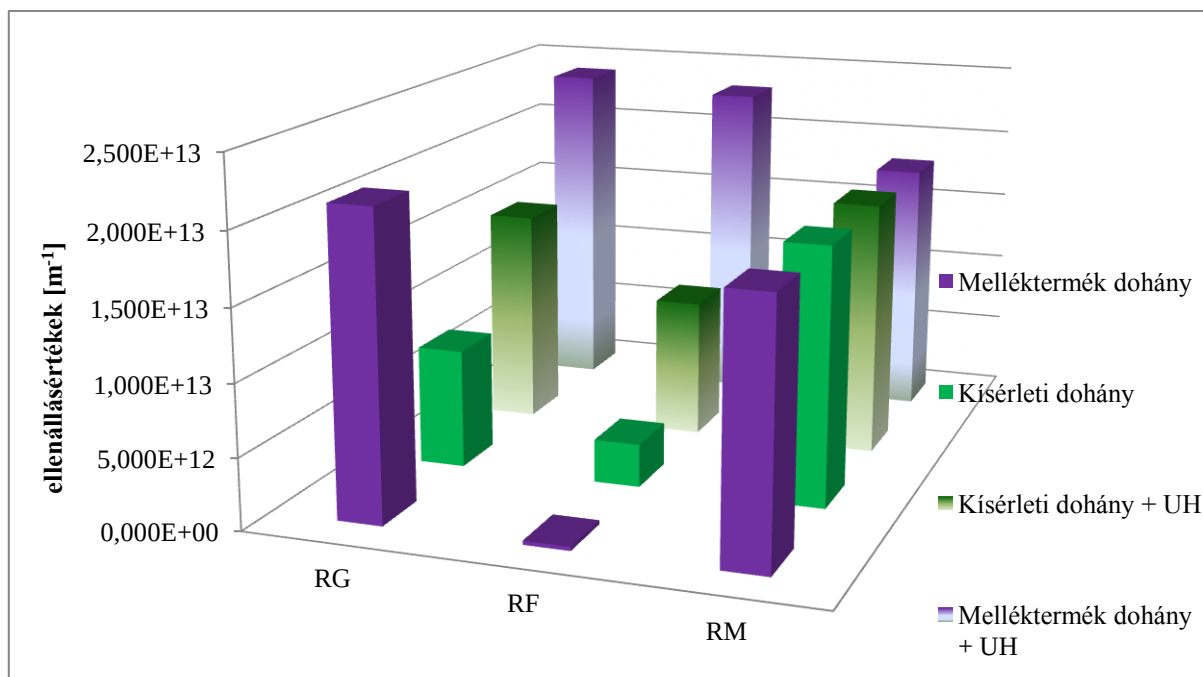
A fluxusértékek változásánál tapasztalt tendencia jól magyarázható a részellenállásokat bemutató ábrákon (21. - 22. ábra) is. A melléktermék dohány minták esetében megfigyelhető, hogy a gélréteg ellenállása kiemelkedően nagyobb, mint a kísérleti dohány esetében. Ebből arra következtethetünk, hogy a kísérleti dohány cellulóztartalmának enzimikus lebontása során több kisebb méretű fragmentum képződik, mint a melléktermék dohány minta esetében, és ezek a kisebb részecskék már a membrán pórusaiba is be tudnak hatolni, ami az eltömődési ellenállás megnövekedéséhez vezet. Ez is jól látható a 21. ábrán. Mindez a hatás pedig jól értelmezhető és magyarázható a két minta összetételének, eredetének ismeretében, vagyis a melléktermék dohány minták fajlagosan több cellulózt tartalmaznak, mint a kísérleti dohány minták.



22. ábra: Ellenállásértékek ultrahangos térben végzett fermentlé szűrésénél (Rg – gélréteg ellenállás, Rf – eltömődési ellenállás, Rm – membrán ellenállás)

Ahogy azt a 22. ábrából kikövetkeztethetjük, az ultrahang-erőtér alkalmazása mellett az ellenállás értékek kismértékben, de meghaladják az ultrahang nélküli mérések ellenállás értékeit. valamint ebben az esetben is a melléktermék dohány gélréteg ellenállása volt a nagyobb, ám az eltömődési ellenállás is ennél a mintánál bizonyult nagyobbak.

Az előző két ábra összevetését láthatjuk a 23. ábránkon, így szemléltetve az ultrahang szerepét a membránszűrés estében.

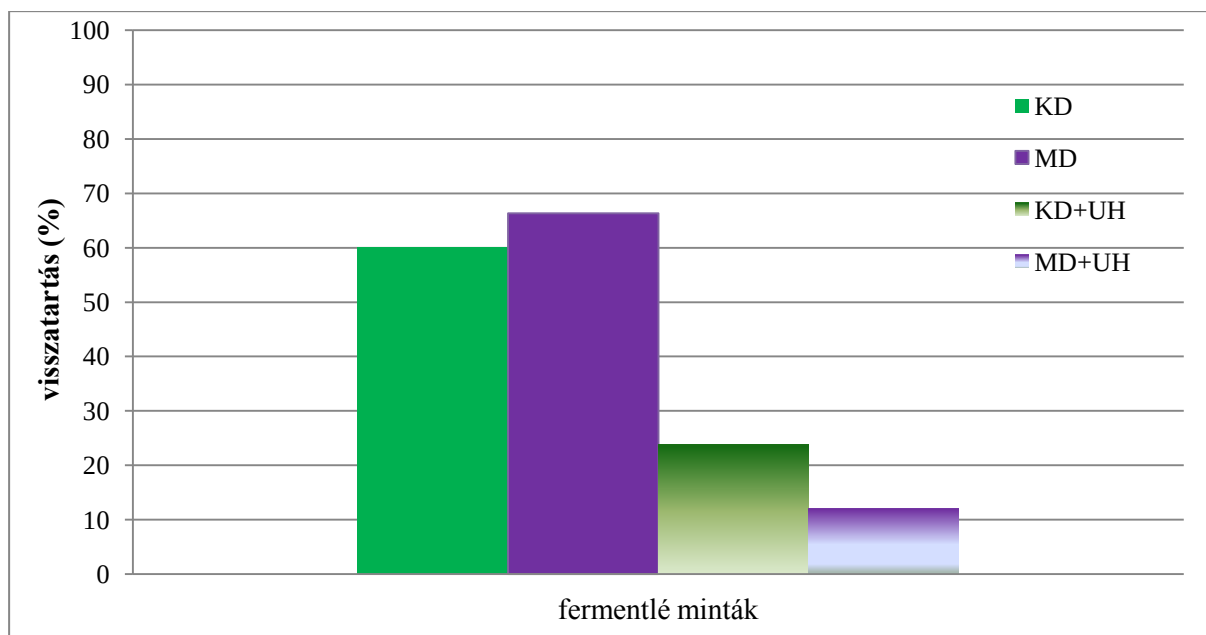


23. ábra: különböző minták szűrésének ellenállás értékei ultrahang erőter alkalmazásával és a nélkül.

A grafikonból jól látható, hogy az ultrahangos szűrések esetén sokkal nagyobb mértékű volt az ellenállás, mint anélkül, vagyis feltételezhetően az ultrahang keltette kavitáció tovább aprította a cellulóz szálakat, és az így keletkező fragmentumok jelentősen megnövelték mind a gélréteg, mind pedig az eltömődési ellenállás értékét.

A legkiemelkedőbb ellenállást a melléktermék dohány alapanyagú fermentlé ultrahangos szűrése produkálta. Ez esetben tapasztalhattunk szemcséket is a membrán felületén a fizikai tisztítás előtt, lehetséges, hogy ezek a szemcsék is befolyásolták a membrán áteresztőképességét, növelve az ellenállás mértékét. Észrevehető, hogy ultrahang használatával illetve ultrahang alkalmazása nélkül is a melléktermék dohány szűrése során mérhettünk magasabb ellenállás értékeket.

A 24. ábrán a membránszűrés eredményeként kapott visszatartás értékeket, amelyeket a [7] egyenlet segítségével állapítottunk meg, mutatjuk be mindkét dohányminta esetében ultrahang használatával és ultrahang használata nélkül.



24. ábra: A fehérje-visszatartási értékek összehasonlítása ultrahanggal kísért és a nélküli membránszeparációnál (KD = kísérleti dohány, MD = melléktermék dohány)

Ahogy azt láthatjuk, az ultrahangos szűrés esetén jelentősen kisebb volt a fehérje visszatartás, mint a nélkül, ezért valószínűsíthető, hogy több enzim jutott át a permeátumba. A minták fehérjetartalmának meghatározásához spektrofotometriás módszert alkalmaztunk 280 nm hullámhosszon, a [6] képlet segítségével kiszámolva a koncentrációkat, aminek az eredményeit a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat: Fehérjetartalom meghatározása

	fehérjekoncentráció (mol/dm ³)			fehérjekoncentráció (%)		
	koncentrátum	koncentrátum	koncentrátum	koncentrátum	feed	permeátum
Kísérleti dohány	1,83E-05	1,83E-05	1,83E-05	129%	100%	52%
Melléktermék dohány	1,54E-05	1,54E-05	1,54E-05	148%	100%	50%
Kísérleti dohány + UH	2,17E-05	2,17E-05	2,17E-05	111%	100%	84%
Melléktermék dohány + UH	1,95E-05	1,95E-05	1,95E-05	96%	100%	84%

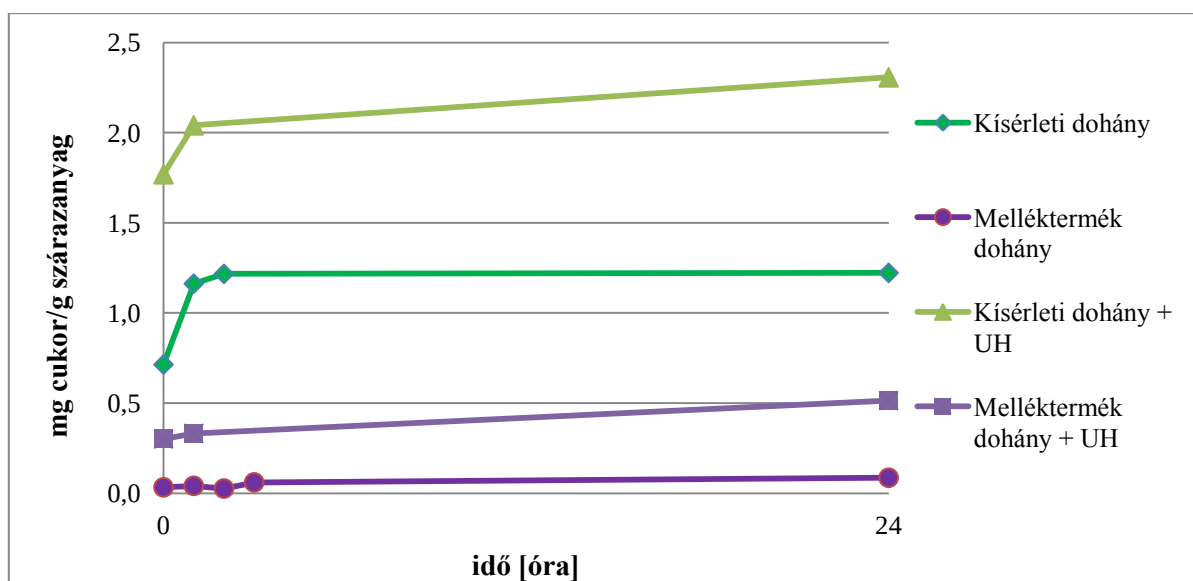
A mért értékek százalékban kifejezve könnyebben követhetővé teszik a folyamatot. A kiindulási (feed) oldatok fehérjetartalmát 100%-nak tekintve, azaz erre a kiindulási értékre vonatkoztatva, a permeátumok minden esetben kevesebb, a koncentrátumok minden esetben több fehérjemennyiséget mutatnak.

Az eltérő módon szűrt mintáknál az is egyértelműen látszik, hogy az ultrahang alkalmazása mellett jelentősen csökkent a koncentrátum kiindulási oldatra vonatkoztatott százalékban kifejezett fehérjetartalma, és ezzel párhuzamosan nőtt a permeátumok fehérje százaléka.

4.4.2 Enzim újrahasznosítás

A koncentrátumban visszamaradt enzimek aktivitásának vizsgálata céljából cellulóz alapanyagú szűrőpapírt alkalmaztunk szubsztrátként, hogy alapanyagot szolgáltatassunk az enzimek számára, amelyből cukor termelésére képesek. Folyamatosan mérve a cukorkoncentrációt, a [4] és [5] egyenlet segítségével számolva, a következő grafikont kaptuk eredményül (25. ábra). Az ábráról leolvasható, hogy valamennyi mintánk esetében, eltérő mértékben, de tapasztalható cukortartalom növekedés.

Végeztünk egy olyan kísérletet is természetesen, melyben a koncentrátumot desztillált vízzel helyettesítettük, de ebben az esetben nem tapasztaltunk cukorkoncentráció növekedést, ezért megalapozottnak tekinthető a feltételezésünk, miszerint a kísérletek során történő cukorkoncentráció növekedés a koncentrátumban maradt működőképes enzimek működésének köszönhető.



25. ábra: A visszanyert enzimekkel végzett cellulózbontás eredményei

4. táblázat: Az első órás cellulózbontás egyenes egyenletei

	Egyenes egyenlete
Kísérleti dohány	$y = 0,4485x + 0,7137$
Melléktermék dohány	$y = 0,0082x + 0,0328$
Kísérleti dohány + UH	$y = 0,2715x + 1,769$
Melléktermék dohány + UH	$y = 0,0311x + 0,301$

A 25. ábráról leolvasható, hogy a különböző koncentrátumok indulási cukorkoncentrációja eltérő volt. A diagramokra illesztett egyenesek meredekségét összevetve láthatjuk, hogy az ultrahangos szűréssel nyert enzimek kevésbé intenzíven bontják a cellulózt mint az ultrahang erőter kavitációs hatásait el nem szenvedett enzimek. Az a tény azonban, hogy a kísérleti dohány fermentlevéből visszanyert enzim mindkét esetben intenzívebb működést mutatott, egy más összefüggés/hatás jelenlétére is utal.

Mindenképpen alapvetően fontos az a tény, hogy az összes minta esetében tapasztalhattunk cukor koncentrációnövekedést, azaz az enzimek mindegyik esetben működőképesek maradtak, bár eltérő mértékben. A kiindulási cukorértékekből láthatjuk, hogy a szűrés során a cukor jelentős része átjutott a membránon, és a koncentrátumban csak igen kis mértékben jelent meg. Azt is megfigyelhetjük, hogy a jelentős cukortermelés az első órában jelentkezett, majd azután visszaesett a növekedés mértéke minden esetben.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink alapvető célja az volt, hogy megvizsgáljuk a dohánygyártásnál visszamaradó hulladékot/mellékterméket, ami elsősorban a növény szárát és levélnyelét tartalmazza (melléktermék dohány – MD) fel tudjuk-e használni alapanyagként a bioetanol gyártásához. Vizsgálódásunkat kiterjesztettük a biomasszaként termesztett dohánynövényből származó mintákra is (kísérleti dohány – KD), melyek a teljes növényt tartalmazzák, vagyis a leveleket is, nem csak a vastag cellulózrost kötegekből álló szárát és levélnyellet.

A bioetanol gyártás első lépése a cukrosítás, a fermentálható cukor képzése, szénhidrát bázisból. Ezt esetünkben enzimes lebontással végeztük két eltérő enzimesoportot, a celluláz-cellobiáz és a xilanáz enzimesoportot felhasználva.

Első lépésként enzimes hidrolízist végeztük celluláz és cellobiáz enzimek segítségével, illetve ezen enzimek működését is vizsgáltuk különböző pH tartományban. A xilanázos kísérleteink során az volt a fő kérdés, hogy képes-e ez az enzim a dohány minták cellulóz tartalmának bontására, illetve ha igen, milyen mennyiségben érdemes alkalmazni azt. Előkísérletet végeztünk az enzim optimum meghatározásához. A bontás során a keletkező cukor oldat koncentrációjának növekedését és a cukrosodás mértékét követtük nyomon, és a kétféle enzimhatás összevetése érdekében megvizsgáltuk a fajlagos, egy enzimegységre (Unit) jutó cukormennyiséget.

Kísérleteinkből egyértelműen látszik, hogy mindkét enzimes hidrolízis megfelelő a cellulóz bontására. A celluláz-cellobiáz enzimrendszer pH optimumát, a szakirodalomban fellelhetőekkel egyezően, nem tudtuk egyértelműen meghatározni, a 4,8 és az 5,0 pH közel egyforma eredményeket adott, nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni.

A két enzimféle összehasonlítása céljából elvégzett számításaink alapján látható, hogy fajlagosan megegyező enzimmennyiséggel a xilanáz enzim esetében lényegesen jelentősebb cukorkihozataalt tudunk elérni. A kétféle eredetű minta a melléktermék és a kísérleti dohányminták különbözősége is kimutatható az eredmények alapján. A celluláz-cellobiáz enzimrendszer alkalmazásánál a melléktermék dohány minták csak időben megkésve, a 72. órában tudták azt a hozamot mutatni, amit a kísérleti dohány minták már a 48. órában. A xilanáz enzimnél pedig a kísérleti dohány mintáknál a legkevesebb enzimmennyiség mutatta a maximális fajlagos kihozataalt, amíg a melléktermék dohány mintáknál a közepes mértékű enzimadagolással kaptuk a maximális értékeket.

A további kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a hidrolízist követően fermentléből leválasztott enzimeket lehet-e ismételtén felhasználni a cukrosításhoz, vagyis tudjuk-e ilyen módon gazdaságosabbá tenni a folyamatot.

Az enzimek szeparálását 5 kDa vágási értékű ultraszűrővel hajtottuk végre, így a fermentléből a keletkezett cukor a permeátumba jutott, míg az enzimek a koncentrátum oldalon maradtak. A folyamatot fehérjetartalom mérésével követtük nyomon.

A fluxus értékének növelése céljából ultrahang erőter kialakításával is végrehajtottuk a szeparációt, de sajnos nem értünk el nagyobb fluxus értékeket, vagyis nem lett gyorsabb a szeparáció, nem lett kisebb az eltömődés sem, sőt a visszatartási érték is csökkent, vagyis ultrahang erőter alkalmazásával több fehérje típusú vegyület jutott át a membránon.

A szeparációt követően visszanyert enzimek viszont megtartották aktivitásukat, vagyis ismét felhasználhatóak az enzimes lebontás esetében, akkor is, amikor a szeparációhoz ultrahang erőteret hoztunk létre. Ezt enzimaktivitás mérésével bizonyítottuk. Mérési eredményeink alapján azonban az is nyilvánvaló, hogy az ultrahangos erőterben leválasztott frakció enzimaktivitása lényegesen kisebb a normál szeparációból származó enzimek esetében mért értéknél.

Összességében tehát megállapíthatjuk tehát, hogy mind a melléktermék dohány, mind a kísérleti dohány cellulóz tartalma megfelelő körülmények között enzimes eljárással cukrosítható, az enzim pedig membrán szeparációval visszaforgatható, ezzel nagymértékben csökkenthető az eljárás költsége.

6. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetünket szeretnénk kifejezni konzulensünknek, Prof. Dr. Hodúr Cecília egyetemi tanárnak, valamint Ábel Marietta PhD hallgatónak, hogy a munkánk során szakmai útmutatást adtak, továbbá a kísérletek tervezésében, kivitelezésében és értékelésében a segítségünkre voltak.

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

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Szedlák I. (2011): Dohány eredetű nyersanyagok minőségének és felhasználhatóságának biokémiai és mikrobiológiai jellemzése, Doktori értekezés
- Fenntartható mezőgazdasági rendszerek és környezettechnológia, Szaktudás Kiadó Ház Zrt. (2008):
- Buday-Sántha Attila (2009): Környezetgazdálkodás, Nordex Kft. Dialog Campus Kiadó 159-160 o.
- Bai A., Lakner Z. (2002): A biomassza felhasználása, Szaktudás Kiadó Ház
- Gyulai I. (2006): A biomassza-dilemma, Magyar Természetvédők Szövetsége, Budapest
- Usta, N. (2005): Use of tobacco seed oil methyl ester in a turbocharged indirect injection diesel engine. *Biomass Bioenergy*, 28, 77–86.
- Koiwai, A., Suzuki, F., Matsuzaki, T. and Kawashima, N. (1983): The fatty acid composition of seeds and leaves of *Nicotiana* species. *Phytochemistry*, 22, 1409–1412.
- Vicente, G., Martínez, M. and Aracil, J. (2007): Optimization of integrated biodiesel production. Part I. A study of the biodiesel purity and yield. *Bioresour. Technol.* 98, 1724–1733.
- Ivan A. Ross (2005): *Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses*, Volume 3. Humana Press (2005), ISBN 978-1-59259-887-8.
- Svein J. Horn, Gustav Vaaje-Kolstad, Bjørge Westereng, Vincent GH Eijsink: Novel enzymes for degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels* (2012) 5:45
- Q. Gan, S. J. Allen, G. Taylor: Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal* 12 (2002) 223-229
- Dienes D. (2006): Celluláz enzimek hatása a szekunder rostok tulajdonságaira
- M.G. Tabka, I. Herpoël-Gimbert, F. Monod, M. Asther, J.C. Sigoillot: Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial technology* 39 (2006) 897-902
- Jinguan Hu, Valdeir Arantes, Jack N. Saddler: The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnology for Biofuels* (2011) 4:36
- Robert van Reis, Andrew Zydney: Membrane separations in biotechnology. *Current opinion in Biotechnology* (2001) 12:208-211
- Yi He, David M. Bagley, Kam Tin Leung, Steven N. Liss, Bao-Qiang Liao: Recent advances in membrane technologies for biorefining and biotechnology production. *Biotechnology Advances* 30 (2012) 817-858
- Bálfalvi dr. Bakó Katalin: *Membrános műveletek* (Veszprémi egyetemi kiadó)
- Benkun Qi, Jianquan Luo, Guoqiang Chen, Xiangrong Chen, Yinhua Wan: Application of ultrafiltration and nanofiltration for recycling cellulase and concentrating glucose from enzymatic hydrolyzate of steam exploded wheat straw. *Biosecure technology* 104 (2012) 466-472.

Svein J. Horn, Maria M. Estevez, Henrik K. Nielsen, Roar Linjordet, Vincent G.H. Eijsink:
Biogas production and saccharification of Salix pretreated at different steam explosion
conditions. Biosecure technology 102 (2011) 7932-7936

8. KÉPJEGYZÉK:

[1] <http://biokoho.hu/wp-content/uploads/2012/02/12.k%C3%A9pdoh%C3%A1nyn%C3%B6v%C3%A9ny.jpg>

[2] http://p2.vatera.hu/photos/db/0d/8fb6_2_big.jpg

[3]

[4] http://en.academic.ru/pictures/enwiki/84/Trichoderma_harzianum.jpg

[5] <http://www.fungalcell.org/fungalcell/sites/sbsweb2.bio.ed.ac.uk/fungalcell/files/images/gallery/Asexual%20structures%20of%20Aspergillus%20niger.jpg>

[6] http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/biochemicals/migrationbiochemicals1/hemicellulase_xylanase.gif