

MEZŐGAZDASÁGI HULLADÉKOK HASZNOSÍTÁSÁNAK ÉS AZ ALKALMAZOTT ENZIM VISSZANYERÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI

PhD értekezés

ÁBEL MARIETTA

Témavezető:

Prof. Dr. Hodúr Cecilia

egyetemi tanár, az MTA doktora



Környezettudományi Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Szeged

2016

Tartalomjegyzék

JELMAGYARÁZAT	4
BEVEZETÉS	5
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
1.1. Mezőgazdasági termelésből származó hulladékok	11
1.2. Élelmiszeripari technológiából származó hulladékok.....	13
1.3. A lignocellulóz	14
Cellulóz	14
Hemicellulóz.....	15
Lignin.....	16
1.4. Cellulóbontásra alkalmazható enzimek.....	16
Cellobiáz	17
Celluláz	17
Xilanáz.....	18
1.5. Fermentációs eljárások	18
1.5.1. Szimultán cukrosítás és fermentáció	20
1.5.2. Elkülönített hidrolízis és fermentáció.....	21
1.6. Membránszűrési műveletek.....	21
1.6.1. Mikroszűrés	24
1.6.2. Ultraszűrés.....	24
1.6.3. Nanoszűrés	29
1.6.4. Fordított ozmózis.....	29
1.7. Enzimvisszanyerési technológiák	30
1.8. Hatékonyság növelő módszerek	31
1.8.1. Mikrohullámú energiaközlés	31
1.8.2. Ultrahang erőter.....	32
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	34
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	36
3.1. Vizsgálati alapanyagok.....	36
3.2. Vizsgálati módszerek.....	37
3.2.1. Előkezelések.....	37
3.2.2. Szárazanyag tartalom meghatározása	39
3.2.3. Cukormeghatározási módszerek.....	39

3.2.4. Biodegradációs módszerek	41
3.2.5. Alkohol tartalom meghatározása desztillációval	43
3.2.6. Gázkromatográfiával történő etanol meghatározás	44
3.2.7. Membránszeparációs eljárások.....	45
3.2.8. Fehérjetartalom meghatározása	48
3.2.9. Enzim aktivitás mérése.....	48
3.2.10. Kísérlettervezés	49
4. EREDMÉNYEK és ÉRTÉKELEŚÜK.....	51
4.1. Cukorrépaszelet	51
4.1.1. Cukrosítási eljárás	51
4.1.2. Szimultán cukrosítás és fermentációs kísérletek	53
4.1.3. Membránszűrés alkalmazása az enzimvisszanyerés céljából	54
4.2. Cukorrépa pellet	57
4.2.1. Pellet méret, enzim arány meghatározása cukrosításnál.....	57
4.2.2. Enzimek membránszeparációja	60
4.2.3. Enzimhasznosíthatóság.....	62
4.3. Dohány növény.....	63
4.3.1. Kísérleti- és melléktermék dohány enzimes lebontása	63
4.3.2. Optimalizált enzimes lebontás.....	66
4.3.3. Szimultán cukrosítás és fermentáció	68
4.3.4. Mikrohullámú előkezelésének hatása a cukorkihozatalra	71
4.3.5. Enzimvisszanyerés lehetősége dohány mintáknál	76
4.3.6. Xilanáz enzim hatásának vizsgálata dohány mintáknál	79
4.3.7. Szimultán Cukrosítás és Fermentáció vizsgálata xilanáz enzimmel	82
4.3.8. Dohány növény esetében alkalmazott enzimek hatásának összevetése.....	85
4.3.9. Xilanázos fermentlé membránszeparációs vizsgálata	87
4.4. Nyírfakéreg apríték	90
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	94
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	98
7. SUMMARY	100
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	104
9. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPZŐ KÖZLEMÉNYEK	116
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	119

JELMAGYARÁZAT

Δp	transzmembrán nyomáskülönbség	[Pa]
$\Delta \pi$	ozmotikus nyomáskülönbség	[Pa]
Δc_s	sűrítmény koncentráció különbsége	
c	koncentráció	[mol/dm ³]
c_b	főtömeg koncentrációja	[kmol/m ³]
c_{cukor}	cukorkoncentráció	[cm ³]
c_g	gélréteg koncentrciója	[kmol/m ³]
CLA	celluláz enzim	
CLB	cellobiáz enzim	
c_m	membránfelületén kialakult réteg koncentrációja	[kmol/m ³]
c_p	permeátum koncentrációja	[kmol/m ³]
GC	gázkromatográfia	
J	permeátum fluxusa	[Lm ⁻² h ⁻¹]
K	víz permeabilitási együtthatója	[m/s]
KD	kísérleti dohány	
K_s	oldott anyag permeabilitási együtthatója	[m/s]
MD	melléktermék dohány	
MF	mikroszűrés (Microfiltration)	
$m_{sz.a.}$	bemért szárazanyag tömege	[g]
MW	mikrohullámú energiaközlés	
NF	nanoszűrés (Nanofiltration)	
PES	poliétterszulfon membrán	
R_F	eltömődési ellenállás	[m ⁻¹]
R_M	membrán ellenállása	[m ⁻¹]
RO	fordított ozmózis (Reverse Osmosis)	
R_P	koncentráció polarizáció okozta ellenállás	[m ⁻¹]
R_T	összes ellenállás	[m ⁻¹]
SHF	szeparált hidrolízis és fermentáció (Separate Hydrolysis and Fermentation)	
SSF	szimultán cukrosítás és fermentáció (Simultaneous Saccharification and Fermentation)	
T	hőmérséklet	[K]
t	idő	[s]
TF	thin film, vékonyréteg membrán	
UF	ultraszűrés (Ultrafiltration)	
UH	ultrahag erőter	
$V_{Betáp}$	betáplált oldal térfogata	[m ³]
V_{Konc}	koncentrátum térfogata	[m ³]
VRR	sűrítési arány (Volume Reduction Ratio)	[-]
XIL	xilanáz enzim	
η	dinamikai viszkozitás	[Pas]
π	ozmózis nyomás	[Pa]
δ	hidrodinamikai határréteg vastagság	[m]

BEVEZETÉS

A növekvő energia felhasználás, valamint a gazdaságosan kitermelhető, illetve felhasználható fosszilis tüzelőanyag tartalékok mennyiségének folyamatos csökkenése miatt kiemelt fontosságú az új, és még kiaknázatlan nyersanyagbázisok, illetve, a megújuló energiaforrások hasznosítási eljárásainak fejlesztése. Ebből a megfontolásból kiindulva, nagy biomassa tömeget produkáló növényi alapanyagok termesztését végzik azért, hogy nyersanyagforrásként szolgálhassanak a mikrobiális fermentációkhoz, az alapanyag-előkezelését és feldolgozását követően.

A Földön lévő növényi biomassa több mint 60%-a lignocellulóz alapú. Az újrahasznosítható lignocellulóz alapanyagú biomasszából történő etanol gyártás fontosságát széles körben tanulmányozzák az elmúlt évtizedek óta. Az ilyen lignocellulóz alapú nyersanyagforrások közé tartoznak a fák és hulladékaik, egynyári növények, mezőgazdasági maradékok, valamint a papírhulladékok (Leif et al., 2016, Mohamed et al., 2016). Kutatómunkám során a cukorrépaszeletet, cukorrépa pelletet, dohány növényt, valamint a nyírfa aprítékot vizsgáltam, mint biomassa forrást, potenciális alapanyagként, bioetanol előállítás céljából.

A cellulózból történő etanol előállítás folyamata négy fő lépésből áll: előkezelés, enzimes hidrolízis, mikrobiális fermentáció és termék szétválasztás. Az előkezelésnek fontos szerepe lehet a hidrolízis hatékonyságának növelése szempontjából, ugyanis a cellulóz tartalmú alapanyag szerkezete megváltozik az előkezelés hatására, a poliszacharid sejtfalban részleges lebomlás indul meg, ezáltal a biomassa hozzáférhetőbbé válik az enzimek számára. Dolgozatomban többféle biomassa előkezelési lehetőségeket mutatok be (fizikai, kémiai, fizikai-kémiai), amelyekkel vizsgáltam, hogy milyen hatással van az előkezelés a későbbiekben fermentálható cukrok kinyerési mutatóira.

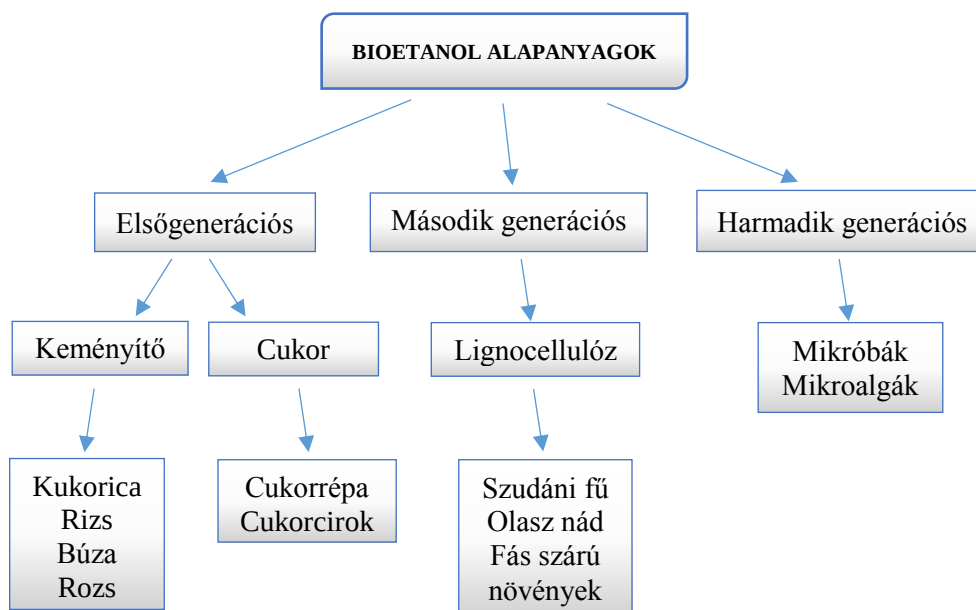
Membrános műveletek alkalmazása különböző iparágaknál egyre szélesebb körben elterjedt módszer, többek között a bioetanol gyártás során is, amikor az etanol és a víz szétválasztása történik. A szakirodalomban, illetve manapság már az ipari gyakorlatban is egyre több membrános eljárást találhatunk, melyekben pl. a sejtes elemeket, illetve a folyamatban keletkező termékeket membránokkal szeparálják. Ezért a kutatómunkám során célom volt a hidrolízis során alkalmazott enzimek visszanyerése.

Gazdasági szempontokat figyelembe véve terjedt ki kutatásom az enzimek újrahasznosításának irányába, ugyanis magas árak miatt jelentősen megdrágítják a technológia folyamatát. Az enzimek technológiai fenntartásának egyik lehetősége a rögzített enzimek alkalmazása, a másik lehetőség pedig a szeparációs eljárásokkal történő szétválasztást követő reciklálásuk. Céлом az volt, hogy egy olyan kíméletes technológiát válasszak az enzimek visszanyeréséhez, hogy azok aktivitásukat megőrizzék és a lebontási folyamatban újra használhatóak lehessenek.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Mivel a Földünkön lévő, gazdaságosan kitermelhető és feldolgozható fosszilis energiahordozók mennyisége vészesen fogyóban van, így egyre nagyobb figyelmet kap a megújuló energiaforrások megismerése és gazdaságos kiaknázása, amely napjaink egyik legjobban kutatott területévé vált (Dincer et al., 2014). Energianövényeket, illetve különböző iparágak hulladékait régóta hasznosítják erre a célra. A fosszilis energiahordozók kimerülése okán egyre nagyobb szerepet kap a megújuló energiaforrások felhasználásának kérdésköre (Speirs et al., 2015). A bioetanol is egy ilyen megújuló energiaforrás, amely felhasználásával a globális szén-dioxid mérleg javulásával jelentősen csökkenthetővé válna a környezetszennyezés (Dincer et al., 2014).

A biológiai eredetű energiaforrások közül megkülönböztetünk elsődleges és másodlagos biológiai eredetű energiaforrásokat. Az elsődleges energiaforrásokat leginkább fűtésre, illetve elektromos áram előállítására használják fel, amit fa-apríték vagy pellet elégetésével nyernek. A másodlagos eredetű energiaforrások a bio-üzemanyagok, amelyekben belül további három csoportot különböztetünk meg, az első, második és harmadik generációs bio-üzemanyagokat (1. ábra). Az elsőgenerációs bio-üzemanyagokat különböző keményítő, illetve cellulóz tartalmú növényekből állítják elő (pl.: kukorica, búza, rozs, cukorrépa, cukorcirok) (Lindorfer et al., 2014). Ide tartozik a bioetanol és a biodízel is. Utóbbit közvetlenül növényi olajból átészterezéssel állítják elő (Cardona et al., 2010). Mivel ezen első generációs bio-üzemanyagok nyersanyagainak termeléséhez egyre nagyobb földterületet kell elvonni az élelmezésre szánt növények elől, ezért egyre több ország teszi előtérbe a nem élelmezésre szánt biomasszából történő bio-üzemanyag előállítását (Daylan et al., 2016). Azokat a bio-üzemanyagokat tehát, amelyek élelmiszeripari, vagy takarmányozási célra nem hasznosítható biomasszából, illetve a mezőgazdasági tevékenység során keletkezett lignocellulóz tartalmú hulladékokból állnak, másodgenerációs bioüzemanyagoknak nevezzük (Gonzalez-García et al., 2009, Kádár et al., 2004). A másodgenerációs bioüzemanyagok esetében viszont fontos szerepe van az előkezelésnek, mivel a glükóz molekulák felszabadítása hatékonyabb technológiai folyamatot igényel (Stevens et al., 2004). Az első és a második generációs bioüzemanyagok előállítása közötti különbség a lignocellulóz biomassza hidrolízisében van. A harmadik generációs bio-üzemanyagok előállításához pedig különböző mikrobákat és mikroalgákat használnak fel.



1. ábra: Biológiai eredetű energiaforrások (saját ábra)

A nem élelmiszer alapanyagokból gyártott bioetanol alkalmazása a közlekedésben azt jelentheti, hogy akár 45-65%-al kevesebb üvegházhatású gáz kerül a légkörbe (Chovau et al., 2013). Európában és Magyarországon is belső égésű motoroknál szabványos üzemanyag az E85, amely 85% bioetanol és 15% benzin keverékéből áll (Morales et al., 2015). Magyarországon 2007 óta minden régióban vásárolható bioetanol. Az etanol (C_2H_5OH) színtelen, jellegzetes szagú, éghető folyadék, kémiai tulajdonságát tekintve az alkoholok közé tartozik. Magyarországon bioetanol gyártás Győr és Szabadegyháza után Dunaföldváron történik, ahol is 2012 tavaszán kezdte meg működését a Pannonia Ethanol üzem. Magyarország a mezőgazdasági szempontokat tekintve kedvező fekvésű, jó termőtalaj minőséggel és elegendő napsütéses órák számával jellemezhető terület, ahol a cukortartalmú, illetve a lignocellulóz tartalmú biomassza növények termesztése (búza, kukorica, cukorrépa) esetében jó termésátlagok érhetőek el. A bioetanol előállítás ipari körülmények között Európában főleg cukorrépából, kukoricából vagy búzából, míg Észak-Amerikában búzából és kukoricából, Dél-Amerikában pedig cukornádból történik. A bioetanol előállításánál a biomassza savas vagy enzimes hidrolízisével keletkező fermentálható cukrot alakítjuk át mikrobiális katalizátor segítségével etanollá (Thangavelu et al., 2016, Sarkar et al., 2012).

Az elsőgenerációs bioetanol előállítása lignocellulóz alapú biomasszából különböző technológiákkal történhet, de mindegyik technológiánál az első fontos lépés az alapanyag előkezelése, ugyanis ezzel növelhető a glükán és xilán hozzáférhetősége a hidrolízis folyamatánál (Mood et al., 2013, Zeeman et al., 2009). Különböző előkezelési technikák léteznek, amely eljárásokat az elmúlt évtizedben tovább fejlesztettek (Alvira et al., 2010, Balat et al., 2008, Carolina et al., 2012):

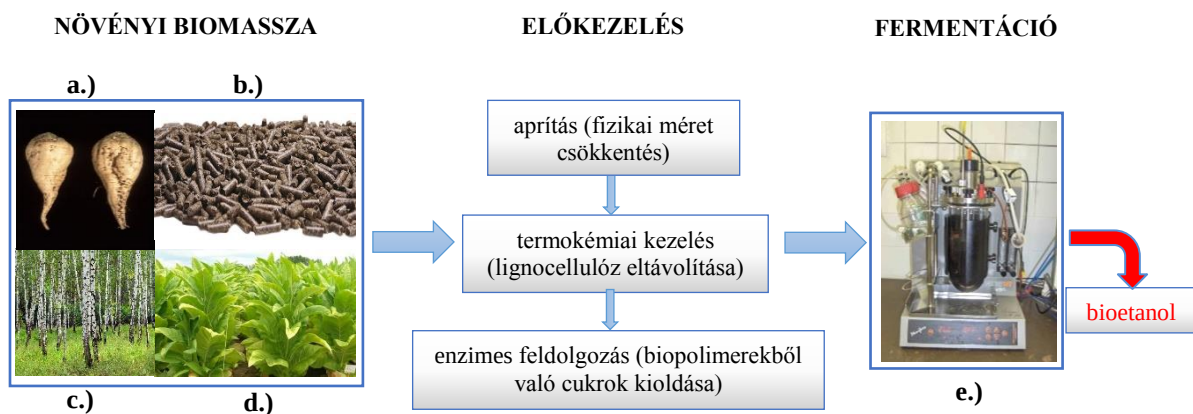
- *mechanikai*: A legtöbb lignocellulóz tartalmú biomasszában fontos a mechanikai előkezelés, a méretcsökkentés, illetve a hatékonyabb anyagátadás szempontjából. A mechanikai előkezeléseknél a hulladék kémiai, molekuláris szerkezete nem változik, csupán alakja és tömege módosul. Ilyen eljárások lehetnek például, az aprítás, őrlés, termikus módszerek, amelyek segítségével fokozható a lignocellulóz tartalmú nyersanyagok enzimikus hidrolízise, illetve a biológiai lebonthatóság hatékonysága (Menon et al., 2012). A fizikai előkezelést követően (aprítás) további feladat, cél, hogy a lignocellulóz alapanyagból eltávolítsuk a lignint és a hemicellulózt, annak érdekében, hogy a továbbiakban a maradék cellulózból majd az enzimátikus kezelést követően további glükóz egységek szabadulhassanak fel. Az egyik legelterjedtebb előkezelési módszer ennél az eljárásnál a gőzrobbantás (McMillan, 1994, Balat, 2010). Ennél a módszernél 170–260°C-os telített gőzzel 5–15 percig kezeljük a lignocellulóz biomasszát még mielőtt a nyersanyagot atmoszférikus nyomásnak tesszük ki, majd a gőzt egy szűk szelepen keresztül rövid idő alatt expandáljuk (Horn et al., 2011). A gőz először bediffundál a lignocellulóz biomasszába, majd onnan a hirtelen nyomáscsökkentés hatására robbanásszerűen eltávozik, ezzel a lignocellulóz szerkezete szétesik és hozzáférhetőbbé válik a fajlagos felület, valamint ezáltal a cellulóz hidrolízis lehetősége növelhető (Ben-Ghedalia et al., 1981). Az eljárás képes a teljes cukor kihozatal fokozására, illetve kicsi a környezetkárosító hatása (Focher et al., 1991).
- *kémiai*: Kémiai előkezeléseket széles körben alkalmaznak például a papírgyártás során, amikor is a különböző cellulóztartalmú nyersanyagokat lignin mentesítik a kiváló minőségű papír előállítása érdekében (Menon et al., 2012). Az előkezelési kategóriák közül a kémiai előkezelési technikák a legszélesebb körben tanulmányozott eljárások. A leggyakrabban alkalmazott kémiai előkezelések a savas, lúgos, forró vizes kezelések (Menon et al., 2012).

A savas vagy lúgos előkezelés hatására felbomlanak a molekulák közötti észter kötések, majd így hemicellulóz és xilán komponensek szabadulhatnak fel (Tarkow et al., 1969, Prasad et al., 2007).

- *fizikai-kémiai*: Ennél az előkezelésnél a fizikai és a kémia eljárások vannak kombinálva egymással. A fizikai – kémiai előkezelések közé tartoznak az ammónia-robbantásos, a folyékony forró vizes, illetve a mikrohullámú – kémiai eljárások is (Mosier et al., 2005, Brodeur et al., 2011). A gőzrobbantásos, a kémiai és a mechanikai előkezelési eljárások mellett munkám során mikrohullámú – kémiai előkezeléseket is alkalmaztam. Az eddigi tapasztalatok alapján mikrohullámú előkezelés a kémiai előkezeléssel kombinálva sokkal hatékonyabb eljárásnak bizonyult, mint a hagyományos fűtés kombinációja kémiai eljárással, ugyanis a mikrohullámú – kémiai kezelésnél az előkezelési eljárás reakció ideje jelentősen lecsökken (Zhu et al., 2005). Zhu és mtsi (2006) három féle mikrohullámú-kémiai előkezelést vizsgáltak: a mikrohullám/lúgos, mikrohullám/savas/lúgos és a mikrohullám/savas/lúgos/H₂O₂ rizs szalma biomassza előkezeléséhez, az enzimes hidrolízis fokozása, illetve a xilóz kinyerése céljából. A mikrohullám/lúgos előkezelési eljárás hatására nem tapasztaltak kinyerhető xilózt, viszont a mikrohullám/savas/lúgos/ és a mikrohullám/lúgos/H₂O₂ eljárásnál találtak visszanyerhető kristályos xilózt. Az előkezelt rizs szalma enzimes hidrolízisének tehát, a mikrohullám/savas/lúgos/H₂O₂ előkezelés hatásával érték le a legnagyobb hidrolízis értéket, illetve glükóz tartalmat (Zhu et al., 2006).
- *biológiai*: Biológiai előkezeléseket alkalmaznak pl. különböző faanyagok lebontásához. Különböző mikroorganizmusokat, fehér-, barna-, illetve lágy rothadást okozó gombákat és baktériumokat használnak fel, annak érdekében, hogy módosítsák a lignocellulóz kémiai összetételét és/vagy szerkezetét, mert az így kezelt biomassza már sokkal kevésbé áll ellen az enzimes lebontásnak. Főképp a barna- és a lágy rothadást okozó gombák támadják meg a lignocellulózt, ezzel módosul a lignin szerkezete is, majd a fehér rothadást okozó gombák a továbbiakban már sokkal aktívabban tudják lebontani a lignint (Sun et al., 2002, Blanchette, 1991). A biológiai előkezelések ígéretes technológiának tűnnek, előnyei közé tartozik például, hogy nem tartalmaznak kémiai kezeléseket, kicsi az energia igényük, enyhe környezeti feltételek szükségesek vagyis környezetbarát technológiát jelentenek (Kruakake et al., 2007, Salvachúa et al., 2011).

Hátrányai közé sorolhatóak, hogy a biológiai előkezelés lassú folyamat, a növekedési fázisnál nagyon óvatos és körültekintő figyelmet igényel, valamint a végrehajtásához nagy hely szükséges (Eggeman et al., 2005).

A bioetanol gyártás következő lépése az előkezelést követően a cukrosítás (szacharifikáció), ahol enzimek (celluláz, cellobiáz, xilanáz) hozzáadásával folytatódik tovább a lebontás monoszacharidokig. Cukrosítás után a fermentáció következik, ahol mikroorganizmusok hozzáadásával a glükóz átalakul etanollá, majd az utolsó lépés a desztilláció, illetve a dehidratáció. A gyártás során (2. ábra) keletkező melléktermék állattakarmányként hasznosítható (Michelle, 2007).



2. ábra: Növényi biomasszából történő bioetanol előállítás (Michelle, 2007)

(Képek forrásai:

- a) cukorrépa: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/396px-SugarBeet.jpg>
- b) cukorrépa pellet: <https://www.crystalsugar.com/sugar-agri-products/agri-products/>
- c) nyírfák: http://www.123rf.com/photo_21818101_white-birch-trees-in-the-forest-in-summer.html
- d) dohány: <http://www.imperialtobaccoscience.com/index.asp?pageid=15>
- e) Laboratóriumi fermentor (Labfors Minifors, Belgium) (saját kép))

1.1. Mezőgazdasági termelésből származó hulladékok

Köztudott, hogy a mezőgazdasági termelés során jelentős mennyiségű hulladék keletkezik, melynek ésszerű, gazdaságos hasznosítása a mezőgazdaságnak és a környezetvédelemnek egyaránt fontos feladatot jelent. A 2012. évi CLXXXV. törvény a hulladékról kimondja, hogy hulladék bármely tárgy vagy anyag, amelyről birtokosa megválnak, megválni szándékozik, vagy megválni köteles.

Hulladékok lehetnek, pl. termelési, szolgáltatási vagy fogyasztási maradékok, ipari folyamatok maradék anyagai, előírásoknak meg nem felelő, selejt termékek, lejárt szavatosságú termékek, további használatra alkalmatlanná vált anyagok és alkatrészek, csomagolóeszközök. Ugyanezen törvény alapján hulladékhasznosításról akkor beszélünk, ha a kezelés eredményeként a hulladék valamilyen más anyag helyettesítésére, vagy az adott üzemben illetve a gazdaság más szereplőinél valamilyen hasznos cél betöltésére válik alkalmassá.

Általában hasznosításnak minősül az elsődlegesen energiahordozóként való felhasználás, a regenerálás, bizonyos összetevők (fémek, oldószerek) visszanyerése és újrafeldolgozása (Fodor, 2015). Magyarország a mezőgazdasági szempontokat tekintve jó elhelyezkedésű ország, területén a biomassza felhasználásához jó termésátlaggal termesztethetőek különböző termények. A mezőgazdasági hulladék mennyisége függ a hazai mezőgazdasági területek méretétől, valamint az élelmiszeripari feldolgozó kapacitások nagyságától. A mezőgazdaságban termelt hulladékokat elsősorban takarmányozásra, trágyázásra, ill. talajjavításra hasznosítják. Mivel ezek szerves anyagok, így energetikai célokat is szolgálhatnak. A mezőgazdasági növényi hulladékok, amelyek többsége a szántókon marad, tüzelésre is alkalmasak, mint például a fanyesedék, levelek, szalma, nád, napraforgó és akár a rizs vagy a kukorica szára is. A nagy cellulóztartalmú növényi részeket pedig gyakran zárt térben magas hőfokon gázosítják. A mezőgazdaságban képződő biomasszájának (megújuló energiaforrásnak) egyre jelentősebb szerepe van a fenntartható energiagazdálkodásban. Biomassza alatt, szűkebb értelemben, minden olyan biológiailag lebomló szerves anyagot értünk, amely mezőgazdasági tevékenységből, feldolgozásból, élelmiszeripari termelésből, energetikai célú ültetvényekből, erdőgazdálkodásból, vagy ezek termékeinek, melléktermékeinek illetve hulladékainak feldolgozásából, gyűjtéséből származik (Berghold et al., 2007). Mivel a mezőgazdasági hulladékok biomassza kategóriákat is jelentenek, így azokat a biomassza jellege szerint elsődleges, másodlagos és harmadlagos biomassza csoportokba sorolhatjuk (Czupy et al., 2011):

- Elsődleges biomassza: természetes vegetáció, a mezőgazdasági melléktermékek, növényi hulladékok, burgonyahéj, kerti - közterületi - konyhai zöldhulladékok.
- Másodlagos biomassza: állattenyésztés melléktermékei, állati eredetű hulladékok, trágya, hígtrágya.
- Harmadlagos biomassza: papír hulladékok, szilárd szerves hulladékok, feldolgozó iparok gyártási mellékterméke, élelmiszeripari melléktermékek.

1.2. Élelmiszeripari technológiából származó hulladékok

Az élelmiszeripar területén keletkező hulladékok nagy mennyiségének kezelése az egyik legfontosabb társadalmi, táplálkozási és környezeti kérdés. Egyedül az EU – ban évente 90 millió tonna hulladék keletkezik, vagyis az egy főre jutó hulladék mennyisége 180 kg (Cicatiello et al., 2016, European Commission (EC), 2011a). Az élelmiszer hulladékok ártalmatlanítása egyre nagyobb kihívást jelent a társadalom számára. A legtöbb országban, a keletkező élelmiszeripari hulladék a települési szilárd hulladékokkal együtt kerül ártalmatlanításra a hulladéklerakókban (Karmee, 2016). Napjainkban azonban számos hulladék-hasznosítási módszer létezik, amelyekkel például akár az élelmiszeripari hulladékok hasznosítása is történhet (égetés, anaerob lebontás). A hasznosított hulladék felhasználható akár állati takarmányozási célra, illetve folyékony bioüzemanyaggá is átalakíthatók, amit fel lehet használni, mint tüzelőanyagok tiszta formában vagy, mint folyékony keverék adalékanyag dízelmotorokhoz, illetve Ottó – motorokhoz (Karmee et al., 2014, Pham et al., 2014).

Az élelmiszeriparban keletkező hulladékok közé tartoznak például a hústermékek feldolgozásából keletkező melléktermékek (pl.: csontok, szervek, belek és más főtt, vagy nyers maradványok), a sajt – túró – tej és egyéb tejtermékek után visszamaradt élelmiszer zsírok, illetve a különböző élelmiszeripari céllal termelt növények maradványai, mint pl. gabonafélék, cukorrépa, burgonya, szója, kukorica, rizs (Gustafsson et al., 2011). Ezeknél a növényeknél is igaz, hogy a nem hasznosított részeik mezőgazdasági hulladékként, illetve teljes egészükben pedig energetikai célokra is hasznosíthatók. A cukorgyártás melléktermékeként keletkező, a felszeletelt és kilúgozott cukorrépából (*Beta Vulgaris L.*) visszamaradt élelmiszeripari hulladék, a cukorrépaszelet, illetve a cukorgyártás melléktermékeként keletkező, szárított cukorrépaszeletből előállított cukorrépa pellet is alkalmas energia növényként folyékony halmazállapotú biomassza előállítására. Az élelmiszeripari hulladékok tehát lipideket, aminosavakat, szénhidrátokat és egyéb széntartalmú anyagokat is tartalmaznak. A lipidekből származó élelmiszer hulladékot biodízzé lehet átalakítani, míg a komplex szénhidrát tartalmú hulladékok (cellulóz, keményítő) hidrolizálásával, valamint a keletkező cukor erjesztésével növényi eredetű alkoholt, bioetanolt tudunk előállítani (Karmee, 2016).

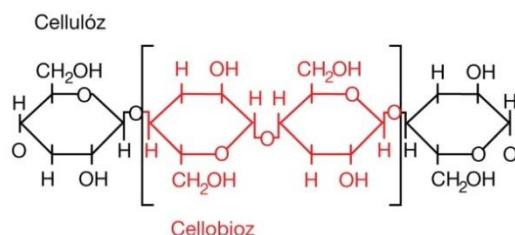
1.3. A lignocellulóz

A lignocellulóz szerkezete rendkívül ellenálló, mind a mikroorganizmusokkal, mind a vegyszerekkel szemben. Ahhoz, hogy a biomasza cukortartalma minél nagyobb mennyiségben elérhető lehessen, szükséges az előkezelések alkalmazása (Horn et al., 2011). A lignocellulóz három fő polimer alkotóeleme a cellulóz (40-50%), hemicellulóz (20-40%) és a lignin (20-30%), amelyek összekapcsolódva egy hetero-mátrix szerkezetet alkotnak. Kisebb hányadában tartalmaz még fehérjéket, lipideket, pektineket és oldható cukrokat, ásványokat is (Pauly et al., 2008).

Cellulóz

A növényi sejtfal legfontosabb és legáltalánosabb komponense a cellulóz polimer, amely a növényi biomasza legnagyobb hányadát, 40-50%-át alkotja. Becslések szerint a mezőgazdasági tevékenységek során, a Földön évente 10-15 milliárd tonna cellulóz keletkezik. Ez az igen ellenálló szerves vegyület, a sejtfalat felépítő D-glükóz egységekből β -1,4 glikozid kötésekkel felépülő, $(C_6H_{10}O_5)_n$ összegképletű poliszacharid, amely a magasabb rendű növények vázanyagának szerepét tölti be (Haraszy et al., 2004). A cellulóz legkisebb ismétlődő egysége a cellobióz (3. ábra), amely két β -1,4 kötéssel kapcsolódó glükóz molekula dimerje (Lee et al., 2015). A cellulóz hosszú (100-15000 glükóz egységnyi), merev, lineáris polimer, mely inter- és intramolekuláris hidrogén kötések kialakítására nagymértékben hajlamos, és az így stabilizált makromolekula nagyfokú rendezettséggel jellemezhető, vízben oldhatatlan, kémiaiailag stabil. A sejtfalban a cellulózmolekulák elektronmikroszkóppal is jól látható, hosszú, párhuzamos szálakból álló kötegeket, mikrofibrillumokat hoznak létre. A mikrofibrillumokban 36 molekula fut együtt, és a közöttük kialakuló hidrogénhidak kristályszerűen rendezett, parakristályos szerkezetet alakítanak ki több ezer glükóz molekulára is kiterjedő hosszban. Ezeknek a hidrogénhid kötéseknek köszönhető a szilárd és stabil szupramolekuláris szerkezet. A cellulóz akár többféle kristályrács szerkezettel is rendelkezhet (I-IV), de a természetben ezekből csak az I fordul elő (O' Sullivan, 1997).

A cellulóz tehát a Földön legnagyobb mennyiségben előforduló makromolekuláris anyag, egy olyan poliszacharid amely enzimek segítségével glükózra bontható, majd amiből a bontást követően etanol nyerhető (Dwivedi, 2009). A cellulóznak, mint megújítható energiaforrásnak jelentős része ipari, valamint mezőgazdasági hulladékként jelenik meg.

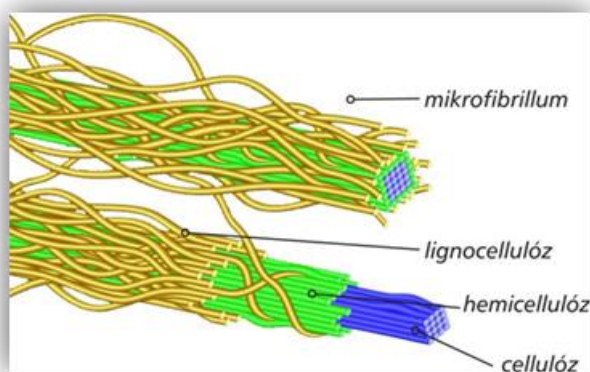


3. ábra: Cellulóz molekula szerkezeti felépítése

(Forrás: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/Sejtbologia/ch17s02.html>)

Hemicellulóz

A hemicellulóz olyan poliszacharid, amely a növényekben a biomassa 20-40%-át alkotja. A hemicellulóz a cellulózzal együtt fordul elő, könnyen hidrolizálódik enyhén savas körülmények között (Tabaka et al., 2006). A láncossz általában kisebb, mint a cellulóz esetében, ugyanakkor nagyszámú oldallánc helyezkedik el a fő vázon, így a hemicellulózok kevésbé kristályos, reaktívabb molekulák. Legfőbb alkotóelemeik az L-arabinóz, D-galaktóz, D-glükóz, D-glükuronsav, D-mannóz és D-xilóz, de ezen kívül L-fukóz, L-rhamnóz és L-galaktóz is megtalálható az oldalláncaikban. A hemicellulózok a cellulóz láncokat beburkolva védik (4. ábra), illetve összeköttetést biztosítanak a cellulóz láncok és a lignin régiói között (Ebringerová et al., 2005). A leggyakoribb hemicellulózok a xilán, mannán, glükomannán, arabinoxilán, xiloglükán arabinogalaktán, valamint galaktoglükomannán (Yi et al., 2012).

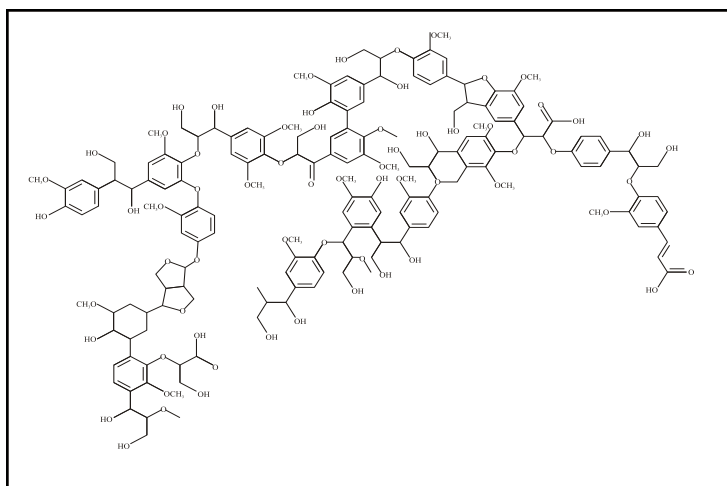


4. ábra: Hemicellulóz elhelyezkedése növényi sejtfalban

(Forrás: <http://agrobio.hu/hu/hirek-archivum/vancsura-jozsef-quot-az-elenjaro-gazdak-talajbakteriumot-hasznalnak-quot/>)

Lignin

A lignocellulóz egyik elsődleges összetevője a lignin, amely egy komplex aromás, fenolos szerkezettel rendelkezik. A puhább fa szárazanyag tömegének 22-30%-át alkotja lignin, míg a keményfánál 17-30%-ban van jelen (Fengel et al., 1989). Alkotóelemei három fő csoportba tartoznak: p-hidroxifenil, guaiacil és a sziringil (Weng et al., 2008). Míg a puhafa túlnyomó részt guaiacil egységekből áll, addig a keményfa elsősorban sziringil egységekből, de jelentős mennyiségű guaiacil egységeket is tartalmaz (Jönsson et al., 2015). A lignin a növények elfásodott szöveteinek alkotórésze, amely heterogén polimer, fenilpropán egységekből épül fel, melyek kovalens kötéssel kapcsolódnak egymáshoz (5. ábra). Mivel a lignin bonyolult szerkezettel rendelkezik, így a különböző fás struktúrájú növények, illetve az ugyanazon növények ligninje sem egységes szerkezetű. A növény támasztórendszerét erősíti, merevíti, illetve a sejtek összekapcsolásáért felelős (Suhas et al., 2007).



5. ábra: A lignin molekulaszerkezete

(Forrás: http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011_0025_kor_4/ch20s03.html)

1.4. Cellulóbontásra alkalmazható enzimek

A legegyszerűbb biokatalizátor az enzim, ami a sejtekben lejátszódó biokémiai reakciókat irányító, katalitikus fehérje, azaz az enzimek is az adott kémiai reakció aktiválási energiáját csökkentik. A glükóz lebontásában szerepet játszó enzimeket katabolikus enzimeknek nevezzük (Rákhely, 2012). A cellulóz enzimés lebontása igen nehéz feladat, egyrészt mert a sejt falban a kristályos cellulóz szálakat hidrogénhidak tartják össze, másrészt pedig, mert kémiaiailag is összekapcsolódnak a lignin és a hemicellulóz révén.

A cellulóz lebontásában résztvevő enzimeket két nagy csoportra bonthatjuk (Percival et al., 2009):

- endoglükanázok: a molekulán belüli kötéseket véletlenszerűen hidrolizálják (β -1,4-glükózidáz),
- exoglükanázok (cellobiohidrolázok CHB): a molekula vége felől hasítanak le cellobiózt vagy glükózt (*Trichoderma reesei*).

A legfontosabb enzimek közé tartoznak a cellulóz hidrolíziséért felelős cellulázok. Ennek az enzimnek a termelésére több aerob és anaerob gomba és baktériumfaj is képes. A cellulolitikus enzimtermelés többféle gombafajra jellemző, ezek közé a gombafajok közé tartoznak például a *Trichoderma*, az *Aspergillus* és a *Penicillium* fajok. A legnagyobb enzimgyártó és forgalmazó Dániában található a Novozymes A/S.

Cellobiáz

A cellobiáz enzimeket termelő mikroorganizmus az *Aspergillus niger*, amely a talajban, komposztban, illetve romlott zöldségek, gyümölcsök felületén fordulhat elő. Az *Aspergillus niger* az *Aspergillus* nemzetségbe, a gombák országába tartozó penészfajta. A niger szó a gomba fekete spóráira utal (Kecskés et al., 2003). A kereskedelemben az egyik leggyakrabban kapható fonalas gomba, a magas fehérje kibocsátása miatt (Hoang et al., 2016). A cellobiáz különböző β – diglükozidos, illetve aril β – glükozidos kötéseket hidrolizál (Woodward et al., 1982). Ez az enzim központi szerepet tölt be a cellulóz hidrolízisében, ugyanis stimulálja a cellulóz hidrolízis sebességét, illetve mértékét, ezáltal csökken a celluláz aktivitás gátlása (Ryu et al., 1980). A cellobiáz enzim a celluláz enzimmal kiegészítve is felhasználható annak érdekében, hogy fokozza a cukrosítást (Abdel-Fattah et al., 1997, Gusakov et al., 1992).

Celluláz

A *Trichoderma reesei* gombák által termelt celluláz három komponenst tartalmaz: a β -1-4-endoglükanázt, β -1-4-exoglükanázt és a cellulázt. A természetes cellulóz hidrolízise glükózzá ettől a három enzimtől függ. A legismertebb celluláz a *Trichoderma reesei* által termelt celluláz, amelynek a cellobiáz mennyisége csekély, valamint korlátozza a cellobiáz glükózzá történő átalakítását (Xueliang et al., 2003). Ez a mikroorganizmus egy lágy, korhadást okozó fonalas gomba, amely egy komplex celluláz enzimrendszer kiválasztására képes, és a továbbiakban ezek a celluláz enzimek katalizálják a cellulóz hidrolízisét.

Xilanáz

A *Trichoderma longibrachiatum* által termelt mikrobiális enzim a xilanáz, amely a hemicellulózok bontására legalkalmasabb enzim. A xilanáz enzim a polimerizálódott, hosszú xilózból álló láncokat bontja, a láncon belüli β -1,4-glikozidos kötések hidrolízisének segítségével. A xilanáz megfelelő működéséhez savas, illetve semleges kémhatást kell biztosítani, ami természetesen az enzimet termelő mikroorganizmusoktól függően enzimkészítményenként változhat (Hu et al. 2011). A fő hemicellulóz polimer a gabona és keményfánál a xilanáz. A xilán β -1,4 és D-xilóz kötések tartalmaz, valamint különböző helyettesíthető oldalláncokat, mint például a L-arabinóz, D-galaktóz, acetyl, feruloil, p-kumaroil és glükuronsav maradékok (Tabka et al., 2006). A xilanáz enzim fontos adalék anyag számos ipari tevékenység során (élelmiszeripar, papírpar), de silózás és komposztálás elősegítésére is használják.

1.5. Fermentációs eljárások

A fermentáció egy mikroorganizmus által vezérelt folyamat (Hussain et al., 2016). Számos ipari (gyógyszeripar, élelmiszeripar, vegyipar) termék előállításában (enzimek) a mikrobiális fermentációnak nagy jelentősége van. A fermentáció olyan kémiai folyamat, amely során szerves anyagokat bontunk le, vagy alakítunk át kompatibilis komponensekre mikrobiális enzim, vagy enzimek segítségével (Parvez et al., 2006). Az enzimek hozzáadásával a szénhidrát polimerekben pentóz és hexóz monomer kötések szabadulnak fel (Yunyun et al., 2015). A folyamat során cukor lebontása történik oxigén kizárásával, valamint a rendszerhez adagolt élesztőgomba hatására megindul az alkoholos erjedés. A francia kémikus, Gay Lussac 1815-ben írta le először a glükóz bruttó erjedési vegyi egyenletét (Gasztonyi, 2003).



A reakcióegyenletből megállapítható tehát, hogy 180 g szőlőcukorból keletkezik 92 g etanol és 88 g (44,8 normál liter) CO_2 gáz. Az alkoholos erjedés nagyon bonyolult folyamat, az (1) reakcióegyenlet több párhuzamosan végbemenő folyamat összegezése. Az enzimes hidrolízis során tehát a cellulóz és a hemicellulóz polimerekből egyszerű cukrok szabadulnak fel, amelyeket ha a továbbiakban fermentációs úton dolgozunk fel, akkor értékes vegyipari, illetve energetikai alapanyagokat kaphatunk (pl.: bioetanol).

A fermentációs eljárások nyitott és zárt rendszerben is végbemehetnek. Ilyen nyílt és zárt rendszerek lehetnek az alábbi eljárások (Kovács, 1998):

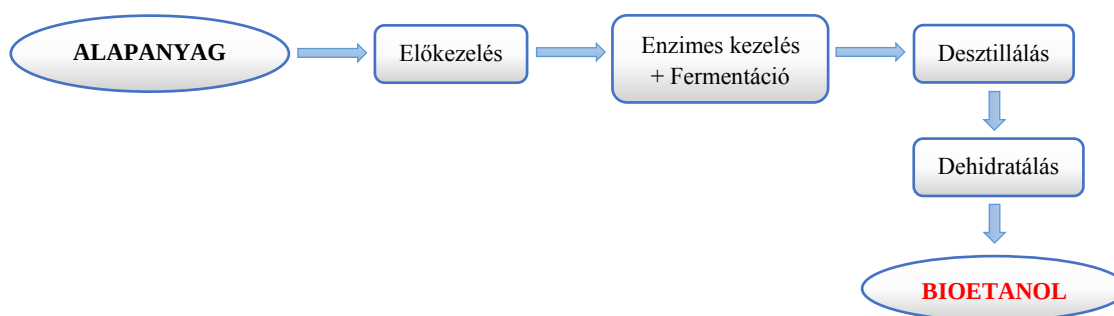
- Szakaszos fermentáció (Batch):
 - legegyszerűbb működési elvű fermentor,
 - fermentációt megelőzően a reaktánsokat egyszerre adagoljuk a rendszerbe,
 - hátránya, hogy előfordulhat termék, vagy szubsztrát gátlás,
 - állandó térfogatú, zárt rendszer,
 - nincs anyagforgalom a fermentáció végéig.
- Rátáplálásos szakaszos fermentáció (Feed-batch):
 - tápanyagot folyamatosan adagoljuk a rendszerhez (szubsztrát gátlás elkerülése végett),
 - induló térfogat kisebb,
 - konstans specifikus növekedési sebesség.
- Folytonos fermentáció (continuous):
 - nyitott rendszer,
 - folyamatos a tápoldat betáplálása és a termék eltávolítása,
 - könnyen szabályozható, állandó paraméterek,
 - jól ellenőrizhető rendszer,
 - hátránya, hogy nagy térfogatokkal kell dolgozni.
- Félfolytonos fermentáció (semicontinuous):
 - ismétlődő, szakaszos fermentációk sorozata.

A szimultán cukrosítás és fermentáció (SSF - Simultaneous Saccharification and Fermentation) előnye a szeparált hidrolízis és fermentációval (SHF – Separate Hydrolysis and Fermentation) szemben, hogy egy eszköz használata is elegendő a végtermék előállításához, és így az energiaszükséglete is kisebb, mint a többlépcsős előállításnak (SHF), valamint az SSF fermentációnál kisebb az esélye a termék szennyeződésének is. Az SSF fermentációval nagyobb, etanol koncentrációt, hozamot érhetünk el, mint az SHF fermentációval.

1.5.1. Szimultán cukrosítás és fermentáció

A szimultán cukrosítás és fermentáció az egyik legfontosabb biotechnológiai eljárás, ahol a keményítő, illetve a cellulóz enzimes lebontása, majd a keletkező cukor enzimek által történő átalakítása etanollá szimultán (egy időben) módon zajlik le, egy ugyanazon egységben (Cardona et al., 2010) (6. ábra). Ezt úgy lehet kivitelezni, hogy az átalakítandó termékhez a végtermék kialakításához szükséges valamennyi anyagot (enzimet, gombát) egyidőben, a folyamat kezdetén hozzáadjuk, majd megfelelő körülményt biztosítunk mindkét részfolyamathoz. A folyamatot egy zárt rendszerben hozzuk létre, külső anyag hozzáadása nélkül, így elkerülhető a termék szennyeződésének veszélye. A termék gátló hatása kisebb mértékű, mivel a lebontott cukor röviddel a keletkezése után átalakul etanollá, így ebben az esetben a cukor általi celluláz gátlás nem okoz problémát.

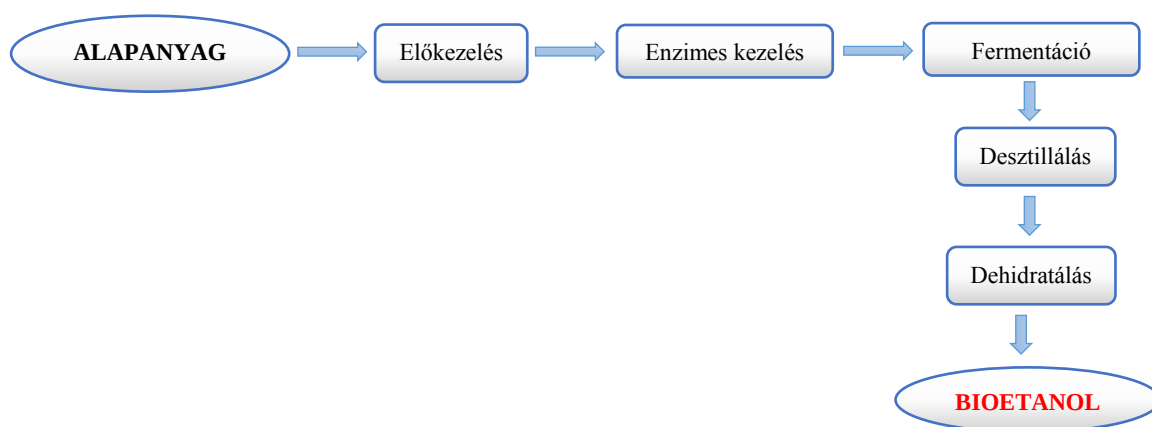
Az SSF fermentációt az 1970 – es évektől kezdték el alkalmazni keményítő ipari feldolgozása során az etanol termelés fokozása érdekében (Madson et al., 1995). A legfőbb hátránya ennek az eljárásnak, hogy az enzimatikus hidrolízis és a fermentáció is ugyanazon kísérleti körülmények között megy végbe, ami a hidrolízis és a fermentáció számára szuboptimális körülményt okozhat (Ask et al., 2012). Kritikus probléma még az SSF eljárásnál az, hogy a celluláz és az erjedő mikroorganizmus hőmérséklet optimuma különböző tartományba esik, ezért fontos szempont a megfelelő enzim – élesztő páros kiválasztása (Kádár et al., 2004). Legnagyobb előnye az SSF eljárásnak, hogy mivel egy eszköz használata elegendő a végtermék előállításához, így az energiaszükséglete is jelentősen kisebb, mint a többlépcsős előállításnak.



6. ábra: SSF fermentáció folyamatábrája (saját ábra)

1.5.2. Elkülönített hidrolízis és fermentáció

A szeparált hidrolízis és fermentáció esetében külön egységben zajlik le a lignocellulóz cukorrá alakítása, majd alkohollá erjesztése (7. ábra). Ennek a kétlépcsős eljárásnak a hátránya, hogy a keletkezett termék gátolja a celluláz aktivitását, így a kinyerhető cukor mennyisége is csökken, amelyet tovább lehetne alakítani etanollá. A fő előnye viszont, hogy a hidrolízist és a fermentációt el lehet végezni egyenként a saját optimális körülményeik között.



7. ábra: SHF fermentáció folyamatábrája (saját ábra)

1.6. Membránszűrési műveletek

Membránokat először az 1960-as években kezdtek el forgalmazni. Számos ipari alkalmazás területén alkalmaznak membrános elválasztási módszereket (biotechnológia, élelmiszeripar, gyógyszeripar, textilipar). Legkorábban a biotechnológiai ipar, illetve a gyógyszeripar területén alkalmaztak fordított ozmózist (RO), illetve membránszűrő tölteteket (Wilf, 2010). A membránszeparációs műveletek modern szétválasztási eljárások közé tartoznak, amelyet az elválasztandó komponensek fizikai vagy kémiai tulajdonságai alapján csoportosíthatunk (Bélafiné, 2002). A membrán (latin eredetű szó: héj, hártya) definíció alapján egy permszelektív gátat jelent, két vagy több fázis között, amely a szürendő oldatot két részre osztja (8. ábra). A membránszeparációs eljárásoknak is természetesen előnyei és hátrányai is vannak.

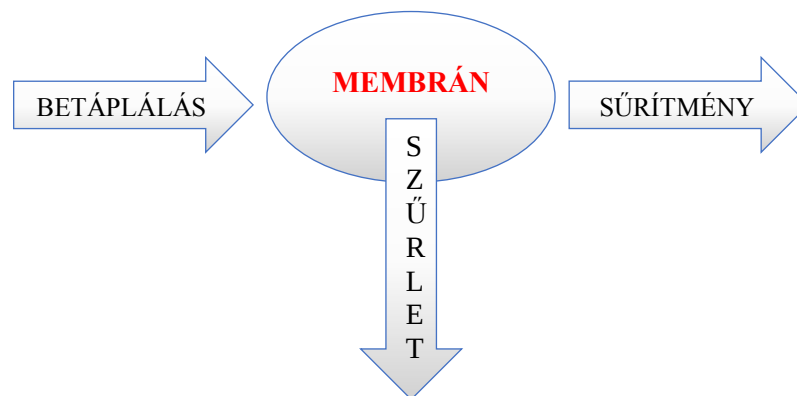
Az előnyeik közé sorolhatóak az alábbi tulajdonságok:

- környezetbarát,
- könnyen variálhatóak,

- folyamatos eljárás,
- méretük egyszerűen változtatható,
- kicsi energiaigényű,
- más műveletekkel is könnyen kombinálhatóak,
- napjaink egyik leggyorsabban fejlődő területe.

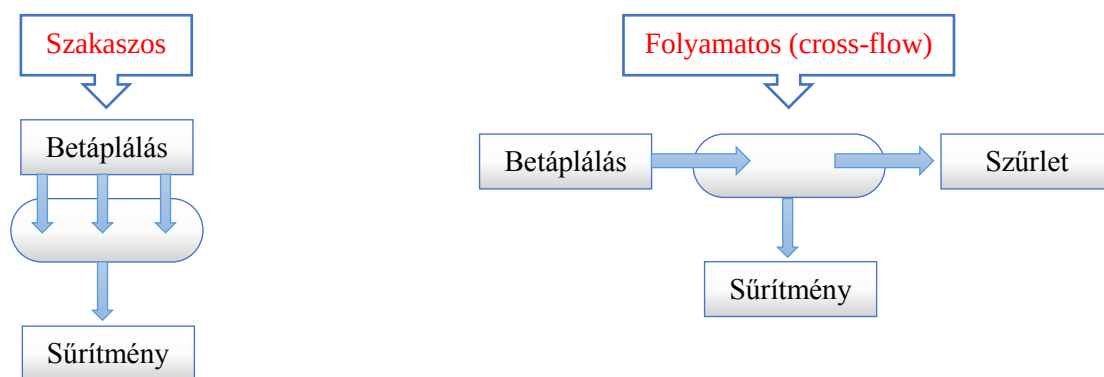
Membránszeparációs eljárások hátrányai az alábbi szempontok:

- gyors eltömődés,
- viszonylag rövid a membránok élettartama,
- koncentráció – polarizáció.



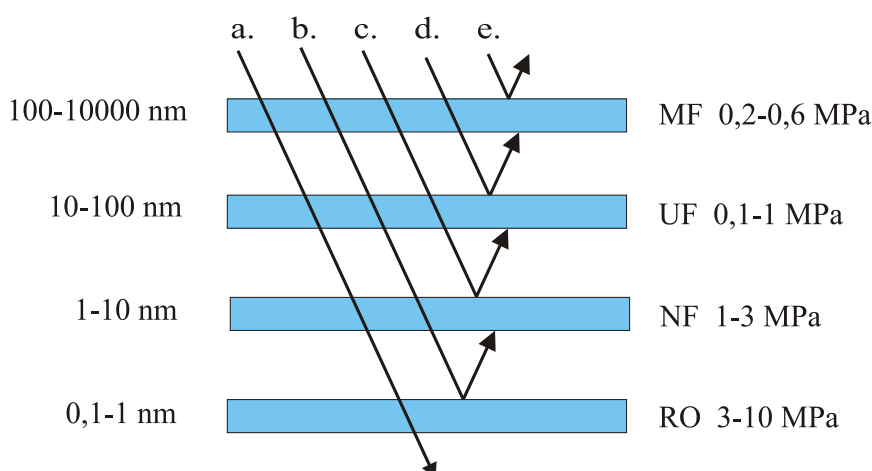
8. ábra: Membránszeparációs műveletek ábrája (saját ábra)

A membrános elválasztások során anyagtranszport megy végbe a membránon keresztül. Két fontos paramétere van az eljárásnak, ami az adott membrán teljesítményét és hatékonyságát mutatja meg, ezek az áteresztőképesség (fluxus – J), illetve a visszatartás (Retention - R). A membránszeparációs elválasztási technikák szakaszos, illetve folyamatos (cross-flow – keresztáramlásos) működésűek is lehetnek. A szakaszos üzemmódban a betáplálás merőleges a membrán felületére, ebben az esetben a szűrőlepeny kialakulása hamarabb következik be, ami a fluxus értékek csökkenéséhez vezethet. A folyamatos (keresztáramlásos) üzemmódnál viszont a betáplálás iránya párhuzamos a membrán felületével, itt a membrán eltömődése kisebb (9. ábra).



9. ábra: Szakaszos és folyamatos (cross-flow) membrán modul működési ábrája (saját ábra)

A nyomáskülönbségen alapuló membránszeparációs eljárásoknál a műveletek hajtóereje a membrán két oldala közötti nyomáskülönbség. Az oldott anyag részecske méretétől függően fejlesztettek ki különböző eljárásokat. Ilyen műveleti eljárások lehetnek a mikroszűrés (MF), ultraszűrés (UF), nanoszűrés (NF), illetve a fordított ozmózis (RO) (10. ábra).



10. ábra: Nyomáskülönbségen alapuló membrános eljárások összegzése (saját készítés)

a.) víz, b.) só, c.) cukor, d.) makromolekula, e.) kolloid

MF-mikroszűrés, UF-ultraszűrés, NF-nanoszűrés, RO-fordított ozmózis

A 10. ábrán jól látható, hogy ha a mikroszűréstől a fordított ozmózis felé haladunk, akkor a leválasztható részecske mérete egyre csökken, az adott membrán pórusméretecsökkenése miatt, ami viszont együtt jár a membrán anyagátadási ellenállásának növekedésével.

1.6.1. Mikroszűrés

Ez a típusú membránszeparációs művelet van a legközelebb a hagyományos értelemben vett szűréshez. A mikroszűrő membránokat a pórusok jellemző méretével jellemzik, attól függően, hogy milyen módszerrel mérik. Pórusméretük a $100 - 10^4$ nm – es tartományig terjedhet, ami leginkább az emulziók és a szuszpenziók tartománya, vastagságuk pedig 10-150 μ m közötti lehet. Az alkalmazott nyomás 0,2 és 0,6 MPa között változhat. Pórusos mikroszűrő membránokat szerves és szervetlen anyagokból állítanak elő, amelyek szerkezetileg szimmetrikusak és asszimmetrikusak is lehetnek.

Mikroszűrés alkalmazásánál szinte elkerülhetetlen a membrán eltömődése, ami fluxus csökkenéssel jár együtt, ezért szükséges a membrán felületét rendszeresen tisztítani. Ipari alkalmazása nagyon széles körű (Makabe et al., 2016), leginkább szennyvíztisztításnál, élelmiszeriparban sterilizációra, szennyező anyagok eltávolítására, olaj – víz emulziók elválasztására, gyógyszeriparban emulziók kezelésénél alkalmazzák (Kong et al., 2010, Hoque et al., 2012, Echavarría et al., 2011, Samuelsson et al., 1997, Kromkamp et al., 2006, Yang et al., 2014, Tonglairoum et al., 2013). Az 1. táblázatban foglaltam össze a leggyakrabban használt membrántípusokat, illetve azok anyagait.

1. táblázat: Mikroszűrő membránok típusai (Bélafiné, 2002)

<i>Típus</i>	<i>Membrán anyaga</i>
kerámia	titán – dioxid (TiO_2) alumínium – oxid (Al_2O_3)
hidrofil polimer	cellulóz észterek poliétterszulfon (PES) poliszulfon (PSF)
hidrofób polimer	polipropilén (PP) polietilén (PE) poli – tetrafluor – etilén (PTFE, teflon)
szervetlen	szén, üveg (SiO_2)

1.6.2. Ultraszűrés

Az elmúlt néhány évtized alatt az ultraszűrési technológia egyre nagyobb figyelmet kapott, számos kedvező tulajdonsága, előnye miatt, mint például, hogy alacsony üzemi nyomáson és hőmérsékleten működtethető. Széles körben alkalmazzák a poliszulfon (PS) membránokat ultraszűrésre, mivel ezeknek a membránoknak jó a termikus és a kémiai stabilitásuk, de találkozhatunk poliamid, alifás poliamid, valamint cellulóz és azok származékai is (Filloux

et al., 2014, Taeseon et al., 2016). A membrán pórusméretének jellemzésére a vágási értéket (cut-off érték) alkalmazzák Daltonban kifejezve (Da) $[g \text{ mol}^{-1}]$, amely a membrán minőségét meghatározó paraméter, egy globuláris fehérje moltömegérték, amelyet a membrán az anyagtranszport során 90%-ban visszatart ($R=0,90$). Az ultraszűrés mérettartománya a mikroszűrés és a nanoszűrés mérettartománya közé esik, pórusméretük 10 – 100 nm. Ezt a típusú pórusos membránt általában a szubmikron méretű kolloid részecskék és makromolekulák, valamint vírusok, baktériumok leválasztására alkalmazzák (Marta et al., 2015).

A kisebb pórusú membránok kialakításához elsősorban asszimmetrikus membránokat használnak (kompozitokat), de manapság már leginkább polimerekből állítják elő őket. Az ultraszűrés esetében a komponensek elválasztása az ún. szitahatás alapján történik. Az ultraszűrés során alkalmazható nyomás 0,1 és 1,0 MPa között változhat. A nyomás függvényében történő vizsgálata során három szakaszra különíthető:

1. átmeneti tartomány,
2. limitált fluxus (itt a fluxus szempontjából a nyomás már nem meghatározó paraméter),
3. lineárisan növekvő fluxus (a fluxus értéket meghatározó ellenállást a membrán ellenállása jelenti).

Többnyire a membránon csak a vízmolekulák képesek áthaladni, így a membrán felszínén felhalmozódnak az oldatot alkotó egyéb anyagok, amelyek ezáltal megnövelik a membrán betáplálási oldalán mért ozmózisnyomás értékét (π), ami csökkenti a hajtóerőként alkalmazott hidrosztatikus nyomáskülönbség (Δp) hatását a víz fluxusnál (J_w):

$$J_w = K(\Delta p - \Delta \pi) \quad (2)$$

Az oldott anyag fluxus értéke (J_s) pedig:

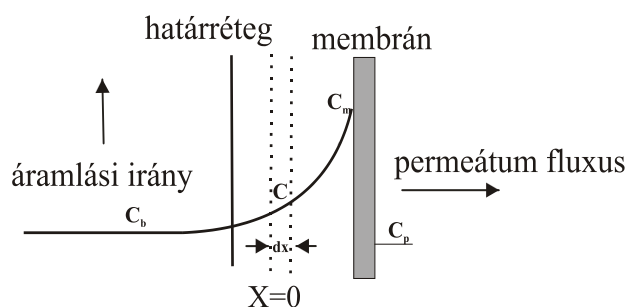
$$J_s = K_s \Delta c_s \quad (3)$$

ahol, K a víz, K_s az oldott anyag permeabilitási együtthatója, Δc_s pedig a sűrítmény koncentráció érték különbsége. Ezekből az összefüggésekből jól látszik, hogy az NF és az RO esetében miért is fontos a membrán alapanyagának pontos megválasztása, ellentétben az MF és UF technikákkal (Field, 2010).

A koncentráció polarizációs jelenség során az oldott anyag az oldat-membrán határfelületén felhalmozódik. Ennek hatására a határrétegben a folyadékáramlás sebessége a zéróhoz közelít, amiből az következik, hogy a határrétegben belüli transzportfolyamat csak diffúzióval jöhet létre. A koncentráció polarizáció függ a betáplált folyadék tulajdonságától, a komponensek diffúzivitásától, illetve a működési körülményektől. Az álló réteg vastagságát a folyadék fizikai tulajdonságaiból meg lehet határozni, illetve az oldat áramlási sebességéből. Az ionoknak az álló rétegbe való beépülésének a sebességét pedig a fluxus és a visszatartás határozza meg. Ezekből az összefüggésekből megállapítható tehát, hogy a membrán szeparáció műveleti paraméterei hatással vannak a koncentráció polarizáció mértékére (Field, 2010). A membránnál felvett anyagmennyiség felállításához négy áramot kell figyelembe venni:

1. az oldott anyag membránon keresztül történő konvektív diffúziója
2. a permeátum konvektív diffúziója membránon keresztül
3. az oldott anyag Fick első törvényét követő ellenirányú diffúziója
4. a membrán felé irányuló oldott anyag konvektív transzportja

Összességében tehát megállapítható, hogy a koncentráció polarizáció kialakulása a membránszűrés szempontjából hátrányos jelenség, ugyanis romlik a hatásfok, lassul a szűrés, valamint a műveleti sebesség is csökken (Pécs, 2011).



11. ábra: Koncentráció polarizáció áramai (saját készítés),
(c_b az oldat koncentrációja, c_m a membránfelszín koncentrációja, c_p a permeátum koncentrációja, c a főtömeg koncentrációja)

A rendszerben kialakult koncentráció polarizáció (11. ábra) matematikai leírása a film elméleten keresztül közelíthető meg. A permeátum fluxusát kiegyenlíti az oldott anyag ellenirányú diffúziója:

$$J(c - c_p) = -D \frac{dc}{dx} \quad (5)$$

Ha az egyenletet átrendezzük, akkor az alábbi összefüggést kapjuk:

$$J \int_0^\delta dx = -D \int_{c_m}^{c_b} \frac{1}{c - c_p} dc \quad (6)$$

ahol, a diffúziós úthossz (x) nullától a határréteg vastagságáig (δ) tart, a koncentrációt (c) pedig a főtömeg koncentrációja (c_b) és a membrán felületén kialakult réteg koncentrációja határozza meg (c_m). Ha tovább rendezzük az egyenletet, a következőt kapjuk a fluxusra meghatározva (Field, 2010):

$$J = \frac{D}{\delta} \ln \frac{c_m - c_p}{c_b - c_p} = k \cdot \ln \frac{c_m - c_p}{c_b - c_p} \quad (7)$$

ahol, δ az anyagátadási határréteg vastagsága [m], ami meghatározza a $\frac{D}{\delta} = k$ anyagátadási együtthatót, amelynek számértékét a Sherwood- (Sh), a Reynolds- (Re) és a Schmidt (Sc) dimenzió mentes számok segítségével tudjuk meghatározni:

$$J = k \ln \frac{c_g}{c_b} \quad (8)$$

$$k = \frac{Sh \cdot D}{d} \quad (9)$$

$$Sh = a Re^b Sc^c \left(\frac{d}{L} \right)^n \quad (10)$$

$$Re = \frac{d \cdot v \cdot \rho}{\eta} \quad (11)$$

$$Sc = \frac{\eta}{\rho \cdot D} \quad (12)$$

ahol, d (a hidraulikai sugár négyszerese) és L a hidraulikai jellemző méretek, a , b , c , n értékek pedig konstansok (Field, 2010).

A filmelmélet alapján tehát, ha a membrán felszínén a recirkulációs sebesség csökken, akkor ennek hatására a határréteg ellenállás nő, és ez a növekedés egészen addig eltart, míg a membrán felületi koncentrációs értéke el nem éri azt az értéket, ahol az oldott anyag már kirakódik a membrán felületére, és a folyamatban így kialakuló gélréteg koncentráció (c_g) állandó értékévé fog válni. Ebben az állapotban a fluxus a következőképpen írható fel, feltéve, hogy a gélréteg koncentrációja magasabb a permeátuménál, vagyis $c_p \sim 0$ (Field, 2010):

$$J_c = -D \frac{dc}{dx} \quad (13)$$

A változók szétválasztását követően és átrendezve az egyenletet az alábbi összefüggéseket kapjuk:

$$J \int_0^{\delta} dx = -D \int_{c_g}^{c_m} \frac{dc}{c} \quad (14)$$

$$J = \frac{D}{\delta} \ln \frac{c_g}{c_b} = k \ln \frac{c_g}{c_b} \quad (15)$$

Nem pórusos membrán esetén, a diffúziós állandó kiszámítható a Stokes-Einstein egyenlet segítségével:

$$D = \frac{2k_B T}{3\pi \cdot \eta \cdot r_p} \quad (16)$$

ahol, k_B a Boltzmann konstans, T a hőmérséklet [K], r_p pedig az oldott anyag átmérője (Field, 2010).

Sokféle alkalmazási területe ismert az ultraszűrő membránoknak, de a leggyorsabban fejlődő területe napjainkban, a környezetvédelem (Shi et al., 2014):

- makromolekulák oldatainak koncentrálására (nagy molekulákat vissza kell tartani)
- élelmiszeripar (tej, zselatin koncentrálás, tejpor előállítás, gyümölcslevek szűrése)
- vegyipar (festékvisszanyerés)
- textilipar
- gépgyártás (olajos szennyvizek, emulziók szétválasztása)
- bőripar
- papíripar

A felsorolt alkalmazási területek közül is az élelmiszeripar területén találkozhatunk legtöbbször ultraszűréssel. Számos országban például, az élelmiszer feldolgozás során keletkező szennyvíz fő forrása a tejipar. A tejipari szennyvíznek pedig nagyon magas a biológiai- és kémiai oxigénigénye (BOD, COD) (fehérjék, zsírok, szénhidrátok, lipidek formájában), valamint a szerves ion koncentrációja (Rahimi et al., 2016). Ugyanakkor számos nemzetközi publikáció számolt már be az enzimek ultraszűréssel történő szeparációjáról is, mint pl. Ehsani et al. (1995) xilanáz és celluláz enzimkeverékből a β -xilanáz ultraszűréssel történő szeparációját vizsgálta. Továbbá széles körben alkalmazzák még vizek mikrobiológiai szennyeződéseinek elválasztására, valamint ipari öblítővizek tisztítására, visszaforgatására, illetve felszíni vizekből peszticidek, szerves anyagok, íz- és szagvegyületek eltávolítására is.

1.6.3. Nanoszűrés

Ez a membránszeparációs eljárás akkor alkalmazható, ha kis molekulatömegű oldott anyagok (szerves só, kicsi szerves molekula, kétértékű ionok, cukrok) elválasztása a cél. A nanoszűrő membrán az előbbi membránokhoz képest kisebb pórusmérettel (1–10 nm), illetve nagyobb ellenállással rendelkező membrán. Ennél az eljárásnál nagyobb nyomáskülönbséget kell alkalmazni, 1–3 MPa. A nanoszűrő membránok mindegyike aszimmetrikus szerkezetű, valamint a retenciója jelentősen kisebb az egyértékű ionokkal szemben (Na^+ , Cl^-), de a kétértékű ionokat (Ca^{2+}) jól visszatartják a szennyezőkkel együtt (Al-Rawajfeh, 2016). Nanoszűrést leginkább herbicidek, rovarölő szerek, színezékek szeparációjára alkalmazzák (Hussain et al., 2009, Gao et al., 1999, Zhou et al., 1999, Wang et al., 2000).

1.6.4. Fordított ozmózis

A fordított ozmózis esetében gyakorlatilag csak az oldószer molekulák jutnak át a membránon keresztül. Fordított ozmózis alkalmazásánál a membrán pórusmérete 0,1 és 1 nm közötti tartományba esik. Az RO membrán az oldott anyagot nem engedi át, viszont az oldószert igen, tehát ha az alkalmazott nyomás kisebb, mint az ozmózis nyomás, akkor az oldószer a hígabb oldal felől a töményebb oldal felé fog áramolni (Wijmans et al., 1995, Soltanieh et al., 1981, Lee, 1975). Ezek a membránok is szintén aszimmetrikus szerkezetű membránok, amelyek transzmembrán nyomása 3–10 MPa közötti. Az RO membránok nem pórusos membránok, hanem ún. bőrtípusú membránok.

Szintén számos ipari tevékenység során alkalmaznak fordított ozmózis technikát, mint például a tengervíz sóalanításával ivóvizet állítanak elő, gyógyszeriparban, élelmiszeriparban koncentrációs- és elválasztási célokra (tej besűrítése), illetve ivóvíz házi tisztítására, ipari- és kazántápvíz előkészítésére, valamint különböző oltóanyagokhoz ultra tiszta vizek előállítására (Shenvi et al., 2015).

1.7. Enzimvisszanyerési technológiák

Napjainkban a lignocellulóz biomasszából biológiai átalakítással történő üzemanyag minőségű bioetanol előállítása vonzó lehetőséget jelent a megújuló és a környezetbarát bioüzemanyagok fejlesztéséhez. A biofinomítás folyamata három fő lépésből áll: előkezelés, hidrolízis és fermentáció (Yi et al., 2012). A cellulóz hidrolíziséhez ahhoz, hogy fermentálható cukrokat kapjunk, enzimeket használunk, ami az eljárás egyik legjelentősebb termelési költségét jelenti. Nem lehet figyelmen kívül hagyni a fontosságát, hogy az enzimek jelentős mértékben megdrágíthatják a folyamatot, ugyanis a teljes költség körülbelül 50%-a hidrolízis eljárásból, míg 20%-a bioetanol termelésből származik (Knutsen et al., 2002, Tu et al., 2007a). Két fő stratégia létezik az enzimek költségének csökkentésére. Az egyik megoldás miszerint molekuláris manipuláció által növeljük az enzimek specifikus aktivitását, illetve a különböző cellulóz alapú gombák és baktériumok termelékenységét és hozamát, valamint a másik megoldás szerint a hidrolízis után az enzimeket visszanyerjük és hasznosítjuk, ebben lehetnek segítségünkre a membrán szeparációs eljárások (Ramos et al., 1994). A hidrolízis folyamata során a cellulázok tipikusan két különböző formában jelennek meg. A cellulázok közül néhány oldatban van szuszpendálva (szabad enzimek), míg mások a maradék szubsztráthoz kötődnek (cellulóz, lignin) (Tu et al., 2007b). A kötött formában lévő enzimeket sokkal könnyebb kinyerni, viszont a további hidrolízishez szükséges katalitikus aktivitásuk jóval alacsonyabb, így munkám során a szabad formában lévő enzimek visszanyerését vizsgáltam membrán szeparációs eljárásokkal. A membrán szeparációs eljárás az egyik leghatékonyabb módszer a hidrolizált oldatból történő celluláz enzimek visszanyerésére és hasznosítására. A bomlásból illetve a denaturálódásból adódó enzimaktivitás csökkenés viszont korlátozza az enzim visszanyerését és hasznosítását, valamint potenciálisan hozzájárul a membrán szeparációs eljárás költségeinek növeléséhez is, ugyanis a membrán életképessége csökken, ezért fontos lenne továbbtanulmányozni a lehetőségét annak az eljárásnak, amellyel az enzimek denaturálódása megakadályozható lehetne (Yi et al., 2012).

1.8. Hatékonyság növelő módszerek

Ahogy azt már többször láthattuk a megújuló bioenergia forrásként szolgáló, hemicellulóz bázis hatékony cukrosításának egyik legnagyobb gátja a hemicellulóz összetett struktúrája. Ennek megbontásával, részleges lebontásával nagymértékben növelhetővé válik a feltárhatóság. Ilyen feltárást növelő eljárást a szakirodalom nagyon sokat ismer és alkalmaz, akár már az ipari gyakorlatban is számos konkrét alkalmazással találkozhatunk. A kevésbé ismert alkalmazási eljárások közül a mikrohullámú energiaközlést (MW) és az ultrahang (UH) energiájának alkalmazhatóságát vizsgáltam meg átfogóan.

1.8.1. Mikrohullámú energiaközlés

A mikrohullámú (MW) sugárzás olyan elektromágneses hullámok sokasága, amelynek frekvenciája 300 MHz és 300 GHz, valamint hullámhossza 10^6 és 10^9 nm között van. A MW tartomány az infravörös, illetve a rádiófrekvenciás sugárzás között található (Almássy, 1964). A cellulóz, hemicellulóz alapú biomasszákból történő bioetanol előállítás a heterogén nyersanyagok miatt igen nehéz feladat. A MW egy olyan energiaközlő módszer, amelynél elektromágneses teret alkalmazunk a kezelendő nyersanyag molekula szerkezetének fizikai, kémiai és biológiai változtatásaihoz (Peng et al., 2014). Ennek köszönhetően nő a kezelendő anyag fajlagos felülete, csökken a cellulóz kristályosodása és polimerizációja, ami a lignin depolarizációjához vezet és így a szubsztrát hozzáférhetősége is nő az enzimes kezelés szempontjából (Odhner et al., 2012, Diaz et al., 2015). A mikrohullámú energiaközléssel történő előkezelések tehát jó lehetőségnek mutatkoznak, habár megdrágíthatják a folyamatot (Binod et al., 2010), de bizonyos felhasználási esetekben egy adott folyamat energiaigénye összességében mégis csökkenthető a MW alkalmazása miatt (Bélafi-Bakó et al., 2012, Hodúr et al., 2009). A kezelés bármely pillanatban leállítható, illetve szelektíven is végezhető a kezelés, valamint könnyen kombinálható különböző kémiai kezelésekkel (Caddick, 1995, Binod et al., 2010). Számos tanulmány szerint, a mikrohullámú energiával történő kezelés megváltoztatja a lignocellulóz szerkezetét, degradálja a lignin és a hemicellulóz tartalmát, így ezáltal növelhető a cellulóz enzimátikus érzékenysége (Azuma et al., 1984, Xiong et al., 2000). Számos ipari alkalmazása ismert a mikrohullámú kezelésnek, például az élelmiszeriparban pasztörözésre, sterilizálásra, szárításra, blansírozásra, temperálásra, vagy akár olvasztásra is használják (Porto 2016, Decareau et al., 1985, Chandrasekaran et al., 2013).

1.8.2. Ultrahang erőter

Számos mérnöki tevékenység során alkalmaznak ultrahangos készüléket a hatékonyság növelése céljából, ezáltal intenzívebbé tehetőek különböző kémiai reakciók, vagy akár egyéb szárítási folyamatok (Gondrexon et al., 2015). Gyakorlatban az ultrahangot rezgéskeltőkkel állítjuk elő, például elektromechanikus átalakítókkal, amelynek fő része a generátor. Ez a generátor termeli az elektromos áramot, majd a sugárzó ezt az elektromos energiát alakítja át mechanikai rezgéssé, amit a vele érintkező közegnek átad. Az ultrahang a testek belsejébe behatolva a hang terjedési sebességének segítségével onnan tovább halad. Intenzitása az abszorbens rétegvastagságának növelésével arányosan csökken, és rövid hullámhossz következtében jól irányítható az adott helyre.

Az ultrahanggal besugárzott közegekben bonyolult folyamatok mennek végbe (Tarjáni, 1971):

- *Primer hatások:*
 - Kavitáció: ultrahang hatására a folyadékokban fellépő feszültségnek köszönhetően a molekulák közötti kohéziós erők fellazulnak, majd a részecskék között mikroszkopikus méretű üregek jönnek létre, amelyek rövid élettartamuk miatt összeomlanak.
 - Hangsugárnyomás: az útjában álló akadályra állandó egyirányú nyomást gyakorol a haladó hullám, így ennek a sugárnyomásnak köszönhetően a folyadék – levegő határfelületen szökőkút jön létre.
 - Abszorpció: ha közegben terjed az ultrahang, az abszorpció következtében energiát veszít, így a hővé alakult energia a közeg hőmérsékletét megemeli.
- *Szekunder hatások:*
 - Mechanikai hatások: jól megválasztott körülmények között a rezgés hatására a részecskék széttöredezhetnek, amely finomabb eloszlást eredményez (diszpergálás, koagulálás).
 - Kémiai hatás: vizes oldatokban a víz aktiválódása következik be. Az aktiválódáshoz szükséges energia a kavitáció során szabadul fel.
 - Biológiai hatás: a besugárzásnak köszönhetően vírusok, baktériumok, gombák is elpusztulhatnak.

A membrános elválasztási műveletek kiegészíthetők ultrahang készülék használatával is, annak érdekében, hogy az ultrahang keltette besugárzás hatására a szuszpenziókban lévő sejtek könnyebben szétessenek, széttöredeződjenek. Fontos akusztikai jelenség a kavitáció, ami a folyadékokban történő üreg vagy buborékképződést jelenti. Az ultrahangos besugárzás hatására történő membrán-permeabilitás változása tehát a kavitáció mechanikai hatásának az eredménye (Muthukumaran, 2006).

Számos ipari tevékenység során alkalmaznak ultrahangos sugárzást, legfőképpen a biotechnológiai ipar és az élelmiszeripar területén használják csírátlanításra, tisztításra, diszpergálásra, anyag transzport folyamatok gyorsítására, emulzióképzésre, valamint sejtanyagcsere termékek kinyerésére.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Tudományos munkám célja a cellulóz-, ill. hemicellulóz tartalmú hulladékok cukrosítása, illetve etanollá alakítása, valamint a folyamatban felhasznált enzimek visszanyerése és visszaforgatása.

Munkám során többféle, mezőgazdasági és élelmiszeripari hulladékot és mellékterméket vizsgáltam meg szubsztrátként:

- cukorrépaszelet,
- cukorrépa pellet,
- melléktermék dohány,
- biomassa dohány,
- nyírfa apríték.

A lebontási folyamat hatékonyságának növelése céljából kutatási munkám céljai között szerepelt az is, hogy megvizsgáljam az

- előkezelési módszerek alkalmazhatóságát, valamint
- a kezelési körülmények paramétereinek a redukáló cukor kinyerésének mértékére gyakorolt hatásait.

Az alkalmazott előkezelési módszerek:

- mechanikai előkezelés:
 - aprítás, őrlés: az anyagátadás hatékonyságának növelése érdekében,
- kémiai előkezelés:
 - savas és lúgos előkezelés: a molekulák közötti észter kötések felbontása, illetve a hemicellulóz és xilán komponensek felbontása érdekében,
- fizikai-kémiai előkezelések:
 - gőzrobbantás: a szubsztrát homogenitásának növelése, illetve az anaerob lebontás sebességének fokozása céljából.
 - mikrohullámú-kémiai előkezelés: a hidrolízis hatékonyabbá tétele érdekében.

A kezelések hatékonyságát a kitermelhető cukrok mennyiségének, valamint a cellulóz lebomlással arányos redukáló cukor termelődési ütem segítségével jellemzem.

A kutatómunkámat továbbá kiterjesztem a fenti alapanyagokból történő bioetanol fermentáció hatékonyság-elemzésére, vizsgálva:

- a szimultán cukrosítás és fermentációs (SSF) és
- az elkülönített cukrosítás és fermentációs (SHF) alkalmazhatóságát, és a fermentáció körülményeinek hatását.
 - Szeparált hidrolízis és fermentáció (SHF): ahol időben és térben elkülönítve, egymást követően került sor a cellulóz hidrolízisére és a keletkezett cukor fermentációjára.
 - Szimultán cukrosítás és fermentáció (SSF): ahol egyidejűleg tartalmazta a rendszer a cukrosításhoz szükséges enzimeket és a fermentációhoz szükséges élesztő gombákat.

Célomná tűztem ki, hogy a cellulóztartalmú biomasszából történő bioetanol előállítási folyamat gazdaságosságát nagymértékben befolyásoló enzimes hidrolízis műveleti lépcső hatékonyság növelése érdekében olyan vegyszermentes, környezetkímélő és költséghatékony membránszeparációs eljárást dolgozzak ki, amellyel a hidrolízis során alkalmazott enzimek a folyamatba minimális veszteséggel visszaforgathatóvá válnak, az eredeti aktivitásuk minél tökéletesebb megőrzése mellett.

A membrános enzim-visszanyerési eljárás esetében, az alkalmazott membránok élettartamának növelése, a szeparációs hatásfok javítása, valamint a membrán-eltömődési jelenségek kialakulásának késleltetése, és ezáltal a permeátum fluxus növelése céljából megvizsgálom az ultrahangos erőternek a modell oldatok és valós fermentlevek szűrése során való alkalmazhatóságát és a szonikáció paramétereinek a membránellenállásokra, a visszatartási mutatókra, valamint az enzimaktivitás stabilitására gyakorolt hatásait.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vizsgálati alapanyagok

Kutatómunkám során alapanyagként az élelmiszeriparban és a mezőgazdaságban keletkező cellulóztartalmú hulladékokat használtam fel. A cukorgyártás melléktermékeként, a felszeletelt és kilúgozott cukorrépából (*Beta Vulgaris L.*) visszamaradt cukorrépaszeletet, illetve a szárított cukorrépaszeletből előállított cukorrépa pelletet vizsgáltam. A pellet egy olyan, préselt szálaz, rostos anyag, amelyet vagy saját anyaga, vagy belekevert kötőanyag tart össze. Továbbá magyar termelőtől származó kétféle dohány növényt (*Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum*) is vizsgáltam, az egyik az un. kísérleti dohány (KD), amelynél a teljes növény a mintába kerül (szár, levél). Ezt a biomasszadohányként termesztett növényt kisebb sor és tőtávolsággal ültetik egymáshoz, a nagyobb, egységnyi területre eső hozam érdekében. Ennek a dohánynak a termesztés célja tehát, hogy biomassza forrásként használják fel. Ezt a termelési kísérletet az tette szükségessé, hogy a csökkenő ipari dohány felvásárlás miatt a termesztők a felvásárlásból kieső bevételüket ilyen biomasszadohányból pótolni tudják, így az ő megkeresésükre kezdtem el kísérleti vizsgálataimat a dohánynövény, mint lehetséges biomasszaforrás irányában. A másik vizsgálati minta pedig az un. melléktermék dohány (MD), ami a dohányipari felhasználás után fennmaradó részeket tartalmazza, mint például a szármaradék, és kisebb levél darabok, tehát ez a minta tipikusan dohányipari hulladékként került a vizsgálati minták közé. A vizsgálati mintákat a kísérleteket megelőzően légmentesen, fagyasztva tároltam.

Norvégiában, Ås- ban, a Norwegian University of Life Sciences (Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science), Kémiai, Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszéken végzett kutatásaim során pedig a tengerszint feletti 900 m-es magasságban élő, 90 éves norvégiai nyírfa (*Betula pubescens*) kéreg nélküli faforgácsát (20-30 mm) tanulmányoztam, ami csomagolva érkezett az egyetemre. A nyírfa kéreg darálást és szitálást (frakcionálást) követően a vizsgálatokig szobahőmérsékleten tároltam.

A vizsgált alapanyagok egyrészt különböző iparágakat reprezentálnak, élelmiszeripar, faipar, dohányipar/növénytermesztés, másrészt a vizsgált anyagok mindegyike egy-egy konkrét megkeresés, megbízás vagy projekt alapú együttműködés kapcsán került kiválasztásra.

3.2. Vizsgálati módszerek

3.2.1. Előkezelések

A biomassza előkezelése különböző módszerekkel egy nagyon lényeges lépése lehet a biomassza átalakításának, mivel a lignin polimer, ami jelen van a lignocellulóz biomassza makromolekuláris szerkezetében, inhibítorokat generál, amelyek gátló hatással lehetnek az enzimatisz hidrolízisre és a fermentációra. Fontos szempont tehát a lignin eltávolítása és a kötések felszakítása, így az előkezelések alkalmazása lehetővé teheti, hogy a biomassza enzimatisz hidrolízisével esetleg több fermentálható cukrokat tudjunk termelni.

Hatékony előkezelési technikával fel lehet szabadítani a ligninből a cellulózt és a hemicellulózt, valamint csökkenteni lehet a cellulóz kristályosságát. A különböző előkezelési eljárások során más és más a fermentálható cukrok összhozama, illetve egyes előkezelések olyan vegyületeket is generálhatnak, amelyek gátló hatással lehetnek az enzimatisz hidrolízisre, illetve a mikrobák fermentálására is (Zeng et al., 2014). Egyes előkezelési eljárással pedig csökkenteni lehet a mintákkal bevitt mikroorganizmusok, illetve gombák számát is, amelyek a mintákban mért cukormennyiségek ingadozásaiért okolhatók. Az előkezelés választása függ a nyersanyag jellemzőitől és a végterméktől. A hagyományos biomassza előkezelési módszerek közé sorolhatjuk a mechanikai, fizikai és kémiai előkezeléseket (Rawel et al., 2016).

a. Mechanikai előkezelés

A fermentációs vizsgálatokat megelőzően a minták egy részét egy laboratóriumi verőcsapos diszmembrátor berendezéssel, illetve kutterrel aprítottam, továbbá pl. a cukorrépa pellet vagy a nyírfa apríték esetében szitasorozat segítségével különböző homodiszperz halmazokra bontottam fel. Ezzel az előkezelési eljárással, ami ipari körülmények között is elterjedt módszer, a vizsgálandó minták méretét tudtam csökkenteni, mivel ez a további előkezelések hatékonyságának növelését is elősegítheti (Barótfi, 2000).

b. Termikus előkezelés

A fermentlevek termikus előkezelését fűthető, laboratóriumi keverő (ARE Heat Magnetic Stirrer) segítségével hajtottam végre. A vizsgálandó szuszpenzió előkezelését 200 cm³-es Erlenmeyer lombikban végeztem, a lombikba egy higanyos hőmérőt helyeztem, amely segítségével ellenőrizni tudtam a kezelési hőmérsékletet, amely 85 °C volt. A párolgás minimalizálása érdekében parafilmmel zártam le a lombikot. A kezelési idő 20 percig tartott.

c. Lúgos előkezelés

A lúgos előkezelésnél 0,1 mólos NaOH oldat segítségével pH=10 értéket állítottam be a fermentleveknek, majd fűthető, laboratóriumi keverő segítségével 85 °C-on, 20 percig kezeltem a mintákat.

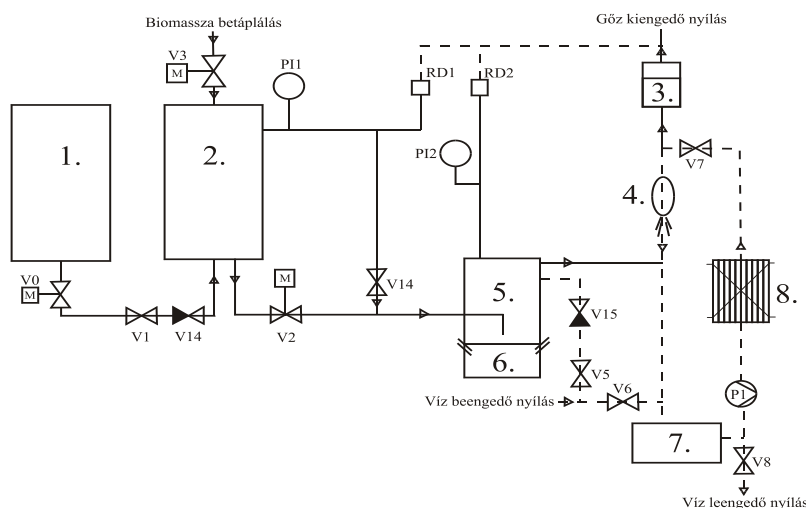
d. Mikrohullámú előkezelés

A mikrohullámú előkezeléseket egy laboratóriumi (Labotron 500, Bucher-Guyer AG) mikrohullámú berendezésben végeztem 250; 500 és 800 W teljesítmény mellett, eltérő kezelési időtartamig (1,5; 3; 5 és 10 perc). A készülékben lévő forgótányér a minták egyenletes hőmérséklet eloszlását biztosította. A mikrohullámú előkezeléshez homogenizált szuszpenziót készítettem a reaktorba szükséges vizsgálandó minta mennyiségéből, azaz 15 g mintából és 1000 cm³ desztillált vízből. Ezzel az előkezelési eljárással az volt a célom, hogy a már több szerző által is kimutatott (Beszédes et al., 2011) mikrohullámú energia bevitel nem termikus (non thermal) hatásának segítségével, el tudjam érni a cellulóz/lignocellulóz molekulák közötti kötések felbontását, továbbá szerkezetük megbontását és lazítását, ami által a hidrolízist hatékonyabbá, a cellulóz molekulákat pedig az enzimek számára hozzáférhetőbbé tudom tenni.

e. Gőzrobbantásos előkezelés

Gőzrobbantásos előkezeléseket az aprított és leszítált (10 mm) nyírfa esetében alkalmaztam. A gőzrobbantás elvén működő berendezés (Cambi AS, Asker, Norway) egy 20 L-es nyomástartó edényből, valamint egy olyan tartályból áll, amelynek alsó része egy eltávolítható tartó edény, ahol az előkezelt minta tárolódik. A gőzt egy 25 kW-os elektromos gőzkazán (Parat, Flekkefjord, Norway) generálja, így a gőz eléri a maximális nyomást, 34 bar (240 °C). A nyersanyagot az előkezelő edénybe juttatják, amin keresztül engedik a gőzt. A gőz egy része kondenzálódik, majd a kondenzvíz egy szórófej segítségével jut el a víztartályba, másik része, ami nem kondenzálódik, egy szénszűrőn keresztül hagyja el a berendezést (Horn et al., 2011) (12. ábra). A gőzrobbantásos előkezelés legfőbb előnye, hogy a szubsztrát homogenitása növelhető, valamint az anaerob lebontás sebessége gyorsabb lesz. Kísérletem során a minta adagolótartályába 300 g mintát helyeztem, amit az előkezelést megelőzően 10 perccel előmelegítettem.

A minták előkezelése 170; 180; 190 és 200 °C-on 10 percig tartott, illetve 210; 220 és 230 °C-on, 5; 10 és 15 percig. Az előkezelt mintákat 4 °C-on hűtőben tároltam a kísérletek megkezdéséig.



12. ábra: Gőzrobbantásos berendezés sematikus ábrája (Horn et al., 2011)

1. – gőzkazán; 2. – előkezelő reaktor; 3. – szén szűrő; 4. – víz szórófej; 5. – vízkondenzáló; 6. – kezelt biomassza; 7. – kondenzvíz gyűjtő tank; 8. – hőcserélő; M – motorszelepek; P1 – pumpa; PI 1 és PI 2 nyomásszabályozó manométer; RD 1 és RD 2 biztonsági szelep; V 0-15 – szelepek; V6 és V8 – vízmennyiség szabályozó szelep; V7 – vízkör lezáró szelep; V14 és V15 – fekete háromszög jelzi, hogy egyirányú szelep; Jobb alsó sarokban lévő szaggatott vonal jelzi a víz áramlását.

3.2.2. Szárazanyag tartalom meghatározása

A minták szárazanyag tartalmának meghatározását 24 órán keresztül, 105 °C-on szárítószekrényben szárítva végeztem, majd a szárítást követően analitikai mérlegen visszamért állandósult tömegekből határoztam meg a minták szárazanyagtartalmát.

3.2.3. Cukormeghatározási módszerek

3.2.3.1. Spektrofotometriás meghatározás

Munkám során minden esetben először a minták enzimatiszus feltárása során felszabaduló redukáló cukortartalmat határoztam meg spektrofotometriás (NANOCOLOR[®] ^{UV}/_{VIS}, Macherey-Nagel) módszerrel, DNSA (3, 5 -dinitro-szalicilsavval való színreakció alapján, kalibrációt követően) jelenlétében (Miller, 1959).

Többféle kezelési módszert, eljárást alkalmaztam a hidrolízishez, amelyeket a 2. táblázatban foglaltam össze. A mintákból először különböző összetételű szuszpenziókat készítettem. A cukrosítási folyamatoknál alkalmazott enzimek a *Trichoderma reesei* által termelt celluláz (CLA) (Cellulast 1.5L, Novozymes A/S, Denmark; 700 U/g), az *Aspergillus niger* (Novozym 188, Novozymes A/S, Denmark; 250 U/g) által termelt cellobiáz (CLB), illetve a *Trichoderma longibrachiatum* által termelt xilanáz (XIL) (Sigma-Aldrich, 1 U/g) enzimkeverékek voltak. Az enzimmennyiségeket faktoriális kísérletterv alapján állapítottam meg, excel program segítségével.

A cukorkihozatal értéket a fermentlében mérhető cukortartalomról határoztam meg, majd egységnyi szárazanyagtömegre vonatkoztatva adtam meg. A cukorkihozatal értékeit a 17. számú egyenlet alapján számoltam ki:

$$\left(\frac{V_{H_2O} \cdot c_{cukor}}{m_{sz\acute{a}raz\ anyag}} \right) / 1000 \text{ [mg}_{cukor}/\text{g}_{sz\acute{a}raz\ anyag}] \quad (17)$$

ahol, V_{H_2O} desztillált víz térfogata [cm^3], c_{cukor} cukorkoncentráció [mg/cm^3], $m_{sz\acute{a}raz\ a.}$ bemért szárazanyag tömege [g].

3.2.3.2. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás meghatározás

Kutatómunkám során az aprított nyírfakéreg fermentlé enzimes hidrolízis vizsgálatához alkalmaztam az RI detektoros Dionex Ultimate 3000 típusú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) (13. ábra). Az RI detektor egy univerzális detektor, ami csak akkor alkalmazható, ha az elválasztott komponensek törésmutatója eltér az eluens törésmutatójától. Törésmutató változást idézhet elő már akár a 0,1%-os eluens összetétel változás. A centrifugált vizsgálandó fermentléből 20 μL térfogatomennyiséget hígítottam 9,980 mL desztillált vízzel (500-szoros hígítás), amiből az analízishez 200 μL -t használtam fel. A mérésekkel párhuzamosan glükóz kalibrációt is készítettem 0,2; 0,1; 0,05; és 0,02 g/L-es glükóz oldattal. Az analizálandó mintákat ebben az esetben automata adagolórendszer juttatta a mozgó fázisba, előre beprogramozott idő és rend szerint, így ezzel a módszerrel egyidejűleg akár 25-100 minta is analizálható egyszerre. Mindegyik minta vizsgálata 1 órát vett igénybe.

A HPLC berendezés az analízist követően a glükóz koncentrációkat g/L egységben adta meg, amelyet tovább szorozva a hígítással (500) megkaptam a minták tényleges cukorkihozatali értékét [g/L].



13. ábra: Nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia (Forrás: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/35581-Bro-UltiMate-3000-LC-Systems-04Aug2010-LPN1820-05.pdf>)

3.2.4. Biodegradációs módszerek

A megfelelő módszer kiválasztása érdekében kísérleteket végeztem szeparált hidrolízis és fermentációval (SHF - separated hydrolysis and fermentation), illetve szimultán cukrosítás és fermentációval (SSF - simultaneous saccharification and fermentation) egyaránt.

Az SSF és SHF fermentációs vizsgálatokat négy különböző eljárással végeztem (laboratóriumi fermentációs egység, mágneses keverős termosztát, automatikus rázóvízfürdő, rotációs kémcsőállvány - fűthető inkubátorban), amelyek főbb paramétereit a 2. táblázatban foglaltam össze, valamint az alábbi felsorolt enzimeket alkalmaztam a cukrosítási folyamatok vizsgálatánál:

- *Trichoderma reesei* által termelt celluláz (CLA) (Cellulast 1.5L, Novozymes A/S, Denmark; 700 U/g),
- *Aspergillus niger* által termelt cellobiáz (CLB) (Novozym 188, Novozymes A/S, Denmark; 250 U/g),
- *Trichoderma longibrachiatum* által termelt xilanáz (XIL) (Sigma-Aldrich, 1 U/g),
- Cellic CTec2 (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark).

2. táblázat: SSF és SHF kísérleti paraméterei

SSF és SHF eljárások		fermentációs paraméterek								
		szubsztrát	CLA [cm ³]	CLB [cm ³]	XIL [mg]	T [°C]	t [óra]	V fermentlé [cm ³]	m szárazanyag [g]	pH
laboratóriumi fermentációs egység (Labfors Minifors, Belgium)	SSF	dohány	-	-	2000 3600 4000	30	96	1000	80	4,5
	SSF	cukorrépa pellet	0,1 0,2 0,25 0,3 0,35	0,1 0,25 0,3 0,35	-	30	336	1000	15	4,5
mágneses keverős termosztát (OXITOP IS12)	SHF SSF	cukorrépa szelet	0,05 0,1 0,3 0,6	0,05 0,1 0,3 0,6	-	45 30	168	85	7,5 15 30	5
automatikus rázóvízfürdő (Tecator 1024)	SHF SSF	dohány	0,35 0,45	0,35 0,45	-	50	96	50	4	5
			0,372 0,466	0,458 0,386	-	50 35	96	50	4	5
			-	-	12,5 25 50 100 200 240 280 320 360	30	96	50	4	4,5
rotációs kémcsőállvány (Stuart Rotator SB3) + fűthető inkubátor (Gallenkamp, Orbital Incubator)	SHF	nyírfá	Cellic CTec2 (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) [cm ³] 0,3			50	48	10	0,304	5

Az ipari mértékben legtöbbet alkalmazott és legelterjedtebb etanolt termelő mikroorganizmusok az élesztők, ezek közül is a *Saccharomices cerevisiae* (pékélesztő), amely tojásdad lakú sejtekből áll, átlagos átmérője 5 µm, hossza 8 µm. Mozgási szerveik (csillóik) nincsenek és sarjadzással képesek szaporodni (Gasztonyi, 2003). Előnyös tulajdonsága, hogy egyszerre nagy mennyiségben képes etanolt fermentálni, illetve nem termel az alkohol előállítását gátló termékeket, mint például ecetsavat, vagy glicerint. Hátránya viszont, hogy sok idő alatt (3–4 nap), alacsony hőmérsékleti tartományban (maximum 35 °C) képes csak fermentálni. Az etanol fermentációs kísérleteimhez tehát szárított fajélesztőt (*Saccharomices cerevisiae* (Hefix 1000), valamint Unikén Borélesztőt és Aro sütőélesztőt alkalmaztam. Az Unikén speciális borélesztő alkoholos erjesztésre használatos aktív szárított élesztő, amely grammonként legalább 15 milliárd élő élesztősejtet tartalmaz.

Ez a bórlesztő a természetből szelektált *Saccharomyces cerevisiae*. Általában a gyors erjedésindításhoz és az erős stressz toleranciára szelektálják, ugyanis a gyors erjedés indítás segít az élesztős és a baktériumos befertőződés megelőzésében és az alkohol kihozatalát is javítja. Az Aro sűtőlesztő szintén szárított formában tartalmazza a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgombát. Az élesztőtenyésztet beoltása előtt aerob előfermentációt is végeztem.

A 100 cm³ fermentlé és desztillált víz 50 – 50%-os keverékéhez adagoltam az 5 g szárított fajlesztőt, *Saccharomices cerevisiae*-t (Hefix 1000) és 5 g élesztőtápsót (Vitamon Combi: DAP+B-vitamin). Az élesztőt 30 °C-on 30 percig szaporítottam, majd ezután a fermentorban lévő fermentlevet a szaporított fajlesztővel oltottam be és ezt követően állandó keverés mellett 35 °C-on 168-336 óráig fermentáltam.

A minták pH értékét minden alkalommal a 4, illetve 24 óránkénti mintavételezésnél ellenőriztem és a szakirodalomban található, valamint a gyártó által meghatározott 4,5, illetve 5-ös optimum szinten tartottam, így pontosan nyomon tudtam követni a cellulóz lebontását (Horn et al., 2011, Horn et al., 2012). A kevertetés fordulatszámát a fermentlé térfogatától függően határoztam meg 20–150 RPM között.

3.2.5. Alkohol tartalom meghatározása desztillációval

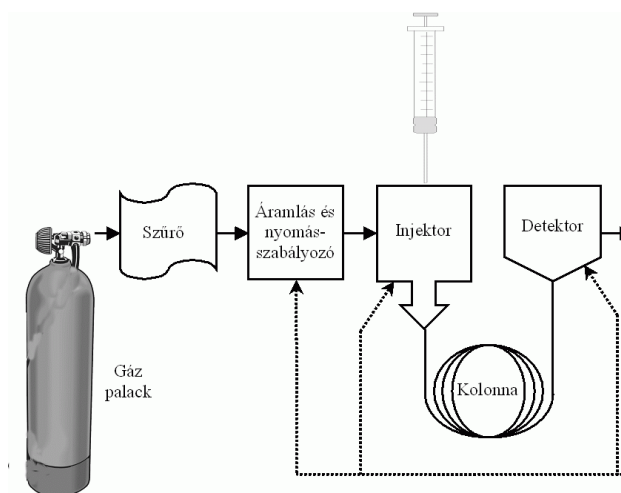
A hidrolízis során nyert fermentlé alkoholtartalmának meghatározásához kétféle módszert alkalmaztam. Az egyik módszerként egy laboratóriumi desztilláló egységet használtam (14. ábra), amely rektifikáló oszlopból, Liebig-hűtőből, egy 500 ml-es lombikból és a desztillátum visszahűtésére szolgáló spirálhűtőből állt. Az alkohol desztilláció után kapott desztillátumot szobahőmérsékletre visszahűtöttem és az alkoholtartalmát egy belső etilalkohol-kalibrációval rendelkező Refracto 30GS típusú refraktométerrel (Mettler Toledo, Svájc) határoztam meg.



14. ábra: Laboratóriumi desztilláló egység (Forrás: saját készítés)

3.2.6. Gázkromatográfiával történő etanol meghatározás

A fermentlevek alkoholtartalmát másik módszerként gázkromatográfiás eljárással (GC) határoztam meg, DANI Master, Restek gyártmányú készülékkel (15. ábra). A célom az volt, hogy a kromatográfia álló és mozgó fázisa segítségével komponenseire bontsam a vizsgálandó mintát. A GC stabilwax kolonnával rendelkezett, amely 30 m hosszúságú, átmérője 0,25 mm, valamint 0,5 μm filmréteg vastagságú. A kísérletekhez hidrogént használtam vivőgázként.



15. ábra: GC sematikus ábrázolása

(Forrás: <http://ttk.pte.hu/analitika/letoltesek/jegyzet/ch07s02.html>)

A GC mérési paraméterei az alábbiak voltak: injektor hőmérséklet 200 °C; lángionizációs detektor hőmérséklete 225 °C; 1 μl centrifugált minta. Különböző százalékos (5%; 1%; 0,1%; 0,05%) etanol oldatokkal kalibrációs egyenest készítettem, a pontos etanol koncentráció meghatározásához. Fermentációt követően a fermentlevet minden esetben egy 200 μm -es szövetszűrőn átszűrtem, a fermentáció során esetlegesen visszamaradó rostok eltávolítása érdekében.

A gázkromatográf szoftverének, az etanol csúchoz tartozó területérték (x) [$\text{mV} \cdot \text{s}$], valamint a kalibrációs egyenes egyenletének (18) segítségével határoztam meg az etanol koncentrációt (19), ahol y az oldat koncentrációja [mol/dm^3].

$$y = 107291 \cdot x + 0 \quad (18)$$

$$V/V \% \text{ etanol} = \frac{A_{\text{csúcs}}}{107291} \quad (19)$$

3.2.7. Membránszeparációs eljárások

A membránszeparációt az enzim visszanyerésének és visszaforgatásának céljából alkalmaztam feltételezve, hogy így gazdaságilag kedvezőbbé tehető az eljárás. A kísérleteim során ultraszűrést alkalmaztam, mivel ebbe a mérettartományba esnek a fehérjék és a célom az volt, hogy a fermentlében lévő enzimeket elválasszam a keletkezett cukortól. Az általam használt membránokat és tulajdonságait az 3. táblázatban foglaltam össze.

3. táblázat: Alkalmazott membránok jellemzői

<i>Membrán</i>	<i>Forgalmazó</i>	<i>Szubsztrát</i>	<i>Maximális nyomás [bar]</i>	<i>Pórusméret [g/mol]</i>	<i>Maximális hőmérséklet [°C]</i>	<i>pH</i>	<i>Membrán felszíne [m²]</i>
Vékonyréteg (Thin Film – TF)	Koch	cukorrépa pellet	10-35	4,000 Da	60	2-11	0,004534
Poliéterszulfon (PES)	Steriltech	cukorrépa pellet, cukorrépa szelet, dohány	7-17	5,000 Da	90	2-12	
		dohány	3-14	7,000 Da	90	2-12	
		dohány	2-10	50,000 Da	90	1-14	

A szeparációs mérési folyamatok során a membrán két legjellemzőbb értéke a szelektivitás és az áteresztőképesség, azaz más néven fluxus.

A fluxus (J) érték az a mennyiség, amely megmutatja, hogy egységnyi felületen (A) egységnyi idő (dt) alatt mennyi permeátum (V) áramlik át, amit az 20. összefüggés alapján számoltam ki.

$$J = \frac{V}{A \cdot dt} \quad \left[\frac{L}{m^2 \cdot h} \right] \quad (20)$$

A membrán ellenállás (R_M) értékeinek meghatározásához az alábbi összefüggést alkalmaztam (21), ahol J_{dv} a desztillált víz fluxusa, η_{dv} a szűrt anyag viszkozitás [Pas], Δp az ultraszűrés során a membrán két oldala között alkalmazott nyomáskülönbség [Pas] (Li et al., 2008):

$$R_M = \frac{\Delta p}{J_{dv} \eta_{dv}} \quad [m^{-1}] \quad (21)$$

Az eltömődési ellenállásokat (R_F) az alábbi képlettel határoztam meg (Li et al., 2008):

$$R_F = \frac{\Delta p}{J_{dvA} \eta_{dv}} - R_M \quad [m^{-1}] \quad (22)$$

ahol J_{dvA} a szűrést követően mérhető vízfluxus értéke a membrán felületének lemosását követően.

R_p a koncentráció polarizáció okozta ellenállás, amit a következő egyenlettel számoltam ki, ahol R_T az összes ellenállás, R_F az eltömődési ellenállás és R_M a membrán ellenállás:

$$R_p = R_T - (R_F + R_M) \quad [m^{-1}] \quad (23)$$

Így tehát a teljes ellenállásba beleszámít természetesen a membrán ellenállása (R_M), a koncentráció-polarizáció (R_p), illetve az eltömődés okozta ellenállás (R_F) is. Az összes szűrési ellenállást (R_T) tehát a (24) alapján határoztam meg: (Li et al., 2008).

$$R_T = \frac{\Delta p}{J_{dv} \eta_{dv}} \quad [m^{-1}] \quad (24)$$

A besűrítési arány, mint műveleti paraméter kiszámítása (VRR – Volume Reduction Ratio), az alábbi összefüggéssel történt (25):

$$VRR = \frac{V_{Betáp.}}{V_{Konc.}} \quad (25)$$

ahol,

$V_{Betáp.}$: Betáplált oldat térfogata [m^3]

$V_{Konc.}$: Koncentrátum térfogata [m^3]

A membrán felülete és a fluxus együttesen határozzák meg a műveleti áramok nagyságát, viszonyát. Az áramok közötti arányt százalékban fejezzük ki, ami pedig megmutatja, a betáplált anyag és a szűrlet mennyiségi viszonyát. Így ebből adódóan a membrán szeparációs művelet anyagmérlege:

$$\begin{aligned} q_m &= q_p + q_{konc} \\ q_m c_{be} &= q_p c_p + q_{konc} c_{konc} \end{aligned} \quad (26)$$

ahol, q_m a tömegáram, c a választott komponens koncentrációja, c_p a permeátumban mért koncentráció, c_{be} a betáplálási oldalon mért koncentráció, c_{konc} a koncentrátumban mért koncentráció (Field, 2012).

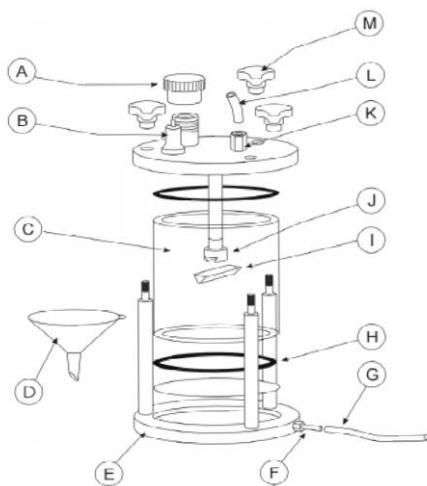
Membrán szeparációs eljárással vizsgáltam az enzim visszanyerés lehetőségét. A koncentrációkból a fehérje visszatartást (R) a (27) összefüggés segítségével határoztam meg, amely megmutatja, hogy a betáplálási áramban található célkomponens koncentrációjának

(C_{feed}) mekkora hányadát sikerült a betáplálási oldalon tartani, vagyis mekkora %-ban került a permeátumba ($C_{permeátum}$). Értékét tehát %-ban is megadhatjuk.

$$R = \left(1 - \frac{C_{permeátum}}{C_{feed}}\right) \cdot 100 \quad [\%] \quad (27)$$

R a fehérje visszatartás [%], a $C_{permeátum}$ a szűrlet fehérje koncentrációja, C_{feed} pedig a betáplált minta fehérje koncentrációját jelenti (Abadi et al., 2011).

Az ultraszűrést egy szakaszos laboratóriumi membránszűrő berendezéssel (MEUF - Micellar Enhanced Ultrafiltration) (Millipore, USA, 2002) végeztem (16. ábra). A szűrések során ultrahangos erőtér létrehozásával, a membránkészülékhez épített ultrahangkészülékkel (UP 100 H Ultrasonic processor, Hielscher, Germany) is vizsgáltam a szűrések hatékonyságát (17. ábra). A membránszűrő készülék fedőlapjában lévő mintaadagoló nyílás helyére egy acélperselyt tettem, amelybe az ultrahangkészülék szonárját helyeztem bele és 60%-os amplitúdóval működtettem a készüléket. A fermentlé cukorkoncentrációjával megegyező modell oldatot is készítettem glükózból, így lehetőségem volt a fermentlével párhuzamos, összehasonlító mérések elvégzésére is. Az ultraszűréshez az alábbi paramétereket alkalmaztam: 3,5 bar transzmembrán nyomás, 350 RPM fordulatszám, és 60% amplitúdó. Betáplált fermentlé mennyisége 100 cm^3 volt.



16. ábra: Membránszűrő berendezés sematikus ábrája (Forrás: User Guide, Solvent Resistant Stirred Cells, 2002)



17. ábra: Membránszűrő berendezés ultrahangkészülékkel (Forrás: saját kép)

A – záró kupak, B – biztonsági szelep, C – boroszilikát üveg henger palást, D – tölsér, E – saválló acél készülék ház, F – permeátum kivezető csomak, G – permeátum kivezető cső, H – o-gyűrű, I – mágneses keverőbot, J – keverőszár, tengely, K – pneumatikus csatlakozó, L – pneumatikus cső, M – rögzítő csavarok (User Guide, Solvent Resistant Stirred Cells, 2002).

3.2.8. Fehérjetartalom meghatározása

A fehérjetartalom meghatározását Kjeldahl-féle roncsolásos módszerrel végeztem (KJLETEC TM2300) (18. ábra). A roncsolás tömény kénsavas közegben történt 380 °C és 410 °C körüli hőmérsékleten, forráspontnövelő só (K_2SO_4) és az oxidáció reakciósebességét növelő (Cu) katalizátor jelenlétében. A vizsgálandó mintákból 2 cm³-t a Kjeldahl csőbe tettem, majd hozzáadtam 2 darab katalizátor (Cu) tablettát, valamint 14 cm³ tömény kénsavat. A roncsolási idő 90 percig tartott, 410 °C-on. Lehűtést követően a Kjeldahl-féle fehérje meghatározó készülék kalkulálta ki a minták fehérjetartalmát (*P*%) úgy, hogy a nitrogéntartalmat (*N*%) egy állandó szorzófaktorral (növényeknél 5,7) megszorozta.



18. ábra : Kjeldahl elven működő roncsoló berendezés (Forrás: saját kép)

3.2.9. Enzim aktivitás mérése

A szeparált enzim aktivitásának ellenőrzése céljából un. szűrőpapír tesztet hajtottam végre, amivel bizonyítani tudtam az enzimek újrahasznosíthatóságát. Az enzim aktivitás vizsgálathoz apróra darabolt cellulóz alapanyagú szűrőpapírt használtam szubsztrátként. A koncentrátumban maradt enzimet tartalmazó frakcióhoz (45 cm³) adagoltam a 0,5 g összedarabolt, cellulóz alapú szűrőpapírt (Milipore UF). A lebontást 50 °C és pH 5,0 mellett hajtottam végre, folyamatos kevertetéssel. Óránkénti mintavételezéssel követtem nyomon a cukortartalom növekedést.

3.2.10. Kísérlettervezés

A kísérlettervezés (Design of experiment - DOE) a kísérletek optimalizálásához szolgáló hatékony eljárás, amely a kísérletek megtervezéséhez és elemzéséhez nyújt segítséget, valamint a mérési folyamat része. Általában minden kísérletnél egy (klasszikus kísérlet) vagy akár több változót, illetve faktort változtatunk meg, hogy ezek együttes hatását nyomon tudjuk követni. A kísérlettervezés célja, hogy anyag, energia, költség és idő megtakarítással a lehető legtöbb információhoz juthassunk, valamint lehetővé teszi valós és objektív konklúziók levonását (Rajkó et al., 2001). A cukorrépa pellet, illetve a dohány minták esetében a fermentációhoz szükséges enzim mennyiségeket faktoriális kísérletterv, valamint gradiensterv alapján határoztam meg, Box-Wilson kísérlettervezési módszer segítségével. Ennek a módszernek az alapgondolata az, hogy az egymás után végrehajtott egyszerű kísérletsorozatokból meg lehessen állapítani, hogy a faktorszintek milyen irányú módosítása visz közelebb az optimális beállításhoz. Az egyes kísérletsorozatokban mindig minden faktorszintet egyidejűleg kell változtatni. Mivel az optimumot keressük, ami a legmeredekebb lejtés, ezért a gradiens irányában kell keresni. Így ezt a módszert gradiens módszernek/tervnek is nevezik. Ezzel a kísérlettervezési módszerrel jelentős idő- és költségmegtakarítást érhetünk el (Box et al., 1951).

Kísérleteim során a cukorrépa pellet esetében alapvetően két mennyiségi faktort változtattam, a bemért pellet szemcseméretét (mm) valamint a celluláz (CLA)/cellobiáz (CLB) enzim arányt ($\mu\text{L/L}$), amit mindkét enzim mennyiségének változtatásával állítottam be. A pontos értékeket a 4. táblázatban foglaltam össze.

4. táblázat: Cukorrépa pellet kísérleti paraméterei, faktoriális kísérlettervvel meghatározva

Bemért darált pellet szemcsemérete (mm)	Bemért celluláz (CLA) enzim mennyisége ($\mu\text{L/L}$)	Bemért cellobiáz (CLB) enzim mennyisége ($\mu\text{L/L}$)
1,0	100	250
0,20	200	300
0,63	350	250
0,315	100	100
0,80	200	300
0,50	250	300
0,40	350	250
0,25	250	350

A dohány minták enzimes hidrolíziséhez az 5. táblázatban szereplő kísérletterv alapján meghatározott enzimmennyiségeket használtam fel.

5. táblázat: Faktoriális kísérletterv az enzimkoncentráció meghatározásához KD és MD minták esetében

<i>Dohány minták</i>	<i>Celluláz [cm^3]</i>	<i>Cellobiáz [cm^3]</i>
1	0,35	0,35
2	0,35	0,45
3	0,45	0,35
4	0,45	0,45

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az Anyagok és módszerek fejezetben részletesen bemutatott, négy különböző alapanyag minta (cukorrépaszelet, cukorrépa pellet, dohány, nyírfa apríték) cukrosításából származó, és/vagy etanollá történő alakításának eredményeit, ebben a fejezetben a minták szerint csoportosítva mutatom be.

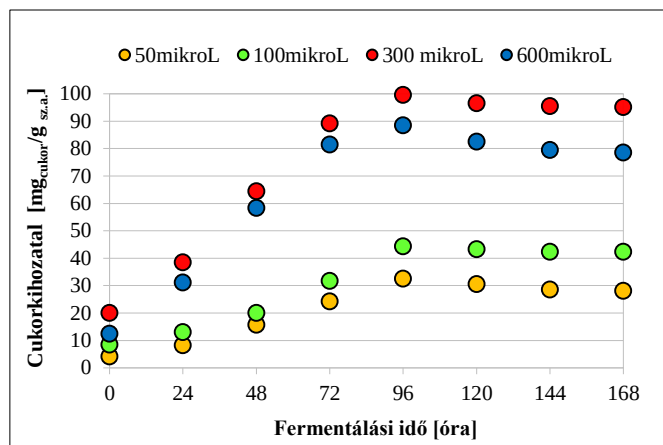
4.1. Cukorrépaszelet

A cukorrépaszelet a cukorgyártás mellékterméke, a diffuzőrökből kikerülve a rendkívül magas víz- és maradék cukortartalma miatt igen körültekintő eljárást igényel, viszont a cukortartalma mellett a részben feltárt cellulóztartalma miatt is rendkívül ígéretes másodgenerációs bioüzemanyag alapként szolgálhat.

4.1.1. Cukrosítási eljárás

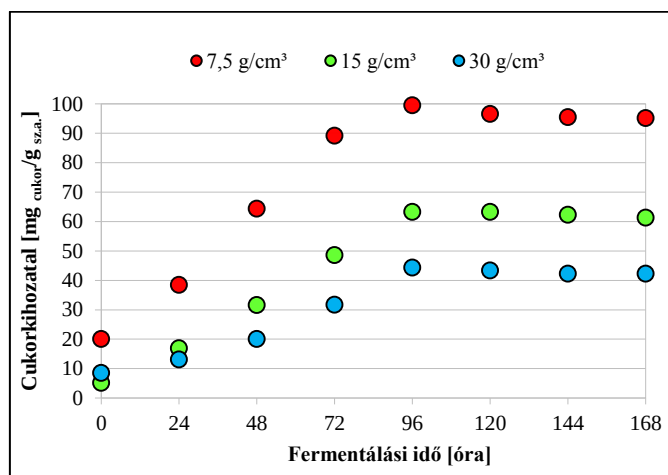
A kísérletek első sorozatában azt vizsgáltam meg, hogy az enzimatisztikus feltárás során mennyi cukor szabadul fel, vagyis melyik kezelés bizonyul a cellulóz bontás szempontjából a leghatásosabbnak, előkezelések nélkül. A cukorkihozatal értékeit a kapott fermentlevekben mérhető cukortartalomból egységnyi szárazanyagtömegre vonatkoztatva adtam meg.

Különböző enzimkoncentrációk (50; 100; 300 és 600 μL) hatását vizsgáltam a redukáló cukorkihozatalra, 7,5 g/cm³ szubsztrát koncentráció mellett, amelyet a 19. ábrán mutatok be. Az ábrán jól látható, hogy intenzív cukortermelődés a 300 μL -es enzimkoncentrációnál mutatkozott, a különböző kísérleti beállítások mellett az enzimmennyiség további növelése pedig nem hozott szignifikáns növekedést. A fermentlé összes térfogata 85 cm³ volt.



19. ábra: Az celluláz/cellobiáz enzimkoncentrációk (50; 100; 300; 600 µL) hatása a cukorkihozatalra (7,5 g/cm³ szubsztrát koncentráció; pH 5; T=45 °C)

További vizsgálatokat tehát a 300 µL-es enzimkoncentrációval végeztem, és meghatároztam, hogy ehhez az enzimmennyiséghez mekkora az ideális szubsztrát koncentráció; 7,5; 15 és 30 g/cm³ (20. ábra).



20. ábra: A szubsztrát koncentrációk (7,5; 15; 30 g/cm³) hatása a cukorkihozatalra (300 µL/L celluláz/cellobiáz enzimkoncentráció; pH 5; T=45 °C)

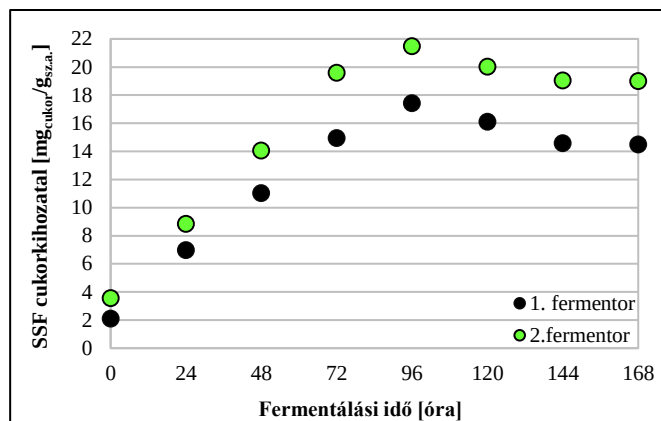
A 300 µL-es enzimkoncentrációhoz a 7,5 g/cm³ koncentrációjú szuszpenzió bizonyult a legmegfelelőbbnek a cukorkihozatal szempontjából, mint ahogyan a 20. ábrán is jól látszik, azonban az ennél töményebb szuszpenzióknál a mérési eredményeim alapján már csökkenő cukorkihozatali értékeket tapasztaltam.

Az optimális enzim/szubsztrát arány meghatározása nagyon fontos az enzim, illetve az egész folyamat hatékony működése céljából. A cukorrépaszelet esetében tehát elmondható, hogy az ideális enzimkoncentrációnak a 300 $\mu\text{l/L}$, valamint ideális szubsztrát koncentrációnak a 7,5 g/cm^3 tekinthető. Kísérleteim alapján egyértelműen látható az is, hogy a lebontást a 96. óra után már nem célszerű folytatni, minden kísérleti beállításnál itt jelentkezett a telítési függvény maximum értéke. Ezt követően a termelődött cukor mennyisége szignifikánsan nem változott.

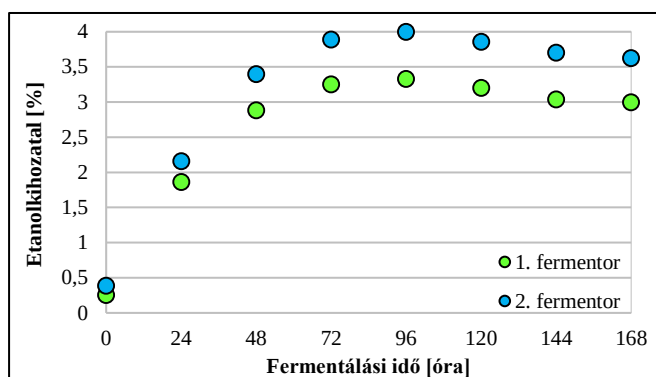
4.1.2. Szimultán cukrosítás és fermentációs kísérletek

A cellulóz alapú melléktermékekből történő alkohol előállítás ígéretes módszere a szimultán cukrosítás és fermentáció (SSF), szemben a hagyományos, elkülönített hidrolízist követő fermentációval (SHF). Az SSF kísérlet meghatározó paramétereit László et al., (2007) közleményére alapozva, az alkalmazott enzimek hőmérséklet és pH tűrésének megfelelő értékeknek választottam. A laboratóriumi fermentáló berendezésbe épített hőmérsékletérzékelő, elektrokémiai szenzorok, valamint szabályozóegységek segítségével az SSF biodegradációs folyamat teljes ideje alatt a pH-t ($\text{pH}=5$), a hőmérsékletet ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) és a keverési fordulatszámot (150 min^{-1}) állandó értéken tudtam tartani. Ennél a mérési sorozatnál a fermentlé összes térfogata 1000 cm^3 volt.

A 21. ábrán mutatom be a cukorkihozatali értékeket SSF fermentáció esetében 300 $\mu\text{l/L}$ enzim és 7,5 g/cm^3 szubsztrát koncentrációkkal. A mért adatok átlagértékét véve: 17,4 mg és 21,4 mg cukor értéket kaptam 1 gramm szárazanyagra vonatkoztatva. Természetesen ez a cukortartalom érték messze alatta marad az előző SHF elrendezésű beállításnál mért eredménynek, hiszen ez a fermentlé már tartalmazta a szaporított fajélesztő törzset (*Saccharomyces cerevisiae*) is, amit fermentoronként különböző térfogatban (25 cm^3 és 35 cm^3) adagoltam a rendszerhez, az etanol kihozatalának meghatározása céljából. Az 1. fermentorhoz tehát 35 cm^3 fajélesztőt, a 2. fermentléhez pedig 25 cm^3 fajélesztőt adagoltam, és a 21. valamint a 22. ábrák együttes értékeléséből látható, hogy mind a cukor-, mind pedig az etanol koncentráció magasabb értékeket mutatott, a kevesebb élesztőt tartalmazó minták esetében.



21. ábra: SSF hatása a cukorkihozatalra meghatározott paraméterekkel
 (7,5 g/cm³ szubsztrát; 300 µl/L celluláz/cellobiáz enzimkoncentráció; T=30 °C; pH 5)
 (1. fermentor: 35 cm³ szaporított fajélesztő/ 1000 cm³ fermentlé
 2. fermentor: 25 cm³ szaporított fajélesztő/ 1000 cm³ fermentlé)



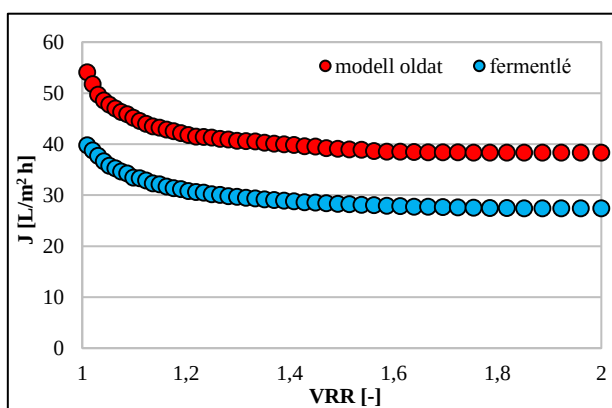
22. ábra: Etanol kihozatal [%]
 (1. fermentor: 35 cm³ szaporított fajélesztő/ 1000 cm³ fermentlé
 2. fermentor: 25 cm³ szaporított fajélesztő/ 1000 cm³ fermentlé)

A maximális etanol kihozatal 72 - 96 óra alatt érhető el ebben az esetben. Jól látszik, hogy ezzel a módszerrel elért cefre etanol kihozatala nem túl magas, maximum 3-4%, ami ebben a formában gazdaságossági szempontból nem megfelelő egy desztillációs etanol elválasztáshoz.

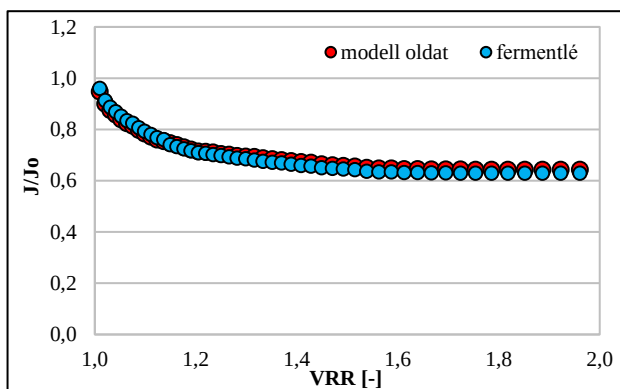
4.1.3. Membránszűrés alkalmazása az enzimvisszanyerés céljából

Enzimes kísérleteim fontos célja az is volt, hogy megvizsgáljam az enzim visszanyerésének és visszaforgatásának lehetőségét, ami gazdaságilag kedvezőbbé tehetné az eljárást, természetesen abban az esetben, ha az enzim meg tudja tartani az aktivitását. A lehetséges elválasztási technikák közül a membránszűrési eljárások, ezen belül pedig, az elválasztandó komponensek molekulatömege miatt az ultraszűrés a legmegfelelőbb választás, mert itt az alkalmazott membrán a cukor komponenseket átengedi, de a fehérje frakciókat visszatartja a membrán leválasztási értékének nagyságából adódóan (5 kDa PES membrán).

A szétválasztási kísérleteket mind egy modell oldat, azaz csak az enzimeket tartalmazó oldat, mind pedig a valós alapanyaggal végzett enzimes hidrolízis során kapott fermentlével is elvégeztem (23. ábra). A modell oldat csak az enzimet tartalmazza, ezért a fluxus értékek sokkal nagyobbak, mint a valós fermentlé estében, ahol a fermentáció összes ismert és ismeretlen komponense is jelen van, még az ultraszűrést megelőző centrifugálás ellenére is, ahol csak a szilárd halmazállapotú alkotókat választottuk le. A két minta megfelelőségét, a relatív fluxusértéknek (J/J_0), azaz a kezdeti értékhez viszonyított fluxusértékeknek a besűrítési arány (VRR) függvényében ábrázolt kapcsolatából láthatjuk (24. ábra).



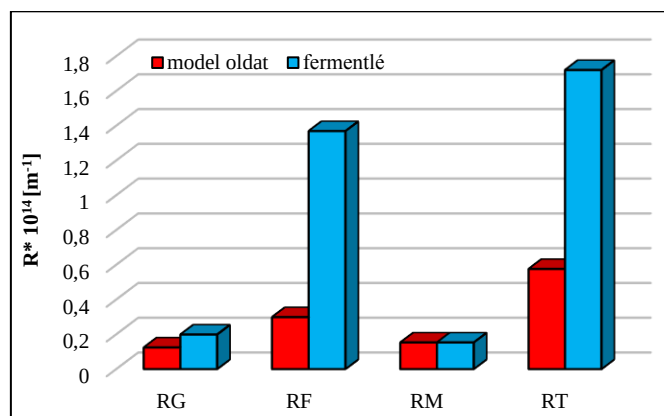
23. ábra: 5 kDa PES membránon szűrt modell oldat és cukorrépaszelet-fermentlé fluxus értékei



24. ábra: 5 kDa PES membránon szűrt modell oldat és fermentlé relatív szűrlet fluxus értékei

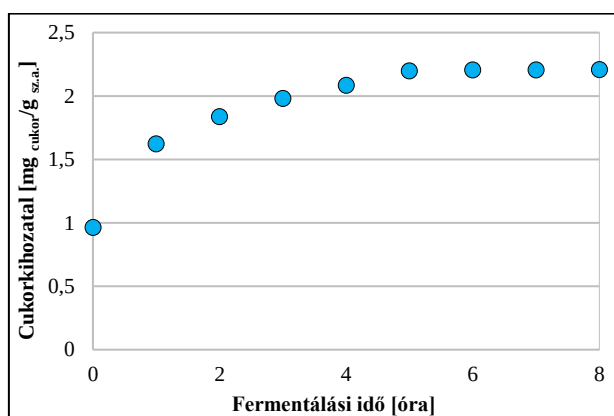
A relatív szűrlet fluxus (J/J_0) értékek a két minta esetében teljesen egybeesnek a besűrítési arány függvényében, ami egyértelműen arra utal, hogy a modell oldat valóban jól jellemzi a valós fermentlevet, és azt is, hogy a fluxusváltozást meghatározó komponens mindkét mintában megegyezik.

A minták összetételbeli különbözőségét a részletes ellenállásértékek mutatják meg. A fermentlé lényegesen nagyobb teljes ellenállása értelemszerűen adódik a benne lévő több komponensből, melyek túlnyomó többsége méréseink szerint a membrán vágási értékével megegyező mérettartományba esik (25. ábra). Ezt bizonyítja az eltömődési (R_F) ellenállás megemelkedett értéke, míg a membrán felületén kialakuló réteg (R_G) ellenállása csak nagyon kismértékben növekedett.



25. ábra: 5 kDa PES membránon szűrt modell oldat és cukorrépaszelet fermentlé ellenállás értékei

Az enzim ismételt felhasználhatóságára kiváló bizonyíték a 26 ábra, ahol a koncentrátum fázist alkalmaztam az enzimaktivitás mérésre leggyakrabban alkalmazott szűrőpapír tesztben történő cellulózbontáshoz.



26. ábra: Enzimaktivitás mérése szűrőpapírtesztel, 5 kDa PES membrán esetében

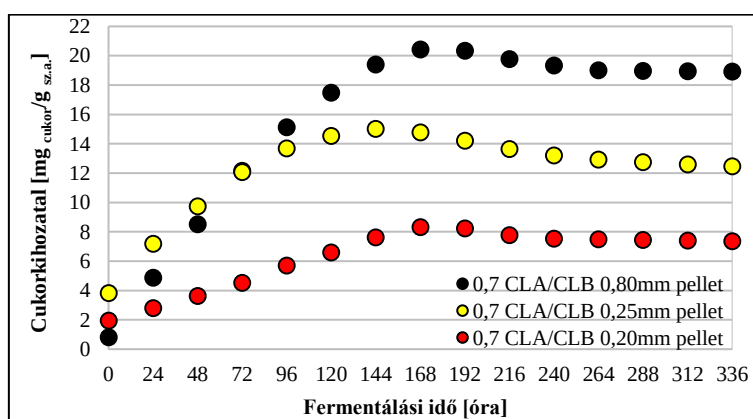
A klasszikus szűrőpapír módszeres enzimaktivitás mérés eredménye azt mutatja, hogy az enzimes hidrolízisnél már felhasznált, membrán szeparációval leválasztott enzimek nem veszítették el aktivitásukat, tehát ismételten alkalmazhatók a lebontási folyamatban, jelentősen csökkentve ezzel a hidrolízis, így az egész folyamat költségeit.

4.2. Cukorrépa pellet

A cukrosítási, illetve az SSF vizsgáltok kísérleti paramétereinek pontos meghatározásához a cukorrépa pellet esetében is Box-Wilson kísérlettervezési módszert alkalmaztam (4. táblázat). A kísérletterv elsődleges célja a szubsztrát (cukorrépa pellett) aprítottsági fokának és az alkalmazott enzimek egymáshoz viszonyított arányának meghatározása volt.

4.2.1. Pellet méret, enzim arány meghatározása cukrosításnál

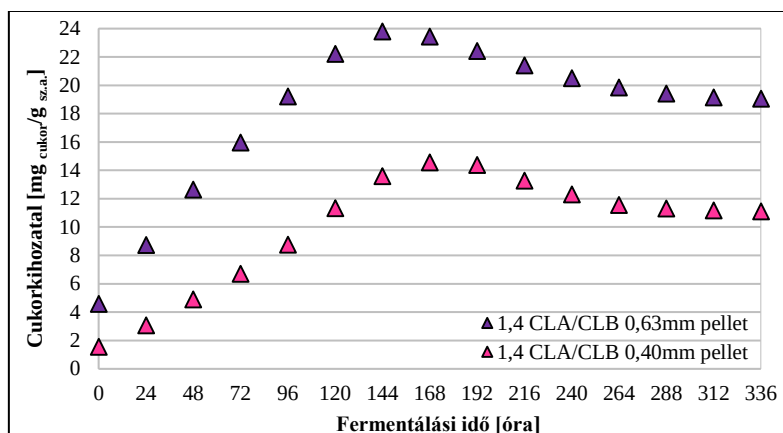
A kísérleti terv alapján beállított cukrosítási mintákból 24 óránként történt a mintavétel, ezzel folyamatosan nyomon tudtam követni az enzimes lebontás folyamatát, és így a méréseknél egy teljes jelleggörbét kaptam nem csak egy végső cukor tartalmat. A mérések jellemző eredményeit a 27 - 30. ábrákon mutatom be. Első példaként a 0,7 CLA/CLB enzimarány mellett, eltérő (0,80 mm; 0,25 mm és a 0,20 mm) szemcseátmérőjű pellet frakcióknál mért cukor koncentrációváltozást mutatom be a 27. ábrán. Itt jól látszik, hogy a nagyobb szemcseméretű frakciók esetében nagyobb a cukorkihozatal, és ezt a nem várt tendenciát kaptam más enzimarány, más konkrét szubsztrát méret esetében is (28. ábra). Feltételezhetően a kisebb méretű, hosszabb idejű aprításnak kitett szemcséknél a lokálisan jelentkező, akár igen jelentős hőfejlődés által előidézett fizikai-, kémiai változások, megváltoztatják a minták makroszkópikus viselkedését, pl. a szuszpendálthatóságot, az aldóz-ketóz arányt.



27. ábra: Cukorrépa pellet frakciók enzimes lebontás
(0,7 CLA/CLAB arány; 30 °C; pH 4,5)

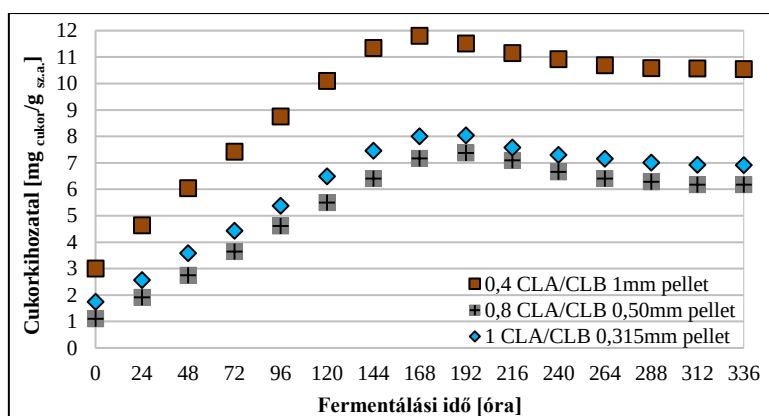
Jól látható a 27. és a 28. ábrákon továbbá az is, hogy a cukor kihozatali értékek a 168. óráig folyamatosan növekvő tendenciát mutatnak, majd ezt követően csökken a cukortermelődés, illetve egy stagnáló szakaszt vesz fel a rendszer.

A 28. ábrán az 1,4 CLA/CLB enzimarányok hatását mutatom be a 0,63 és a 0,40 mm-es szemcseméretű frakcióknál. A két ábrán a jellemző tendenciák teljesen megegyeznek.



28. ábra: Cukorrépa pellet frakciók enzimes lebontás
(1,4 CLA/CLAB arány; 30 °C; pH 4,5)

A 29. ábrán bemutatott értékek és tendenciák is mindenben, az előzőekben tett megállapításoknak felelnek meg, azaz az 1 mm-es szemcse átmérő, vagyis a legnagyobb méretű minta mutatja a legnagyobb cukorkihozattal.

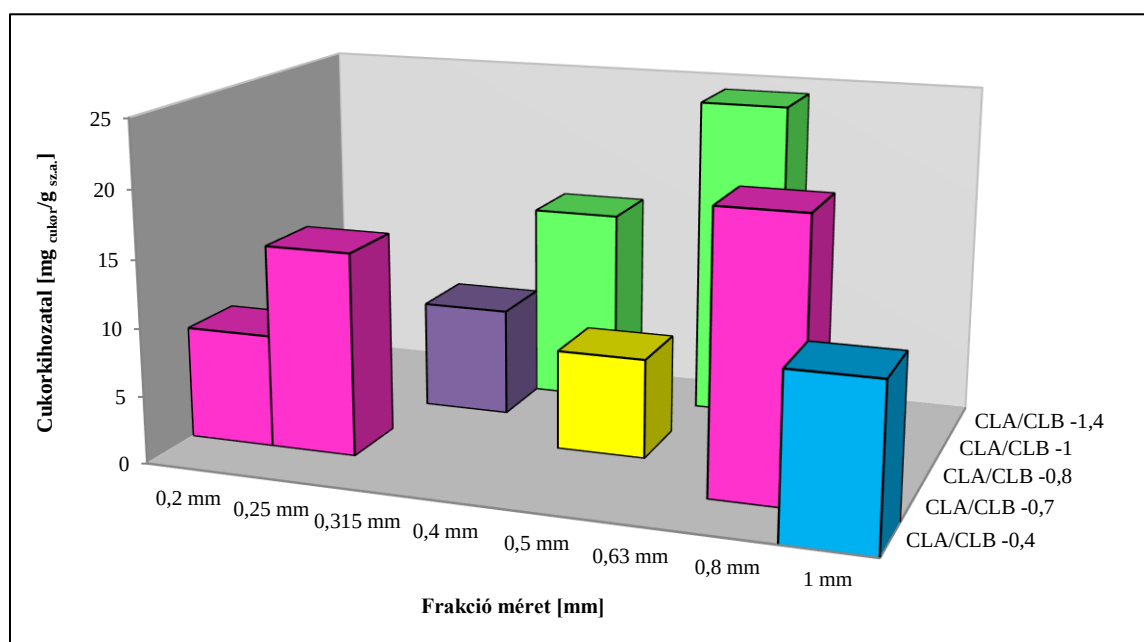


29. ábra: Cukorrépa pellet frakciók enzimes lebontás
(0,4; 0,8; 1,0 CLA/CLAB arány; 30 °C; pH 4,5)

A leghatékonyabb enzim összetételt az enzimek mennyiségének illetve arányának változtatásával kívántam meghatározni, hiszen a technológiát így költségkímélőbbé, valamint gyorsabbá lehetne tenni, illetve egyben környezetbarát is lehetne az eljárás.

Mindezeket összevetve (30. ábra) megállapítható tehát, hogy a kisebb frakció méreteknél nincs számottevőbb hatással az enzimarány a cukorkihozatalra, de az egyre növekvő szemcseátmérő adott enzimarányok mellett nagyobb kihozatalt eredményez.

Bizonyítottak látszik tehát a pellet méretének és az alkalmazott enzimek arányának együttes, egymást erősítő hatása, amelyeket a 6. táblázatban foglaltam össze. A Box-Wilson kísérletterv felhasználásával elvégzett két faktorszintű méréseim alapján tehát az ideális legnagyobb szemcseméretnek a 0,63 mm tekinthető, a nagyobb szemcseméretetek már kisebb kihozatalt eredményeznek akár megegyező enzimarány mellett is. Ez egy nem várt tendencia ugyan, de számos nemzetközi publikáció számol be a mechanikai előkezelés (aprítás, őrlés) által okozott minőségi változásokról, ami változások nagy jelentőséggel bírnak, ugyanis őrlés hatására akár több, mint 90-95 °C-os lokális hőmérséklet emelkedés is előfordulhat, ami jelentős minőségi változást okozhat (Karam et al., 2016). Ghodki et al. (2016) szintén vizsgálta, hogy milyen hatással van az aprítás a feketebors szemcseméretére, illetve fizikai, kémiai tulajdonságaira, és jelentős szignifikáns változásokat mutatott ki, pl. a szín tekintetében.



30. ábra: Pellet méret, valamint az alkalmazott enzim arány (CLA/CLB) hatása a termelődött maximális cukor mennyiségére

6. táblázat: Cukorrépa pellet maximális cukorkihozatal értékei adott enzimarány és szemcseméret mellett

<i>CLA/CLB enzimarány</i>	<i>Cukorrépa pellet szemcsemérete [mm]</i>	<i>Maximális cukorkihozatal [mg_{cukor}/g_{sz.a.}]</i>
1,4	0,63	23,788
1,4	0,40	14,550
1,0	0,315	8,036
0,8	0,50	7,370
0,7	0,80	20,421
0,7	0,25	15,019
0,7	0,20	8,316
0,4	1,00	11,804

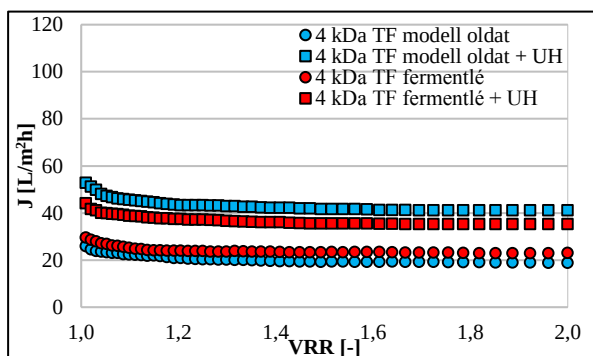
Az elvégzett és az ábrákon bemutatott függvényértékek elemzéséből a folytatáshoz, további kísérletsorozatomhoz, a mikrohullámú előkezeléshez tehát már a 0,63 mm-es szemcseméretet és az 1,4 CLA/CLB enzimarányt használtam, mert a pellet méretének valamint az alkalmazott enzimek összes mennyiségének és arányának a keletkező cukor mennyiségére gyakorolt hatása, ebben az esetben bizonyult a legmegfelelőbbnek.

4.2.2. Enzimek membránszeperációja

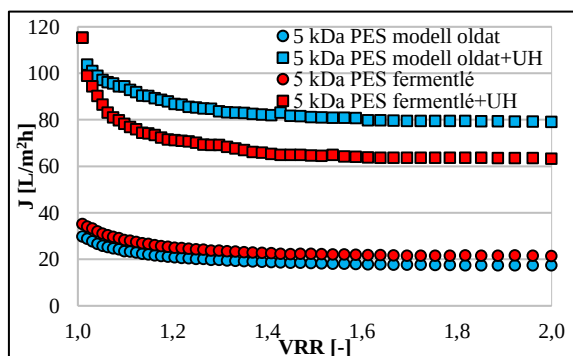
A cukorrépaszelet cellulóztartalmának enzimes lebontásánál tárgyaltnál hasonlóan (4.1.3 fejezet), a cukorrépa pellet cukrosításánál is megvizsgáltam az enzimvisszanyerés lehetőségét. Ám az ott is tapasztalt, a rendkívül alacsony fluxus értékek miatt (23. ábra), a szűrési intenzitást növelő eljárás alkalmazására kerestem lehetőséget. Számos nemzetközi publikáció számolt be az ultrahang ultraszűrésre gyakorolt hatásáról, mint például Kyllönen és mtrsi. (2005), akik az ultrahangnak a membrán eltömődés lecsökkentésére gyakorolt hatását vizsgálták. Az ultrahangos erőteret a szűrés betáplálási oldalán hoztam létre, amivel az volt a célom, hogy a membrán felületén kialakuló gél réteg ellenállást csökkenteni tudjam.

A szeperációs kísérleteimhez két különböző alapanyagú, de közel azonos vágási értékű (TF–thin film, vékonyréteg/4 kDa, PES–poliéterszulfon/5 kDa) membránt is alkalmaztam. Mindkét membrán esetében azt tapasztaltam, hogy az ultrahang használata nélkül a modell oldat és a fermentlé fluxus értékei között nincs szignifikáns különbség. Az ultrahang erőter alkalmazása során viszont megfigyelhető, hogy az ultrahang által keltett kavitáció hatására lényegesen nagyobb fluxus értékeket kaptam mindkét membránnál, mind a modell oldat, mind pedig a fermentlé minták esetében.

Mivel összetételét tekintve a fermentlé több és többféle méretű molekulát tartalmaz, különösen a membrán vágási értékéhez közeli mérettartományban, így az ultrahangos erőter alkalmazása a modell oldat esetében jelentősebb pozitív hatással bír a fluxus értékre. A 31. és a 32. ábrán mutatom be a modell oldat és a fermentlé fluxus (J) változásait a sűrítési arány függvényében (VRR), ultrahang használata nélküli és ultrahanggal kombinált méréseknél, TF és PES membránok esetében.

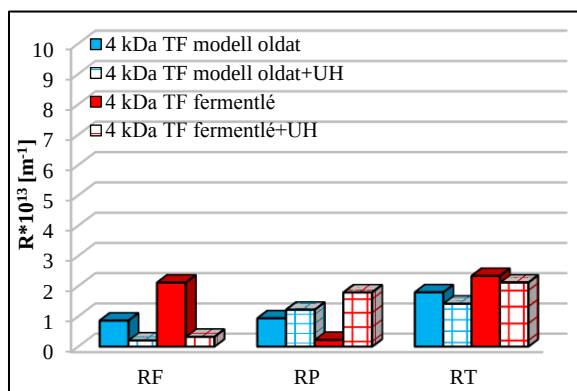


31. ábra: 4 kDa TF membránon szűrt modell oldat és fermentlé fluxus értékei normál és ultrahangos erőter alkalmazása során

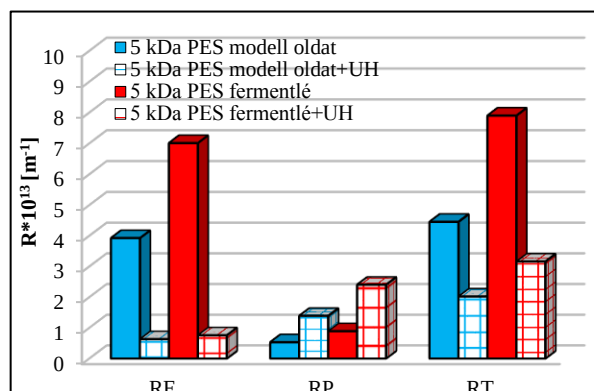


32. ábra: 5 kDa PES membránon szűrt modell oldat és fermentlé fluxus értékei normál és ultrahangos erőter alkalmazása során

A membránellenállások értékeit a 33. és 34. ábrákon mutatom be normál és ultrahang erőter alkalmazása során (R_M - membrán ellenállás; R_F – eltömődési ellenállás; R_P – polarizációs ellenállás és R_T – összes ellenállás). A 33. és a 34. ábrákon jól látható, hogy ultrahang használata nélkül, mind a modell oldat, mind a fermentlé esetében az eltömődési ellenállás (R_F) volt a jelentősebb a polarizációs/gélréteg (R_P) ellenállásához képest. Ultrahang hatására azonban az arány megváltozott, és az eltömődési ellenállás nagymértékben csökkent, a koncentráció polarizáció okozta ellenállás (R_P) mindkét membrán esetében változó mértékben, de megnövekedett, ám összességében a teljes ellenállás értéke kisebb lett. Mindez azzal magyarázható, hogy az ultrahang által, közvetlenül a membrán felszínén keltett kavitáció hatására a pórusméretnél kisebb alkotók vagy átpréselődtek a membrán kapillárisain, vagy visszaáramoltak a főáram irányába, megnövelve ezzel a membrán felületén képződő gél réteg vastagságát. Mindkét membránál ugyan ez a tendencia figyelhető meg, de a kisebb vágási értékű, kompaktabb szerkezetű teflon membrán esetében kevésbé látványosan tolódtak el az arányok, kisebb mértékben csökkent csak a teljes ellenállás nagysága. Az ultrahang erőter magát a membránt, annak szerkezetét és integritását nem befolyásolta.



33. ábra: 4 kDa TF (vékonyréteg) membránon szűrt modell oldat és fermentlé ellenállás értékei normál és ultrahangos erőter alkalmazása során

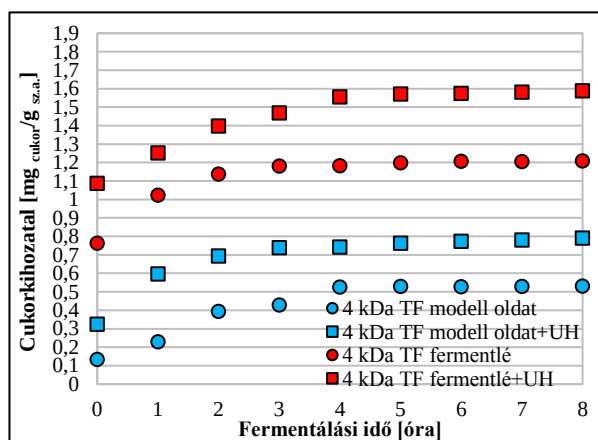


34. ábra: 5 kDa PES (poliétterszulfon) membránon szűrt modell oldat és fermentlé ellenállás értékei normál és ultrahangos erőter alkalmazása során

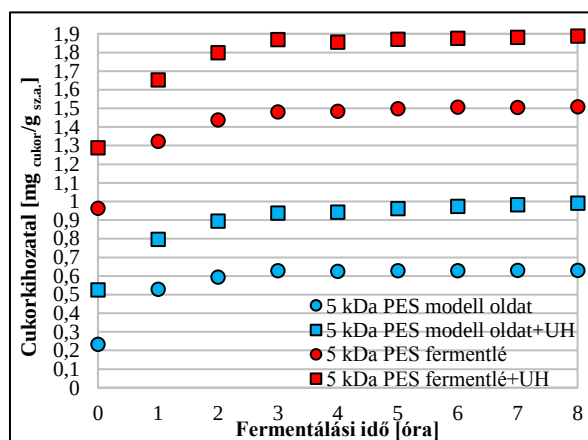
4.2.3. Enzimhasznosíthatóság

Ahhoz, hogy az egész eljárást gazdaságosabbá tudjam tenni, fontos szempontnak tartottam megvizsgálni azt, hogy az alkalmazott enzimek újrahasznosíthatók-e? A kérdés ismételt felvetését az indokolja, hogy a membrán szeparáció mellett az ultrahang alkalmazása is megjelent, ami rendkívül jelentős energiabevitelt jelent, melynek hatására megváltozhat az enzimek szerkezete, a kofaktorok térbeli rajzolata, ami működésük megszűnését jelentené.

Ehhez ezúttal is a klasszikus szűrőpapír tesztet végeztem el annak megállapítására, hogy az aktivitásukat az ultraszűrést követően milyen mértékben tudják megtartani a koncentrátumban maradt enzimek. A 35. és 36. ábrákon mutatom be, hogy bár eltérő mértékben, de tapasztalható cukortartalom növekedés mindkét membránon történő szeparációt követően.



35. ábra: Visszanyert enzimmel végzett cellulózbontás 4 kDa TF membrán esetében



36. ábra: Visszanyert enzimmel végzett cellulózbontás 5 kDa PES membrán esetében

A mérések során azt tapasztaltam, hogy az ultrahangos erőternek kitett enzimek esetében nem csökkent, sőt intenzívebb volt a cellulózbontás, mint ultrahang használata nélkül. A cukorkihozatal maximuma a 3. illetve a 4. órában volt jelentős, ezután már nincs szignifikáns változás, telítési értéket vett fel a görbe.

4.3. Dohány növény

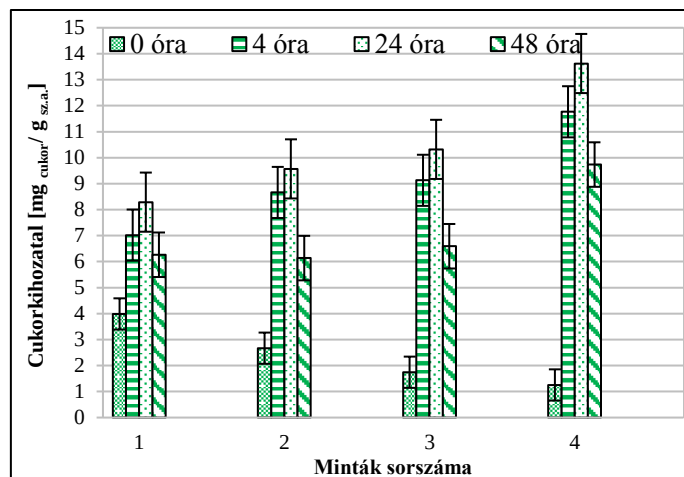
A dohány növény esetében kétféle mintát vizsgáltam. Az egyik az ún. kísérleti dohány (KD), ami a növény szárát és a leveleit tartalmazta, a másik pedig a melléktermék dohány (MD), ami a dohányipari célokra termesztett növény felhasználása után maradt melléktermék, leginkább szármaradékot tartalmazott.

Az MD és KD minták vizsgálata esetében, mechanikai előkezelést, aprítást is alkalmaztam kutter segítségével, így az aprított minták mérete 1-2 cm, míg a nem aprított minták mérete 4-5 cm volt. Ennél a kísérlet sorozatomnál is faktoriális kísérlettervvel, illetve gradiens tervvel határoztam meg a mérésekhez szükséges optimális paramétereket Box-Wilson módszer segítségével, valamint ebben az esetben a celluláz és cellobiáz enzimek mellett xilanáz enzimmel is végeztem összehasonlító kísérleteket.

4.3.1. Kísérleti- és melléktermék dohány enzimes lebontása

A melléktermék- (MD) és kísérleti dohány (KD) minták enzimes lebontása során összehasonlításként, az aprítás nélküli és az aprított minták lebontását is megvizsgáltam. A kísérleti paraméterek megegyeztek mindkettő esetben. Ennél a kísérletsorozatnál már a faktoriális kísérlettervvel meghatározott enzimkoncentrációkat alkalmaztam, amelyeket az Anyagok és Módszerek fejezetben található 5. táblázatban foglaltam össze.

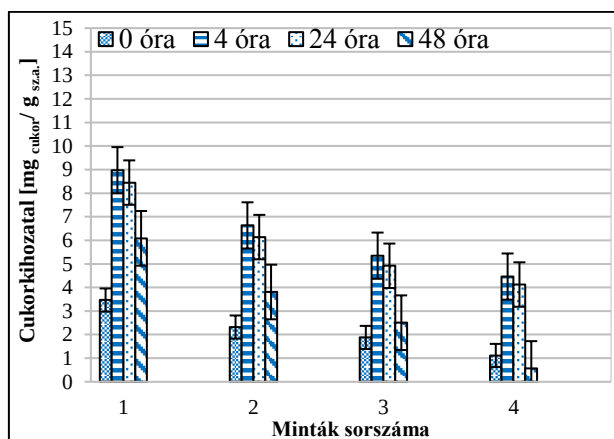
A KD minta esetében azt tapasztaltam (37. ábra), hogy a 24 órás lebontási idő volt a legmegfelelőbb a cukorkihozatal szempontjából ($13,623 \text{ mg}_{\text{cukor}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$), amikor a CLA és CLB enzimeket azonos mennyiségben adagoltam a fermentléhez.



37. ábra: Aprítás nélküli KD minta enzimes lebontása (50 °C; pH 5; 4 g MD minta)

Az MD minták cukorkihozatal értékeit a 38. ábrán ábrázoltam, itt jól látható, hogy ebben az esetben már a 4 órás lebontási idő is elegendő a cukortermelés szempontjából. Az MD minták esetében kevesebb volt a maximális cukorkihozatal értéke (8,973 mg_{cukor}/g_{sz.a.}) a KD mintákéhoz képest (13,623 mg_{cukor}/g_{sz.a.}).

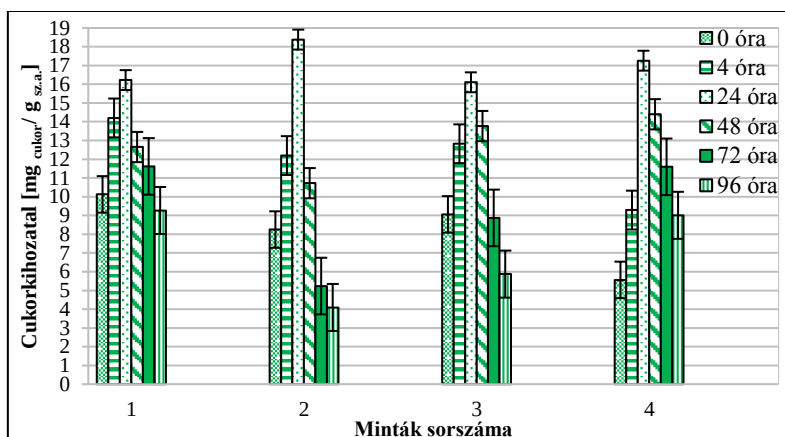
A faktoriális kísérlettervvel meghatározott CLA/CLB enzimarányok közül az 1. számú MD minta esetében a 0,35/0,35 cm³-es mennyiség volt a legmegfelelőbb.



38. ábra: Aprítás nélküli MD minta enzimes lebontása (50 °C; pH 5; 4 g MD minta)

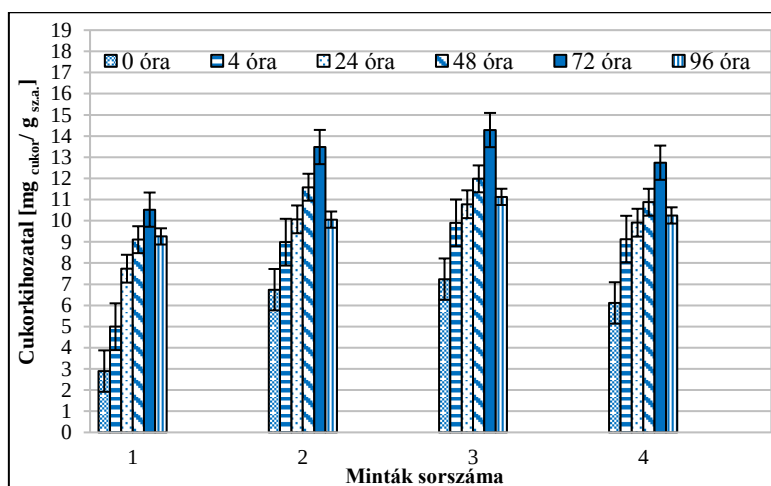
Az aprított MD és KD minták vizsgálata esetében, mechanikai előkezelést, aprítást alkalmaztam kutter segítségével. Az aprított minták mérete 1-2 cm, míg a nem aprított minták mérete 4-5 cm volt. A 39. ábrán mutatom be az aprított KD minták enzimes lebontását. Jól látható, hogy a nem aprított KD mintákhoz hasonlóan, ebben az esetben is a 24 órás fermentálási idő bizonyult a legmegfelelőbbnek.

Amíg a nem aprított minták esetében a maximális cukorkihozatal ($13,623 \text{ mg}_{\text{cukor}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$) a $0,45/0,45 \text{ cm}^3$ CLA/CLB enzimarány mellett volt, addig ebben az esetben a $0,35/0,45 \text{ cm}^3$ CLA/CLB enzimaránynál volt a leghatékonyabb a lebontás ($18,381 \text{ mg}_{\text{cukor}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$).



39. ábra: Aprított KD minta enzimes lebontása (50°C ; pH 5; 4 g KD minta)

Megvizsgáltam az aprított MD minták enzimes lebontását is, amit a 40. ábrán mutatok be. Ebben az esetben a maximális cukorkihozatalt ($14,283 \text{ mg}_{\text{cukor}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$) 72 órás lebontási időnél értem el, míg a nem aprított MD minták esetében már 4 óra alatt $8,973 \text{ mg}$ cukor termelődött.



40. ábra: Aprított MD minta enzimes lebontása (50°C ; pH 5; 4 g MD minta)

Az MD minták esetében az aprítás nélküli enzimes lebontásnál a 4 órás lebontási időnél, $0,35/0,35 \text{ cm}^3$ enzimkoncentráció mellett kaptam a maximális cukorkihozatalt ($8,283 \text{ mg}_{\text{cukor}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$). Ellenben az aprított mintáknál a 72 órás lebontási idő bizonyult a legjobbnak $0,45/0,35 \text{ cm}^3$ enzimkoncentráció mellett ($14,283 \text{ mg}_{\text{cukor}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$).

Az aprított mintáknál 1,6–szer több cukor termelődött, mint a nem aprított mintáknál, viszont ebben az esetben már 4 óra alatt elértem 8,973 mg cukorkihozatait. A 40. ábrán jól látható, hogy az aprított minták esetében is 4 óra alatt már 9,897 mg cukor termelődött, tehát nincs szignifikáns különbség az aprított és nem aprított minták 4 órás lebontása között.

Ha a gazdasági szempontokat is figyelembe vesszük, akkor az így kapott eredményekből tehát arra lehet következtetni, hogy az MD minták esetében, ahol leginkább a szár a meghatározó összetevő, a 4 órás lebontási idővel is már jelentős mennyiségű cukortermelődést lehet elérni, míg a KD minták esetében, ami a dohánylevél mellett lényegesen kevesebb szár maradékot is tartalmazott, a lebontáshoz szükséges idő 24 órának tekinthető.

4.3.2. Optimalizált enzimes lebontás

A gradiens tervvel az aprított és nem aprított dohány minták optimalizált enzimkoncentrációit a 7. és az 8. táblázatokban foglaltam össze. A kísérleti paraméterek ugyan azok voltak, mint a faktoriális kísérlettervnél használt paraméterek.

7. táblázat: Nem aprított dohány minták gradiens terv által meghatározott enzimkoncentrációi

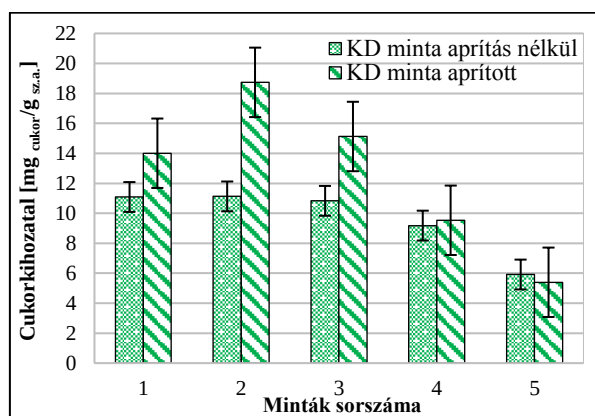
<i>Minták</i>	<i>KD</i>		<i>MD</i>	
	<i>CLA (cm³)</i>	<i>CLB (cm³)</i>	<i>CLA (cm³)</i>	<i>CLB (cm³)</i>
1	0,450	0,431	0,374	0,450
2	0,459	0,436	0,370	0,458
3	0,467	0,441	0,366	0,467
4	0,476	0,446	0,361	0,475
5	0,484	0,451	0,357	0,484

8. táblázat: Aprított dohány minták gradiens terv által meghatározott enzimkoncentrációi

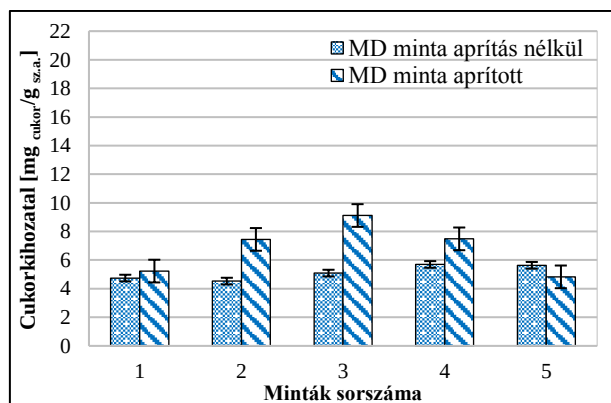
<i>Minták</i>	<i>KD</i>		<i>MD</i>	
	<i>CLA (cm³)</i>	<i>CLB (cm³)</i>	<i>CLA (cm³)</i>	<i>CLB (cm³)</i>
1	0,376	0,450	0,450	0,390
2	0,372	0,458	0,458	0,388
3	0,368	0,466	0,466	0,386
4	0,364	0,474	0,475	0,384
5	0,360	0,483	0,483	0,383

A faktoriális kísérlettervnél kapott eredményeimből kiindulva a gradiens tervvel meghatározott enzimes lebontási folyamatoknál már csak 24 órás mérést végeztem, az enzimkoncentrációk optimalizálása érdekében.

Összehasonlításként a 41. és a 42. ábrákon mutatom be az aprítás nélküli és az aprított KD minták (41. ábra) és az MD minták (42. ábra) lebontását. Így jól látható, hogy mindkettő dohány minta esetében a mechanikai előkezelés, az aprítás kedvező hatással volt a cukorkihozatal szempontjából. Az aprított KD minta esetében az optimalizált enzim mennyiséget a 2. számú mintánál kaptam ($18,737 \text{ mg}_{\text{cukor}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$), ahol a CLA/CLB enzimarány $0,372/0,458 \text{ cm}^3$ volt. A nem aprított KD minták esetében nem kaptam meghatározó enzim optimum értéket, itt nincs szignifikáns különbség a cukorkihozatal között.



41. ábra: Nem aprított és aprított KD minta enzimes lebontása gradiens tervvel (24 óra; 50 °C; pH 5; 4 g MD minta)



43. ábra: Nem aprított és aprított MD minta enzimes lebontása gradiens tervvel (24 óra; 50°C; pH 5; 4 g MD minta)

Az aprított MD minták esetében a 3. számú mintánál kaptam a gradiens terv által meghatározott optimális CLA/CLB enzim arány ($0,466/0,386 \text{ cm}^3$) értéket ($9,113 \text{ mg}_{\text{cukor}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$), amit a 42. ábrán szemléltetek. A nem aprított MD minták esetében szintén azt tapasztaltam, amit a nem aprított KD mintáknál, hogy nincs meghatározó enzim optimum érték és szignifikáns különbség sincs a cukorkihozatalok között.

Az ábrákból is jól látszik, hogy az aprított MD és KD minták esetében sikerült meghatározni az ideális enzimkoncentrációkat a gradiens terv segítségével. Így a további méréseimhez a gradiens tervnél is alkalmazott, 24 órára optimalizált enzim mennyiségeket használtam fel.

4.3.3. Szimultán cukrosítás és fermentáció

Az előző fejezetben gradiens terv által meghatározott optimális enzimkoncentrációkat alkalmaztam az SSF fermentációhoz. Ennél a kísérletnél már kétfajta élesztőt használtam, egy speciális borélesztőt és egy klasszikus sütőélesztőt. A 9. táblázatban foglaltam össze a kétfajta élesztőmennyiségeket (g) és az enzimkoncentrációkat (cm³).

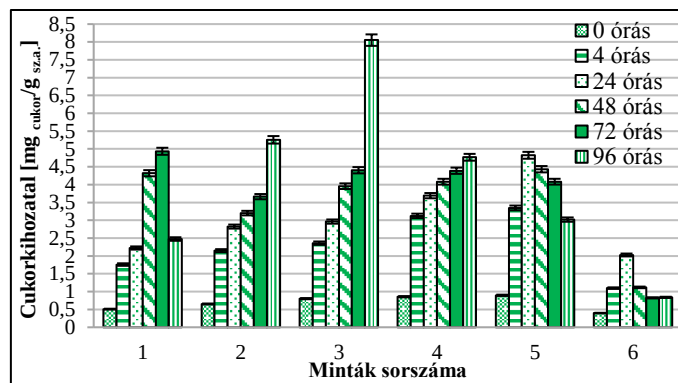
Az élesztőmennyiségek meghatározásánál figyelembe vettem a gyártó által megadott optimum mennyiségeket, amit a 2. és 5. mintáknál alkalmaztam, illetve készítettem egy-egy mintát a gyártó által meghatározott optimum alá eső (1. és 4. minták), illetve fölé eső (4. és 6. minták) élesztőmennyiséggel.

9. táblázat: SSF esetében használt élesztőmennyiségek és enzimkoncentrációk

<i>Minták</i>	<i>Borélesztő [g]</i>	<i>Sütőélesztő [g]</i>	<i>MD</i>		<i>KD</i>	
			<i>CLA [cm³]</i>	<i>CLB [cm³]</i>	<i>CLA [cm³]</i>	<i>CLB [cm³]</i>
1	0,01		0,466	0,386	0,372	0,458
2	0,05					
3	0,10					
4		0,01				
5		0,05				
6		0,10				

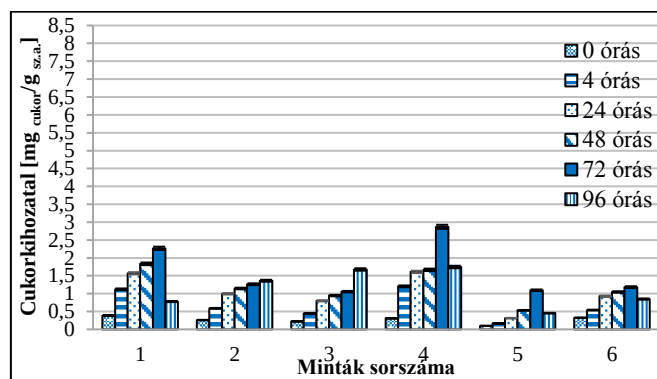
A fermentációt megelőzően ebben az esetben csak mechanikai előkezelést, aprítást alkalmaztam a dohány mintákon, mivel a gradiens terv által kapott optimális enzimkoncentrációval az aprított minták esetében kaptam nagyobb cukorkihozataalt.

A kísérleti paraméterek közül a hőmérsékletet 50 °C-ról 35 °C-ra változtattam meg, mert ennek a kétfajta élesztőnek az erjesztési hőmérséklettartománya maximum 35 °C.



43. ábra: SSF fermentáció KD mintáknál (4 g minta; 5 pH; 50 cm³ H₂O)

A KD és MD minták cukorkihozatal értékeit is az előző méréseimhez hasonlóan 24 óránként mértem meg, amit a 43. és a 44. ábrákon mutatok be.



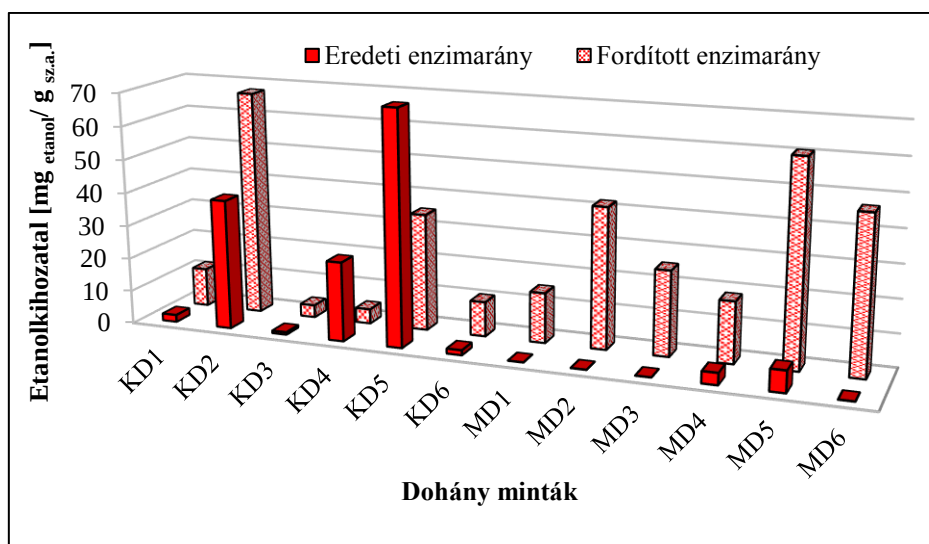
44. ábra: SSF fermentáció MD mintáknál (4 g minta; 5 pH; 50 cm³ H₂O)

A minták etanol tartalmát gázkromatográfiás méréssel határoztam meg. A 45. ábrán jól látszik, hogy mivel az eredeti enzimarány alkalmazása mellett az etanol kihozatal nem minden mintánál volt mérhető, ezért az enzimmennyiségek arányát megfordítottam, és így a minták lebontásánál alkalmazott exo- és endoglukanáz arányok megváltoztak (10. táblázat) és egyező kísérleti paraméterekkel, megismételtem a mérést.

10. táblázat: Eredeti és fordított enzimarányok KD és MD mintáknál

<i>Minták</i>	<i>Eredeti enzimarány</i>		<i>Fordított enzimarány</i>	
	<i>CLA [cm³]</i>	<i>CLB [cm³]</i>	<i>CLA [cm³]</i>	<i>CLB [cm³]</i>
<i>KD</i>	0,372	0,458	0,466	0,386
<i>MD</i>	0,466	0,386	0,372	0,458

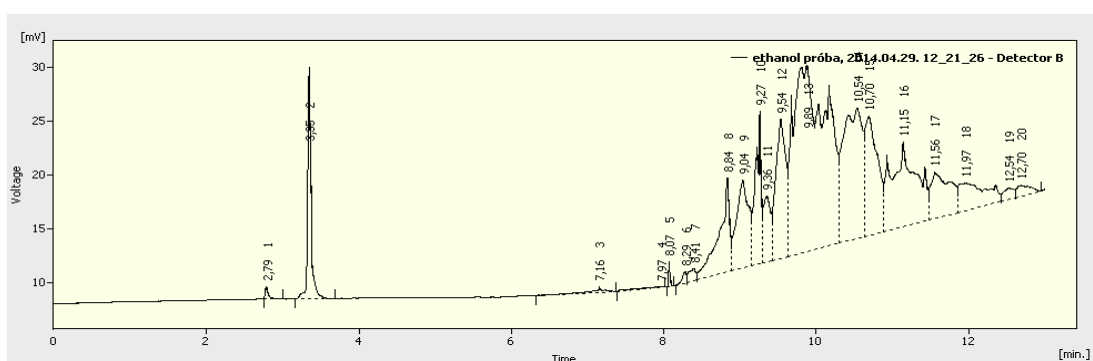
Az enzim arányok megváltoztatásával jól látszik a 45. ábrán, hogy majdnem minden esetben jobb etanol kihozatalt kaptam. A KD minták esetében a 2. és az 5. mintáknál értem el jelentősebb alkohol hozamot, ahol mindkettő élesztő (borélesztő, sütőélesztő) a gyártó által meghatározott optimális mennyiséget tartalmazta. A cukrosítási folyamatra optimalizált enzimmennyiség mellett a sütőélesztő használatakor (KD 5. minta) képződött maximális etanol kihozatal ($73,198 \text{ mg}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$), míg a fordított enzimaránynál a borélesztő alkalmazásakor (KD 2. minta) értem el jelentősebb alkohol hozamot ($67,513 \text{ mg}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$). Az MD minták esetében csak a fordított enzimaránnyal vizsgált mintáknál volt mérhető mennyiségű etanol. A borélesztő használatakor az MD 2. mintánál értem el a legjobb etanol kihozatalt ($42,073 \text{ mg}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$), míg a sütőélesztővel mért minták esetében az ötödik ($60,661 \text{ mg}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$) és a hatodik ($46,783 \text{ mg}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{sz.a.}}$) minta etanol hozama volt kiemelkedőbb. Összességében megállapítható, hogy optimális élesztő mennyiségnek vehető a gyártó által megadott élesztő mennyiség, ugyanis mindkettő dohány mintánál ennél a mennyiségnél ($0,05 \text{ g}$) kaptam a maximális etanol hozamot. A fordított enzimaránnyal való kísérlet leginkább az MD minták esetében mutatott jelentős változást az etanol kihozatal szempontjából, itt ugyanis csak a fordított enzimarány használatakor volt mérhető mennyiségű a termelődött etanol mennyisége.



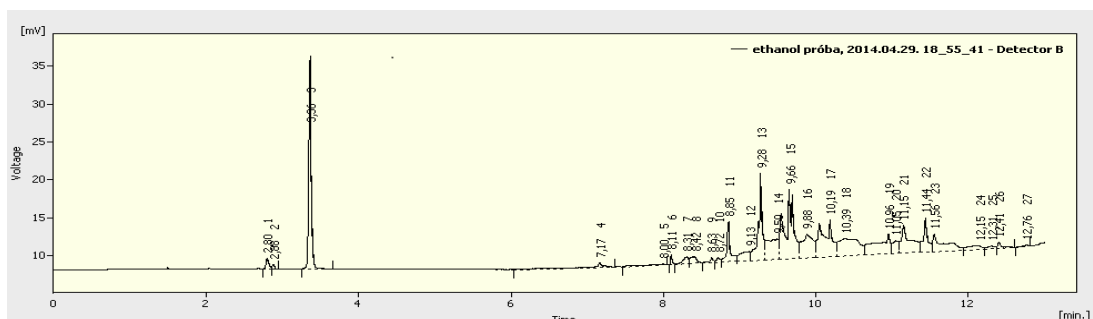
45. ábra: Kísérleti dohány (KD) és melléktermék dohány (MD) minták etanol kihozatala

Az etanol mennyiségek meghatározásához ebben az esetben gázkromatográfiás (GC) módszert alkalmaztam. A mérések során azt tapasztaltam, hogy a minták nagy részében a metanol is egy jól elkülöníthető csúcson megtalálható volt, de feltételezhető a propanol jelenléte is, viszont a propanol a kromatogram végén található több egymásba csúszott csúcs

miatt (ami valószínűleg a kolonna anyagainak folyamatos kopásából adódhat) nem produkál önálló, tisztán elkülöníthető csúcsot. A KD és MD minták kromatogramjai közül a két maximális etanol kihozatal értéket elért minták (KD 5. minta és MD 5. minta) kromatogramjait mutatom be a 46. és a 47. ábrán, ahol látható, hogy az etanolra minden esetben jól elkülöníthető csúcsot kaptam, a 13 perces folyamat során körülbelül 3,29 - 3,35 perc között. Az etanolhoz tartozó csúcs görbe alatti térfogatértékeiből, illetve a kalibrációs egyenes egyenletének (3), (4) a segítségével határoztam meg az etanol koncentrációkat, valamint ezen koncentrációk segítségével pedig az egy gramm szárazanyagra vonatkozó etanol kihozatalt kaptam meg mg-ban.



46. ábra: Eredeti enzimaránnyal kezelt KD 5. minta kromatogramja



47. ábra: Fordított enzimaránnyal kezelt MD 5. minta kromatogramja

4.3.4. Mikrohullámú előkezelésének hatása a cukorkihozatalra

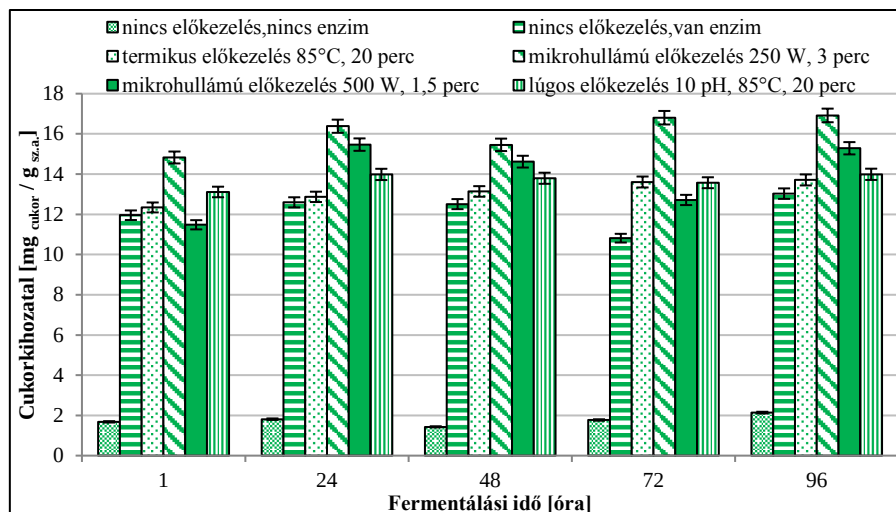
A mikrohullámú előkezelés hatását abból a szempontból vizsgáltam, hogy a MW hatása milyen módon befolyásolja az enzimes hidrolízis hatékonyságát, illetve a lignocellulóz szerkezet hozzáférhetőségét a dohány minták esetében. Összehasonlító, illetve kombinált méréseket is végeztem az Anyagok és módszerek fejezetben leírt más előkezelési eljárásokkal, amelyeket a 11. táblázatban foglaltam össze.

11. táblázat: Különböző típusú előkezelések MD és KD minták esetében

<i>Kezelés típusa</i>	<i>Kezelési hőmérséklet [C°]</i>	<i>Kezelési idő [perc]</i>	<i>Kezelési teljesítmény [W]</i>	<i>Kezelési pH</i>
Mikrohullámú		3	250	
Mikrohullámú		5	250	
Mikrohullámú		10	250	
Mikrohullámú		1,5	500	
Mikrohullámú		5	500	
Mikrohullámú		10	500	
Termikus	85	20		
Termikus	85	60		
Lúgos	85	20		10
Lúgos	85	60		10
Kombinált	85	30	250 (5 perc)	10
Kombinált	85	30	250 (10 perc)	10
Kombinált	85	30	500 (5 perc)	10
Kombinált	85	30	500 (10 perc)	10

A fenti táblázatban (11.) összefoglalt különböző előkezelések hatásait a glükóz kihozatalra a 49–52. ábrákon mutatom be. Két különböző kontrol mintát is vizsgáltam összehasonlításként, amit a 48. és az 49. ábrákon szemléltetek. Az egyik kontrol minta nem tartalmazott enzimet és nem kapott előkezelést sem, míg a másik minta már tartalmazott enzimet, viszont előkezelést nem kapott.

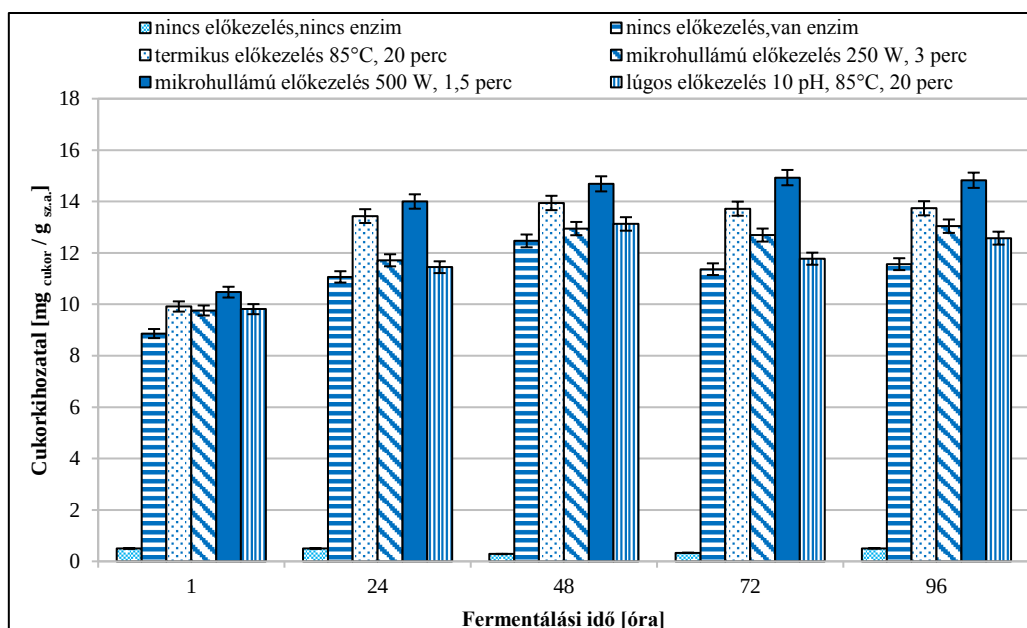
Az enzim és az előkezelés nélküli minta esetében kismértékű volt a glükóz termelés, maximum 2 mg cukor/g sz.a., ellenben az enzimet tartalmazó, de előkezelést nem kapott minták esetében már jelentősebb cukorkihozatalt értem el. A KD minták esetében jól látható (48. ábra), hogy az előkezelések közül a 250 W-on, 3 percig tartó mikrohullámú előkezelés, míg az MD minták esetében (49. ábra) az 500 W-on, 1,5 percig tartó kezelés bizonyult hatásosabbnak a cukorkihozatal szempontjából a termikus, illetve a lúgos előkezelésekkel szemben.



48. ábra: Különböző előkezelések hatása a cukorkihozatalra KD minták esetében

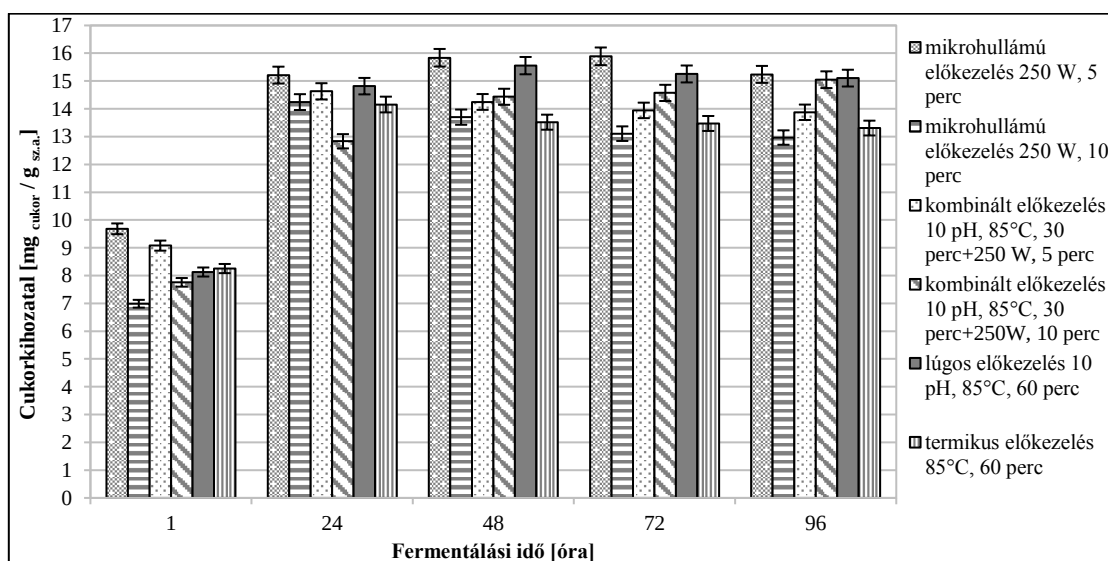
A KD minták esetében a cukorkihozatal szempontjából megállapítható, hogy szinte minden időintervallumban az MW előkezelés adta a legnagyobb cukorkihozataalt (48. ábra). Hasonlóan az MD minták esetében is az MW előkezeléssel kezelt minták adták a legnagyobb cukorkihozataalt (49. ábra), azonban ebben az esetben az MW kezelés mellett a termikus kezeléssel is jelentősebb mennyiségű cukortermelés figyelhető meg, de mivel szignifikáns különbség nincs a kétfajta előkezeléssel történt cukorkihozatalok között, így mindkettő dohány minta esetében megállapítható tehát, hogy a mikrohullámú előkezelés volt a hatásosabb. Megállapítható továbbá még, hogy habár a besugárzott energia (250 W – 3 perc; 500 W – 1,5 perc) egyenlő, de az alkalmazott teljesítményszint hatása eltérő. Ez az eltérés azzal magyarázható, hogy a minták eltérő kémiai összetétellel és fizikai szerkezettel rendelkeznek. A KD minták ugyanis az egész növény részeket tartalmazzák, mint a szár, levél és levélnyél, addig az MD minták sokkal komplexebb szerkezettel, magasabb lignin tartalommal, illetve kisebb fajlagos felülettel rendelkeznek, ami egyben a biokonverzióhoz való képesség csökkenését is eredményezheti.

Az előkezelést nem kapott mintákhoz képest a lúgos és termikus előkezelés is növelte ugyan az enzimes hidrolízis hatékonyságát, de ugyanakkora cukorkoncentrációt nem értek el, mint a mikrohullámú kezelés esetén.



49. ábra: Különböző előkezelések hatása a cukorkihozatalra MD minták esetében

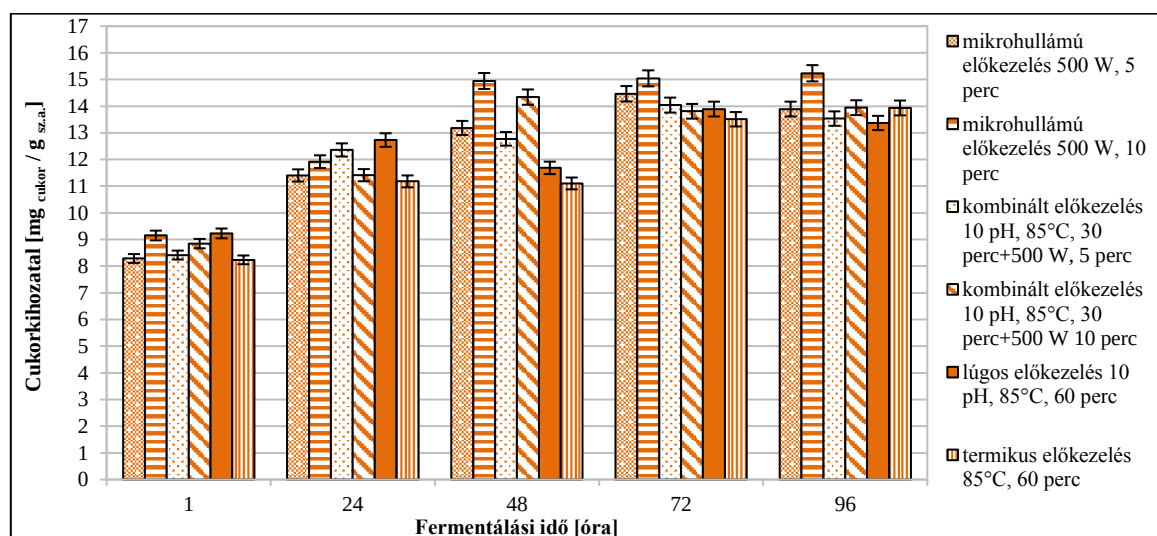
A különböző típusú előkezelések hatékonyságának megfigyelését követően kísérleteket végeztem hosszabb időtartamú mikrohullámú kezelésekkel, illetve kombinált kezelésekkel is, amelyeket az 50. és az 51. ábrákon mutatok be. Mivel a KD minták esetében a 250 W teljesítményű sugárzás volt a jobb, ezért a kombinált előkezeléseknél is a 250 W teljesítményt alkalmaztam, aminek a cukorkihozatal értékeit az 50. ábrán mutatom be. A lúgos és a termikus kezeléseket kombináltam a mikrohullámú kezeléssel. A kombinált méréseket megelőzően egy 5 és egy 10 perces mikrohullámú előkezelést is végeztem 250 W teljesítményen. Az 5 perces mikrohullámú előkezeléssel jobb cukorhozam értékeket kaptam, mint a 10 perces kezeléssel (50. ábra).



50. ábra: Kombinált előkezelések hatása a cukorkihozatalra KD minták esetében

Az MD minták kombinált előkezelési (51. ábra) vizsgálatánál szintén a mikrohullámú előkezelés bizonyult a legmegfelelőbbnek, de ebben az esetben a 10 perces kezelési idő, 500 W teljesítménynél mutatott maximális cukorhozamot (15,89 mg_{cukor}/g_{sz.a.}). Mivel ezek a minták arányaiban több vastagabb, azaz több ligninbe ágyazott cellulóz szálát tartalmaznak, mint a KD minták, ezért az MD minták esetében a cellulóz szálak fellazításához nagyobb sugárzási energia bevitelre van szükség, hogy az előkezelés hatásos lehessen a cukorkihozatal szempontjából.

Összességében megállapítható tehát, hogy a KD mintánál a maximális cukrosítási fokot a 250 W és 5 perces mikrohullámú kezeléssel lehetett elérni. A mikrohullámú és lúgos-termikus kezelések együttes alkalmazása a cukor kihozatali mutató további növekedését nem eredményezte, azonban az enzimes lebontási folyamathoz szükséges időt szinte a harmadára csökkentette le. A cukrosítás mértékében az enzimes hidrolízist megelőző különböző kezelések hatását tekintve megállapítható, hogy önmagában ezzel a mikrohullámú kezeléssel a maximális cellulózbomlás 61%-a elérhető volt enzim alkalmazása nélkül is.



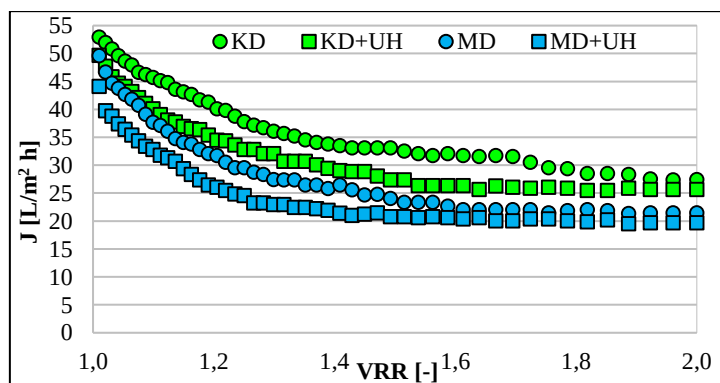
51. ábra: Kombinált előkezelések hatása a cukorkihozatalra MD minták esetében

Ha az előkezelések és az enzimes bontás utáni maximális cukor kihozatalt tekintjük, akkor látható, hogy nagy különbség nincs a két dohány típus között, azonban a maximális cukorbontáshoz szükséges idő általában magasabb és némely esetben a kihozatal is kicsit alacsonyabb, illetve az alkalmazott mikrohullámú kezelés is erőteljesebb az MD minták esetében. Ha csak az előkezelések hatását tekintjük, enzimes hidrolízis nélkül, akkor megállapítható, hogy a KD mintáknál jobb eredményt értem el.

4.3.5. Enzimvisszanyerés lehetősége dohány mintáknál

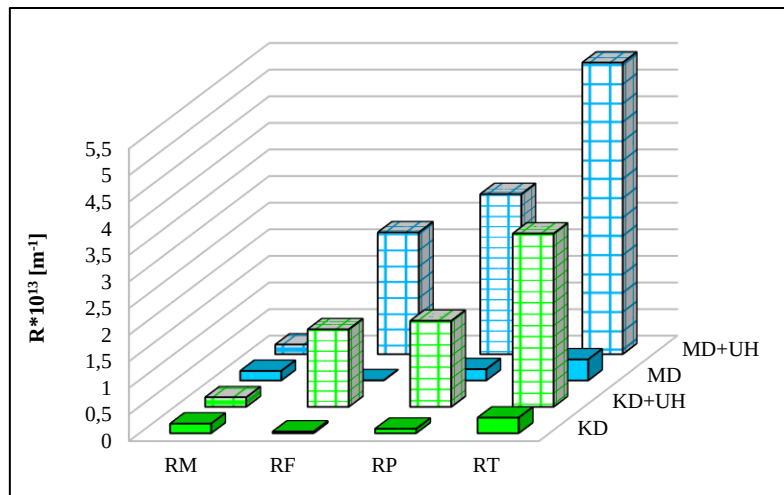
A dohány minták esetében is az ultraszűrést 5 kDa-os PES membránnal végeztem ultrahangos erőterben, illetve anélkül. Az 52. ábrán mutatom be a KD és MD minták ultrahangos (UH) és ultrahang nélküli fluxus diagramját.

A fluxus értékek növelése, illetve a gél réteg ellenállás csökkentése céljából, a szűrés betáplálási oldalán hoztam létre az ultrahangos erőteret. A várt eredmény az volt, hogy az ultrahang által keltett kavitáció hatására a fluxus értékek nagyobbak lesznek, azonban az elvárásaimnak ellenkező eredményeket kaptam, ugyanis az UH erőterben végrehajtott ultraszűrés fluxus értékei nem mutattak nagyobb értéket, mint az UH nélküli adatok, sőt kisebb értékeket kaptam. Jól látható továbbá még az ábrán, hogy a KD minták fluxus értékei jól elkülöníthetők egymástól, nagyobbak, mint az MD mintáké, UH erőterben is és anélkül is.



52. ábra: KD és MD minták fluxus értékei ultrahangos erőterben, illetve anélkül

Jól magyarázható tehát a fluxus értékek (52. ábra) változásánál tapasztalt tendencia az ellenállásokkal (53. ábra). Megfigyelhető, hogy az MD minták esetében a koncentráció polarizáció okozta ellenállás (R_p) szinte dupla akkora értéket vett fel, mint a KD minta esetében, ultrahangos erőter alkalmazásakor és anélkül is. Összességében tehát nagyobb összes ellenállás (R_T) tapasztalható az MD mintáknál.

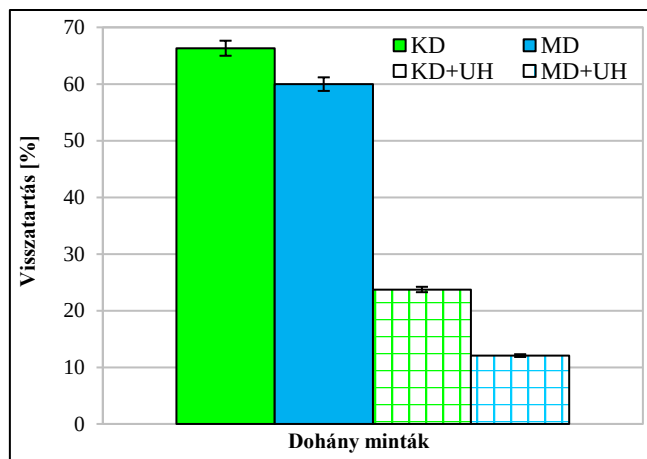


53. ábra: Ellenállás rétékek KD és MD mintáknál normál és ultrahangos erőterben (R_M - membrán ellenállás; R_F – eltömődési ellenállás; R_P – polarizációs ellenállás és R_T – összes ellenállás)

Ebből a megállapításból arra lehet következtetni, hogy a KD minták enzimes lebontásakor több, kisebb méretű fragmentum képződik, mint az MD minták esetében, így ezek a kisebb méretű részecskék könnyebben át tudnak jutni a membránon, mert teljesebb a lebontás, illetve valószínűsíthető az is, hogy esetleg a membrán pórusaiba kerülnek kiválasztásra és ez vezet az eltömődési (R_F) ellenállás megnövekedéséhez ultrahang használatakor. Jól látható továbbá az 53. ábrán az is, hogy az ultrahang használatakor minden esetben sokkal nagyobb mértékű volt az ellenállás, mint ultrahang használata nélkül.

Ez azzal magyarázható, hogy valószínűleg az ultrahang által keltett kavitáció hatására az aprított cellulóz szálak, illetve fragmentumok megnövelték a membrán felületén képződő gél réteg vastagságát, illetve az eltömődési ellenállás értékét is, valamint a nyomásnövekedés hatására a pórus méreténél nagyobb molekulák is el tudtak jutni a pórusokba. Ezzel a hatással magyarázható a jelentős eltömődési ellenállás (R_F) ultrahang használatakor. Mindez pedig abból következik, hogy a két dohány minta összetétele különbözik egymástól, mert az MD minták fajlagosan több cellulóz tartalmú rostot tartalmaznak, mint a KD minták.

Az 54. grafikonon ábrázoltam a KD és MD minták fehérje visszatartás értékeiket, normál és ultrahangos erőterben egyaránt. Jól látható, hogy az ultrahang használatakor mindkét dohány minta esetében kisebb volt a visszatartás, mint ultrahang használata nélkül. Az alkalmazott 5 kDa PES membrán pórusmérete, illetve a membrán felületén kialakuló gél réteg képes visszatartani a fehérjéket és az enzimeket, viszont a dohány minták esetében az ultrahang használata nem javított a visszatartáson.

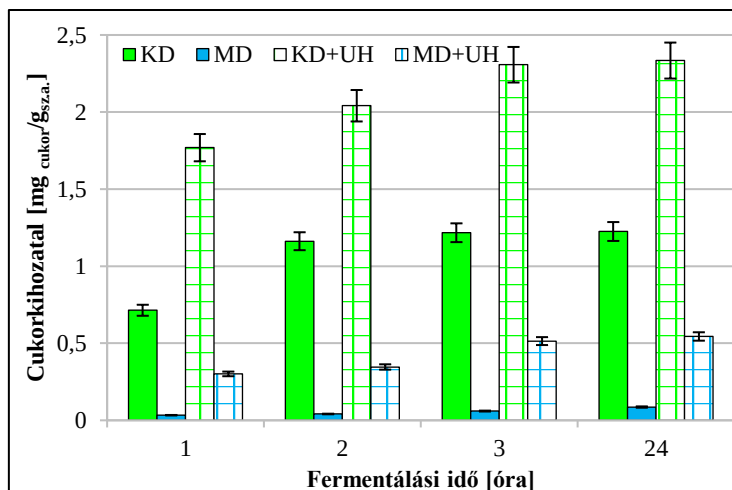


54. ábra: Dohány minták fehérje visszatartási értékei ultrahang használatakor és anélküli (KD - kísérleti dohány, MD - melléktermék dohány)

A KD és MD minták fehérjetartalmát az 12. táblázatban foglaltam össze. Látható, hogy a permeátumnál viszonylag magas volt a fehérje tartalom, ami abból adódhatott, hogy a fermentlében az enzimen kívül valószínűleg más fehérjék is találhatóak. A visszatartott frakció aktív enzimtartalmának meghatározásához alkalmaztam a szűrőpapír tesztet (55. ábra).

12. táblázat: Cukrosított dohány minta frakciók fehérje tartalmai

<i>Minták</i>	<i>Fehérjekoncentráció ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)</i>			<i>Relatív koncentráció (%)</i>		
	<i>koncen- trátum</i>	<i>betáplálás</i>	<i>permeátum</i>	<i>koncen- trátum</i>	<i>betáplálás</i>	<i>permeátum</i>
KD	18,3	14,2	73,3	148	100	50
KD+UH	21,7	19,6	16,5	111	100	84
MD	15,4	10,4	5,19	129	100	52
MD+UH	19,5	20,3	17,1	116	100	84



55. ábra: Visszanyert enzimmal végzett lebontás cukor kihozatali eredményei

Jól látható, hogy habár eltérő mértékben, de mindegyik minta esetében megfigyelhető cukortartalom növekedés. Amikor a koncentrátumot összehasonlításuképpen desztillált vízzel helyettesítettem, nem tapasztaltam cukorkoncentráció növekedést, így megállapítható, hogy eltérő mértékben ugyan, de az enzimek működő képesek maradtak a koncentrátumban.

A KD mintáknál ultrahang használatával és anélkül is majdnem kétszer nagyobb cukortermelést értem el az MD mintákhoz képest (55. ábra). Jól látszik továbbá még a kiindulási cukor értékekből az is, hogy az ultraszűrés során a cukor jelentős része átjutott a membránon, így a koncentrátumban már csak igen kis mennyiségben volt mérhető mennyiségben.

4.3.6. Xilanáz enzim hatásának vizsgálata dohány mintáknál

A celluláz-cellobiáz enzimkeverékek mellett összehasonlító méréseket végeztem xilanáz enzimmal (*Trichoderma longibrachiatum*) (Sigma-Aldrich) is. A nevét arról az enzimsopotról kapta, amely az endo-1,4- β -xilanáz lineáris poliszacharid láncokat bontja xilózzá, ezáltal a hemicellulóz rostok szétesésével könnyebben bontható lesz a növényi sejtfal, ugyanis a xilanáz katalizátorként működik a xilóz β -1,4 glikozidos kötés hidrolízisében. A xilanáz enzim használatával az volt a célom, hogy megvizsgáljam milyen mértékben képes ez az enzim a cellulóz bontásra, illetve a maximális cukorkihozatal eléréséhez mi az optimális enzim mennyiség (Jinguang et al., 2011, Li et al., 2015).

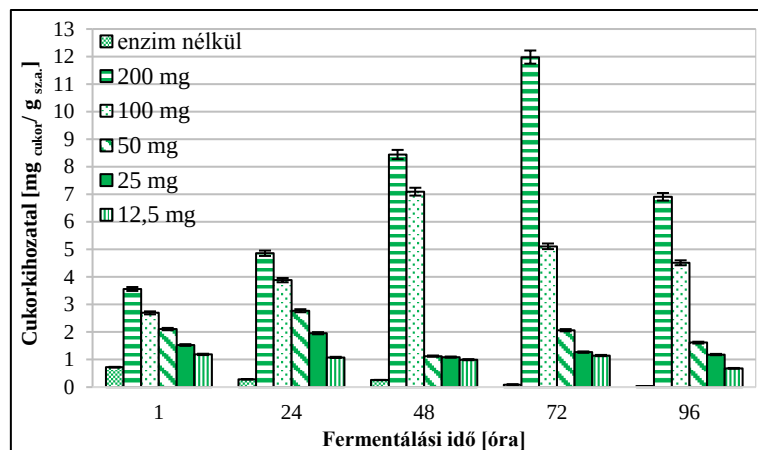
A KD és MD minták cellulóz bontásához használt xilanáz enzimek mennyiségeit a 13. táblázatban foglaltam össze. A táblázatból látható, hogy ezzel az enzimmel kétféle kísérletsorozatot végeztem. A második kísérletsorozatnál megnövelt enzimmennyiséggel végeztem a méréseket. A xilanáz enzim készítmény állaga por, ezért milligrammban adtam meg a bemért enzimmennyiségeket, amelyek hasonló egységűek az előző kísérletemben alkalmazott celluláz – cellobiáz enzimekkel, így a xilanáz enzimmel való lebontás hatásosságát is meg tudtam vizsgálni. A gyártó által meghatározott optimális pH (4,5), illetve hőmérsékleti tartományban (30 °C) 96 óráig fermentáltam a mintákat, amelyek cukortartalmát 24 óránként mértem meg.

13. táblázat: Enzimes lebontáshoz alkalmazott xilanáz enzim mennyiségek

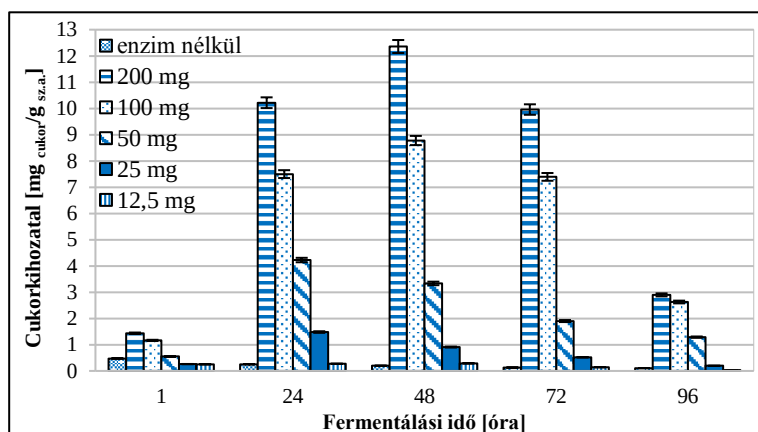
<i>KD és MD minta sorszáma</i>	<i>Xilanáz enzim [mg]</i>	<i>Megnövelt xilanáz enzim [mg]</i>
0	0	0
1	200	400
2	100	360
3	50	320
4	25	280
5	12,5	240

Az 56. – 59. ábrákon mutatom be a KD és MD minták xilanáz enzimmel való cukor termelés értékeit. Az 56. és az 57. ábrákon a 200; 100; 50; 25; és 12,5 mg enzimmennyiségekkel végzett lebontás eredményei láthatók. Mindkettő dohány minta esetében jól megfigyelhető, hogy az enzim nélküli kontrol minta csak minimális cukor hozamot mutat, illetve jól látható továbbá, hogy már az első órában tapasztalható volt minimális cukortermelés.

A KD minták esetében maximális cukortermelés (11,981 mg_{cukor/g sz.a.}) a 72. órában figyelhető meg, míg az MD mintáknál viszont már a 24. órában közel ekkora cukorkihozatal (10,217 mg_{cukor/g sz.a.}) volt tapasztalható. Az MD minta esetében maximális cukorhozam (12,358 mg_{cukor/g sz.a.}) a 48. órában volt megfigyelhető. Ebben a kísérletsorozatban mindkettő dohány mintánál a 200 mg xilanáz enzim mennyiség volt a legelőnyösebb, a 200 mg - nál kisebb enzimmennyiségnél viszont már jelentős cukor tartalom csökkenést lehet észrevenni.



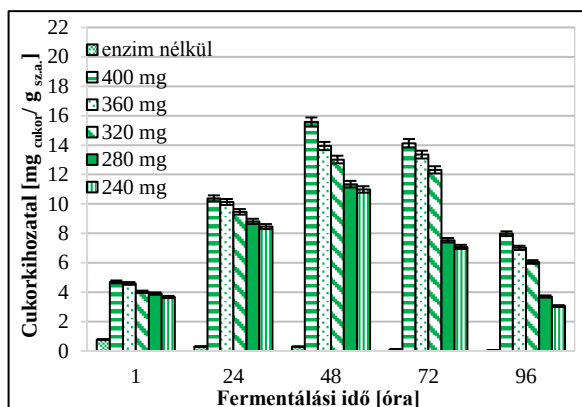
56. ábra: Xilanáz enzimmel való fermentálás eredményei KD mintáknál



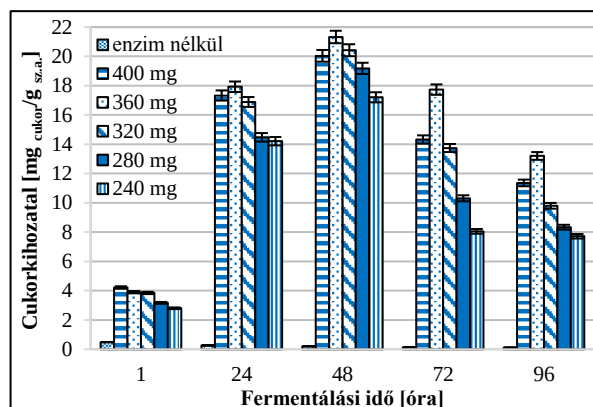
57. ábra: Xilanáz enzimmel való fermentálás eredményei MD mintáknál

A megnövelt xilanáz enzim mennyiséggel végzett kísérletek eredményeit az 58. és az 59. ábrákon mutatom be. Ennél a mérési sorozatnál is az előbbiekhöz hasonlóan tapasztaltam, mely szerint az MD minták esetében már a 24. órában nagyobb cukortermelés volt megfigyelhető, mint a KD minták esetében. A KD minták maximális cukortartalma ($15,570 \text{ mg}_{\text{cukor/g sz.a.}}$) a 48. órában, 400 mg xilanáz enzimmennyiség mellett volt tapasztalható, míg az MD mintáknál már a 24. órában a legnagyobb cukorhozam $17,927 \text{ mg}_{\text{cukor/g sz.a.}}$ volt, 360 mg xilanáz enzimmennyiség mellett. A maximális cukortermelés MD mintáknál szintén 360 mg mennyiségben adagolt enzimmennyiségnél, a 48. órában volt ($21,324 \text{ mg}_{\text{cukor/g sz.a.}}$) megfigyelhető.

A xilanáz enzim alkalmazásakor, a cukorkihozatal szempontjából megállapítható tehát, hogy mindkettő enzimmennyiség esetében az MD mintáknál volt jelentősebb a xilanáz enzim lebontó hatása a KD mintákhoz képest, ami a minták összetételéből és szerkezetéből adódhat.



58. ábra: Megnövelt xilanáz enzimmennyiséggel való fermentálás eredményei KD mintáknál



59. ábra: Megnövelt xilanáz enzimmennyiséggel való fermentálás eredményei MD mintáknál

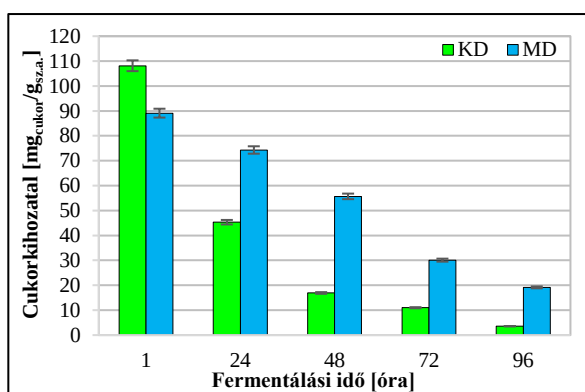
4.3.7. Szimultán Cukrosítás és Fermentáció vizsgálata xilanáz enzimmel

A nagyobb léptékű fermentálást az előző kísérleteimnél bemutatott laboratóriumi fermentáló egységben végeztem a xilanáz enzim esetében is. Az enzim és az élesztő mennyiségeket is szintén a Box-Wilson kísérlettervezési módszer segítségével, faktoriális kísérlettervvel határoztam meg. Ennél a kísérletsorozatomban élesztőként Unikén borélesztőt használtam. Az előző kísérleteknél meghatározott maximális cukorkihozatali értékekből indultam ki az SSF fermentálás kísérleti paramétereinek meghatározásához, amelyeket a 14. táblázatban foglaltam össze.

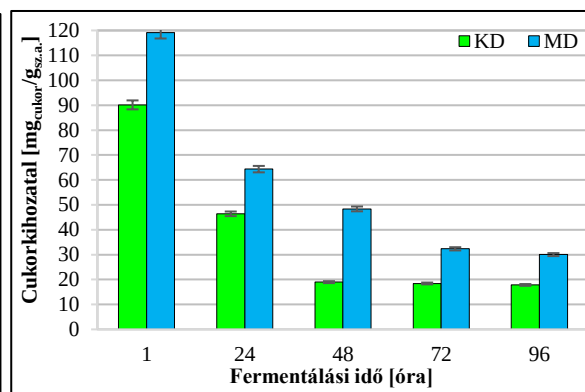
14. táblázat: KD és MD minták kísérleti paramétereinek nagyobb léptékű fermentálásánál

<i>Minták</i>	<i>H₂O</i> <i>[cm³]</i>	<i>Xilanáz</i> <i>[mg]</i>	<i>Élesztő</i> <i>[mg]</i>	<i>Szubsztrát</i> <i>tömege [g]</i>	<i>Szárazanyag</i> <i>tartalom [g]</i>	<i>pH</i>	<i>T (°C)</i>
KD	1000	2000	1000	80	0,586	4,5	30
KD		4000	1500				
MD		2000	1000		0,513		
MD		3600	1500				

A 60. és a 61. ábrákon mutatom be az SSF fermentáció cukorhozamait. A 60. ábrán a 2000 mg xilanáz és 1000 mg élesztőt, a 61. ábrán pedig a KD minta esetében 4000 mg, illetve az MD minta esetében 3600 mg xilanáz és 1500 mg élesztőt tartalmazó fermentáló cukorkihozatal értékeit ábrázoltam. Jól látszik, hogy mindkettő mérési tartományban az MD minták cukortermelése kedvezőbb volt, mint a KD mintáké.



60. ábra: SSF fermentálás KD és MD mintáknál (2000 mg xilanáz (KD, MD), és 1000 mg élesztő)



61. ábra: SSF fermentálás KD és MD mintáknál (4000 mg xilanáz (KD), 3600 mg xilanáz (MD) és 1500 mg élesztő)

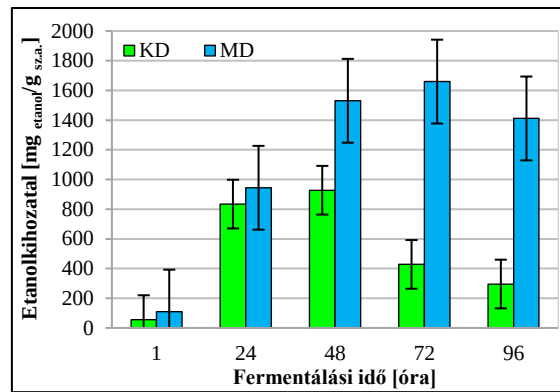
4.3.7.1. Etanol kihozatal vizsgálata gázkromatográfiás méréssel

A xilanáz enzimmel történő fermentálást követően a minták etanol tartalmát szintén gázkromatográfiás méréssel határoztam meg, amit a 62. ábrán szemléltetek.

A CLA/CLB enzimarányokkal végzett kísérletekhez képest a xilanáz enzim használatával jelentősen nagyobb mennyiségben képződött cukor, ezáltal az etanol kihozatal is mindkettő dohány minta esetében nagyobb volt.

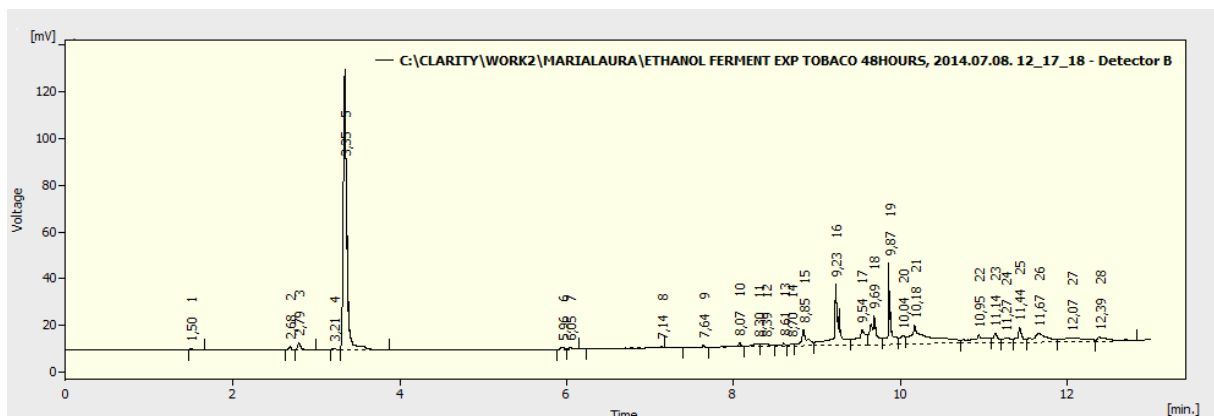
A gazdasági szempontokat is figyelembe véve, valamint a különböző enzimarányokkal végzett kísérleteknél nyert cukormennyiségekből kiindulva a további etanol kihozatal vizsgálataimhoz a kevesebb élesztő és enzimmennyiséget alkalmaztam, mivel ebben az esetben is jelentős mennyiségű cukor termelődést tapasztaltam (60. ábra).

Ahogy a 62. ábrán is jól látszik, ebben az esetben is az MD minták etanolhozama bizonyult jobbnak. Maximális etanolkihozatal a 72. órában volt (1659,5 mg_{etanol}/g_{sz.a.}) tapasztalható. A KD minták esetében pedig a 48. órában értem el maximális etanolkihozatali (927,5 mg_{etanol}/g_{sz.a.}) értéket.

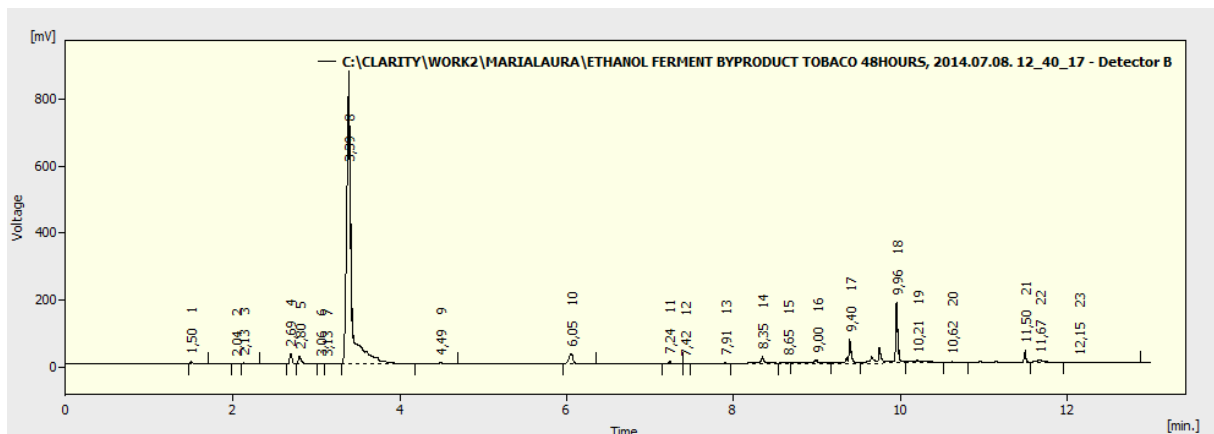


62. ábra: Etanol kihozatal mérése KD és MD mintáknál (2000 mg xilanáz és 1000 mg élesztő)

A fermentlevek gázkromatográfiás mérésének kromatogramjait a 63. és 64. ábrákon mutatom be. Az előző gázkromatográfiás mérésemhez hasonlóan itt is a két dohány minta kromatogramjai közül a maximális etanol kihozatal értéket elért minták kromatogramjait választottam. Mindkettő ábrán látható, hogy az etanolra jól elkülöníthető csúcsot kaptam ennél a kísérletsorozatnál is.



63. ábra: KD minta kromatogramja (48 óra, 2000 mg xilanáz/1000 mg élesztő)

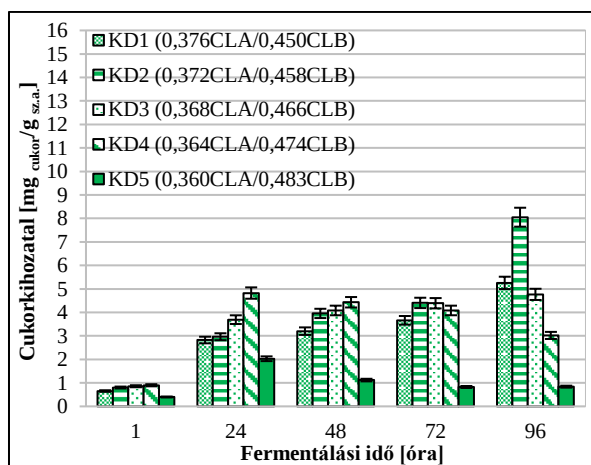


64. ábra: MD minta GC kromatogramja (72 óra, 2000 mg xilanáz/1000 mg élesztő)

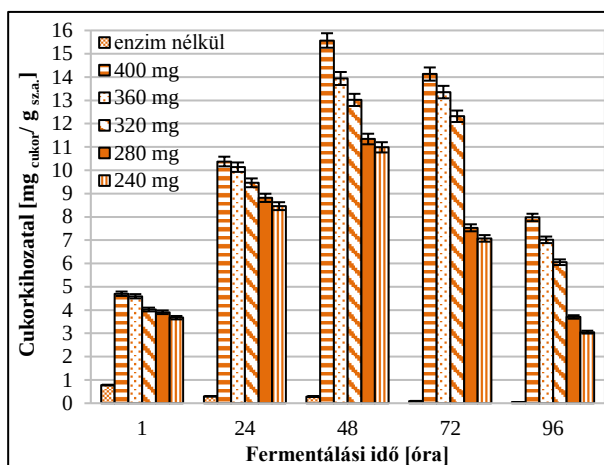
4.3.8. Dohány növény esetében alkalmazott enzimek hatásának összevetése

Kísérleteim során a dohány minták esetében összehasonlító vizsgálatokat végeztem xilanáz, illetve CLA és CLB enzimekkel, így meg tudtam állapítani, hogy a cukorkihozatal, illetve az etanolkihozatal szempontjából melyik enzim alkalmazásával lehet maximális cukor és etanolkihozatalt elérni. A KD minták esetében a 65. és a 66. ábrákon szemléltetem összehasonlítóképp a cukorkihozatal értékeket.

Jól látható, hogy a xilanáz enzimmel végzett kísérleteknél nagyobb cukorkihozatalt értem el, mint a CLA, CLB enzim esetében. Így ebben az esetben megállapítható, hogy a xilanáz enzim alkalmazása jobb hatással volt a fermentációra.

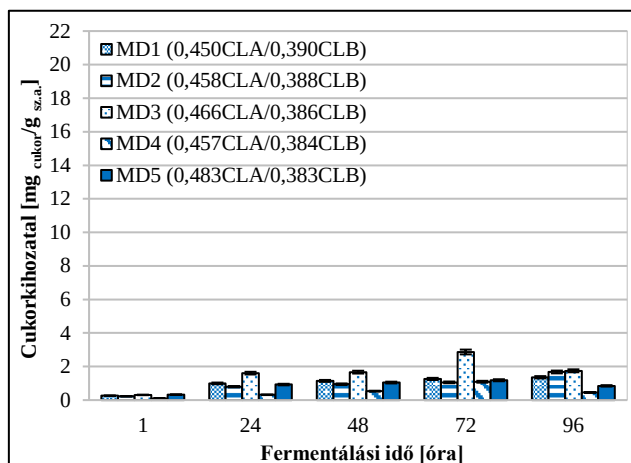


65. ábra: CLA/CLB [cm³] enzimmel való cukorkihozatal értékek KD minták esetében

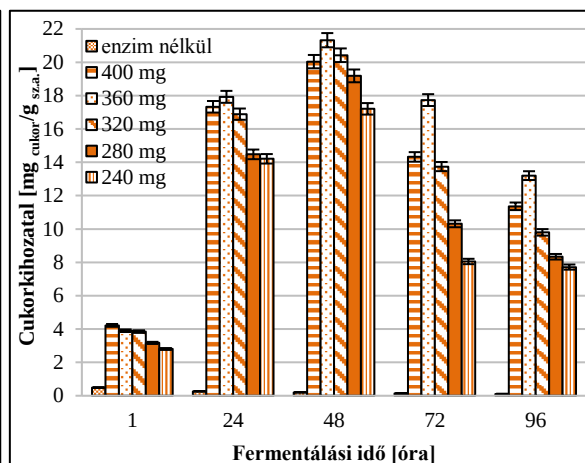


66. ábra: Megnövelt xilanáz enzimmennyiséggel való cukorkihozatal eredményei KD mintáknál

Természetesen az MD mintáknál is elvégeztem a kísérletet xilanáz és CLA, CLB enzimekkel egyaránt (67. és 68. ábra). Ebben az esetben is azt tapasztaltam, hogy a xilanáz enzimmel végzett kísérleteknél nagyobb cukorkihozatali értékeket értem el, mint a CLA, CLB enzim alkalmazása során. Összességében megállapítható tehát, hogy a KD és az MD minták esetében egyaránt a xilanáz enzim alkalmazása során kaptam nagyobb cukorkihozatalt, viszont ebben az esetben a KD és az MD minták közül is az MD minták cukorkihozatala volt nagyobb.

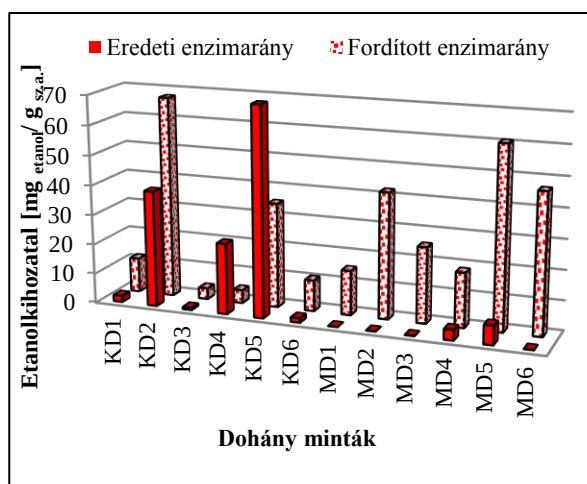


67. ábra: CLA és CLB enzimmel való cukorkihozatal értékek MD minták esetében

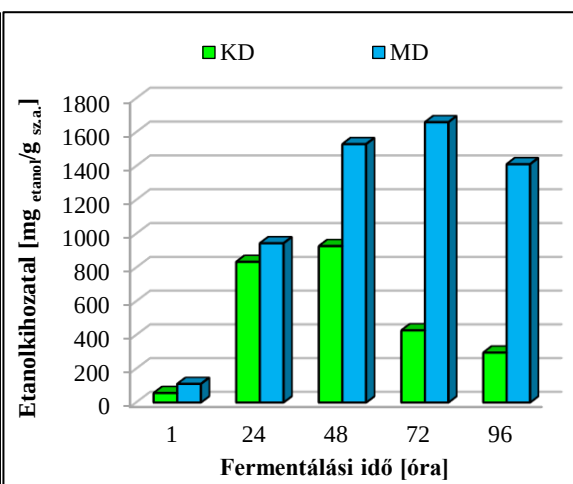


68. ábra: Megnövelt xilanáz enzimmennyiséggel való cukorkihozatal eredményei MD mintáknál

Kísérleteim további részében az etanolkihozatalt vizsgáltam xilanáz és CLA, CLB enzimekkel. A 69. és a 70. ábrákon szemléltetem a különböző enzimekkel mért etanolkihozatal értékeket, amelyeken jól látható, hogy ebben az esetben is a xilanáz enzimmel végzett kísérleteknél nagyobb etanolkihozatalt kaptam, mint a CLA, CLB enzim esetében. Az MD és a KD minták közül a xilanáz enzim esetében szintén az MD mintáknál volt számottevőbb az etanolkihozatal.



69. ábra: CLA és CLB enzimmel való etanol kihozatal mérése KD és MD mintáknál

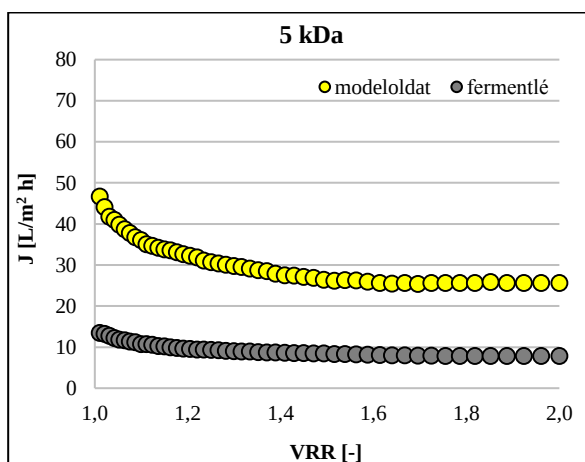


70. ábra: Xilanáz enzimmel való etanol kihozatal mérése KD és MD mintáknál (2000 mg xilanáz és 1000 mg élesztő)

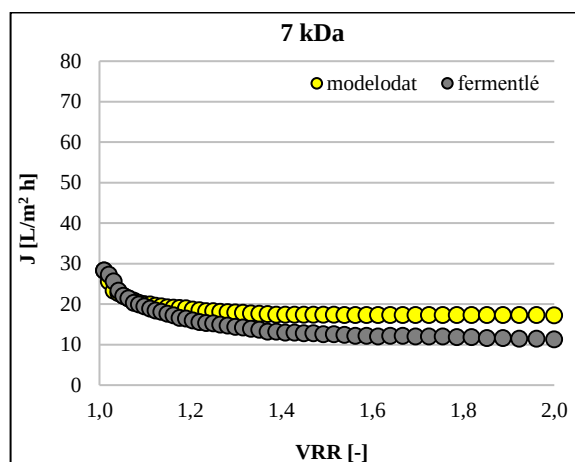
4.3.9. Xilanázos fermentlé membránszeparációs vizsgálata

Következő kísérletsorozatomban a xilanáz enzimet tartalmazó, fermentlevek membránszűrését mutatom be. Ennél a kísérletnél többféle vágási értékű (5 kDa; 7 kDa; 50 kDa) PES membránon keresztül vizsgáltam a fermentlevet, illetve a fermentlével egyenértékű cukortartalommal rendelkező modell oldatot (glükóz oldatot). A 71. ábrától a 73. ábráig az ultraszűrés fluxus értékeit ábrázoltam. Az ultraszűrést általában kolloid rendszerek, illetve makromolekulák leválasztására használják, és a pórusai sokkal kisebbek, mint a mikro szűrő membráné (MF). Céloom az volt, hogy megállapítsam, hogy a dohány minták fermentleveinek szűréséhez melyik vágási értékű membrán alkalmazása a megfelelő.

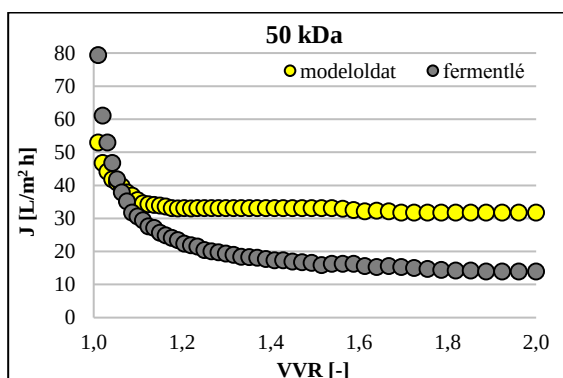
Minden esetben jól látható, hogy a modell oldatok fluxus értékei mindegyik membrán esetében nagyobb értéket mutatnak, mint a fermentlé fluxus értékei. A kezdeti fluxus érték csökkenő tendenciát mutat mindegyik membrán esetében, majd egy állandó értéket vesz fel.



71. ábra: 5 kDa PES membrán fluxus értékei

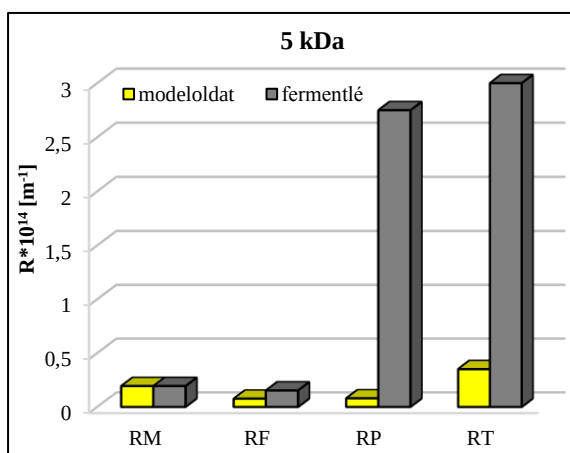


72. ábra: 7 kDa PES membrán fluxus értékei

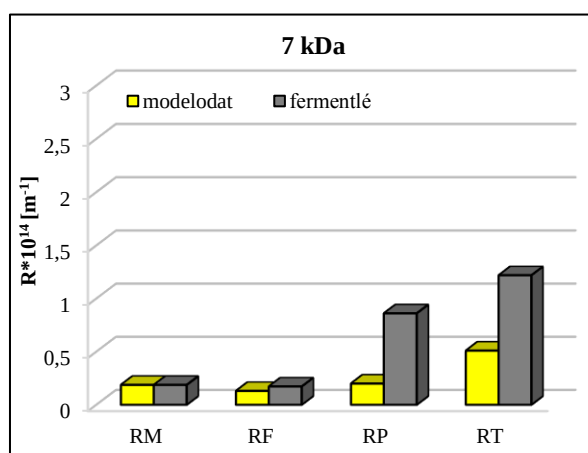


73. ábra: 50 kDa PES membrán fluxus értékei

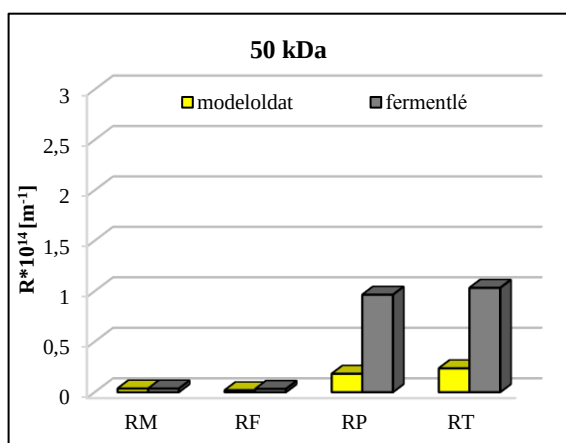
Az ellenállás értékeket a 74. ábrától a 76. ábráig mutatom be. Látható, hogy a legnagyobb összes ellenállása az 5 kDa PES membránnak van és minden esetben a fermentlé ellenállása nagyobb a modell oldathoz képest.



74. ábra: 5 kDa PES membrán ellenállás értékei



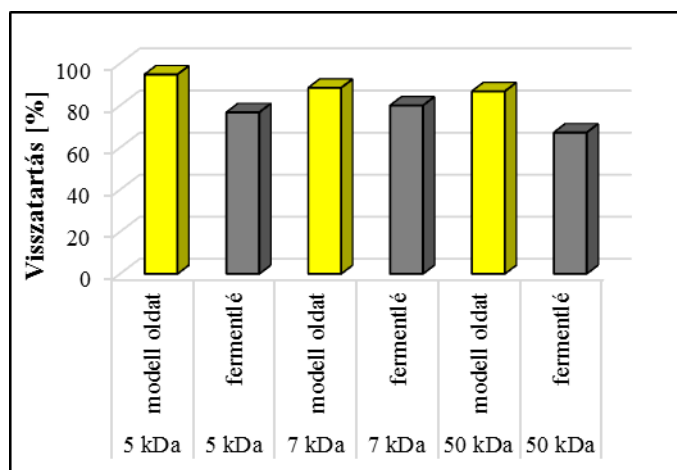
75. ábra: 7 kDa PES membrán ellenállás értékei



76. ábra: 50 kDa PES membrán ellenállás értékei

4.3.9.1. Fehérje visszatartás vizsgálata

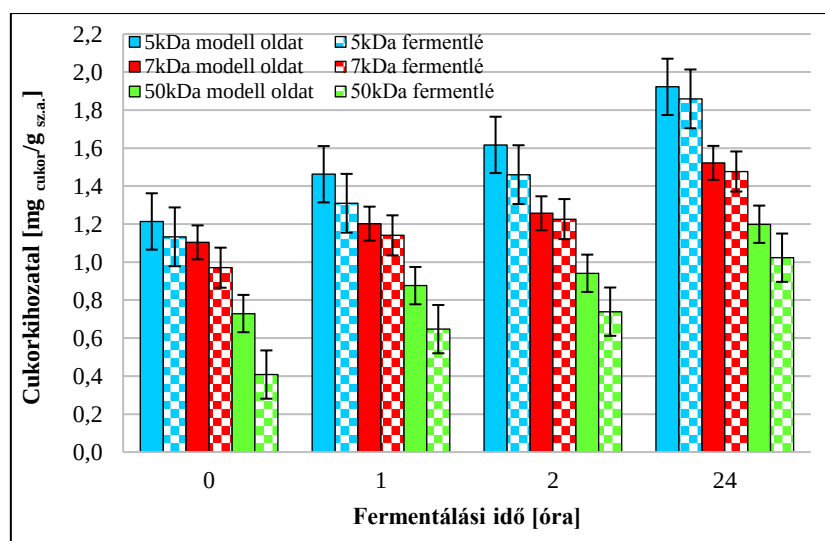
A xilanáz enzimet tartalmazó fermentlevek fehérjetartalmát Kjeldahl féle fehérje meghatározással vizsgáltam meg, amelyet a 77. ábrán mutatom be. Látható, hogy a modell oldat fehérjevisszatartása minden esetben magasabb, mint a fermentlé fehérjevisszatartása, ami azzal magyarázható, hogy a fermentlében más, nem enzim- fehérje és nem fehérje típusú nitrogén tartalmú komponens is található.



77. ábra: Fehérje visszatartás értékek

4.3.9.2. Enzim aktivitás meghatározása

A xilanáz enzimet tartalmazó fermentlevek membránszűrését követően ebben az esetben is megvizsgáltam, hogy milyen mértékben képes az enzim megtartani aktivitását. Ennél a kísérletnél is apróra vágott cellulóz alapanyagú szűrőpapírt használtam, aminek a cukor tartalmát 0; 1; 2 és 24 óra elteltével mértem meg, aminek az eredményeit az 78. ábrán mutatom be. Jól látható, hogy habár eltérő mértékben, de mindegyik membrán esetében megfigyelhető minimális cukor tartalom növekedés. Desztillált vízzel történő összehasonlító mérés esetén nem tapasztaltam cukor koncentráció növekedést, így megállapítható, hogy bizonyos mértékben a xilanáz enzimek is működő képesek maradtak a koncentrátumban.



78. ábra: Visszanyert enzimmel mért cukorkihozatal értékek

4.4. Nyírfakéreg apríték

A norvégiai egyetemen (Norwegian University of Life Sciences (UMB), Ås, Norway) végzett kutatómunkám során a gőzrobbantással előkezelt, aprított nyírfa kéreg enzimes hidrolízis vizsgálatát végeztem. Ennél a kísérletsorozatnál két célom volt, az egyik, hogy a cukorkihozatal szempontjából összehasonlító mérést végeztem spektrofotometriás, illetve HPLC módszerrel, a másik célom pedig az volt, hogy megvizsgáljam milyen hatással van a cukorkihozatalra a gőzrobbantásos előkezelés. A nyírfa kéreg az előzetes kísérletekből kiindulva, 210 °C-on 10 perces előkezelést kapott (Svein et al., 2011).

Az előkezelést követően különböző mennyiségű enzimet adagoltam a szuszpenzióhoz (Cellic CTec2, 50; 100; 150; 200; 250; 300 µL). A hidrolízis hatékonyság fokozása érdekében különböző fémeket, illetve redukáló szereket is adagoltam a mintákhoz, feltételezve ezzel a cukortermelődés fokozódását (CuSO₄*5H₂O, L-glutation, EDTA). Összehasonlító kísérleteket végeztem Avicel (PH-101) gyapothulladék, mikrokristályos cellulóz porral, amely egy sósavval hidrolizált, semlegesített, mosott fa cellulóz (Wood, 1988). A kísérleti paramétereket a 15. táblázatban foglaltam össze, amelyeket faktoriális kísérlettervvel, Excel program segítségével határoztam meg.

15. táblázat: Avicel és nyírfa nyersanyag minták hidrolízisének kísérleti paraméterei

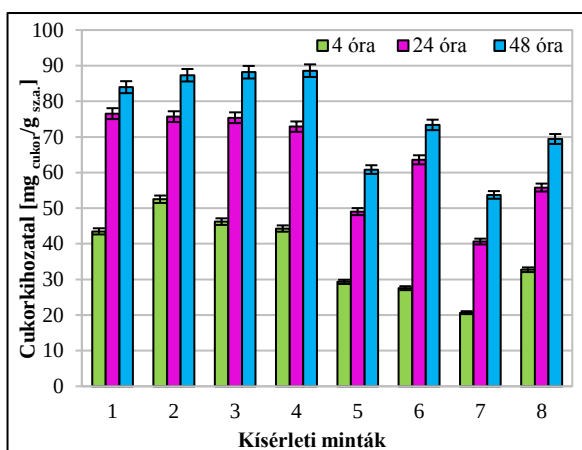
<i>Minták</i>	<i>500 mM EDTA [cm³]</i>	<i>500 mM glutathione [cm³]</i>	<i>500 mM Cu [cm³]</i>	<i>enzim (cellic CTec2) [cm³]</i>
1	0	0	0	0,3
2	0	0	0,01315	0,3
3	0	0,0526	0	0,3
4	0	0,0526	0,01315	0,3
5	0,1315	0	0	0,3
6	0,1315	0	0,01315	0,3
7	0,1315	0,0526	0	0,3
8	0,1315	0,0526	0,01315	0,3

A gőzrobbantással előkezelt nyírfa minták cukorkihozatal értékeit a 79. ábrán mutatom be. A hidrolízist egy rotációs kémcsőállványon végeztem, ami egy inkubátorban volt elhelyezve, az állandó hőmérséklet biztosítása céljából (50 °C). A kísérleti minták sorszámaival a szuszpenzióhoz hozzáadott redukáló szerek és fémek aránya is változik (15. táblázat). Az 1. számú minta csak az enzimet tartalmazta, nem tartalmazott hozzáadott redukálószer.

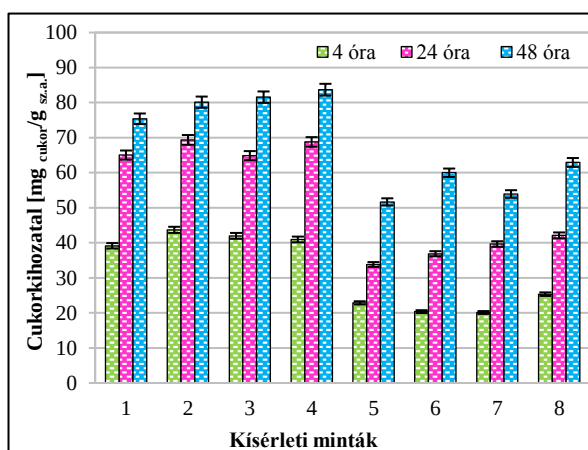
Jól látható, hogy mindegyik minta esetében a 48 órás hidrolízis volt a legmegfelelőbb a cukorkihozatal szempontjából. A leghatékonyabb átalakítást a 2. – 4. mintáknál értem el, amikor az enzim mellett csak glutation és CuSO_4 volt jelen a szuszpenzióban.

Mivel szignifikáns különbség nincs az 1. minta és a 2. – 4. adalékanyagot tartalmazó minták között, ezért megállapítható, hogy habár az adalékanyag hatékonyan hozzájárul az enzimes hidrolízis fokozásához, de a gazdaságossági kérdéseket is figyelembe véve nem célszerű a hidrolízist redukálószerrel fokozni. A 80. ábrán mutatom be az előkezelést nem kapott minták cukorkihozatal értékeit.

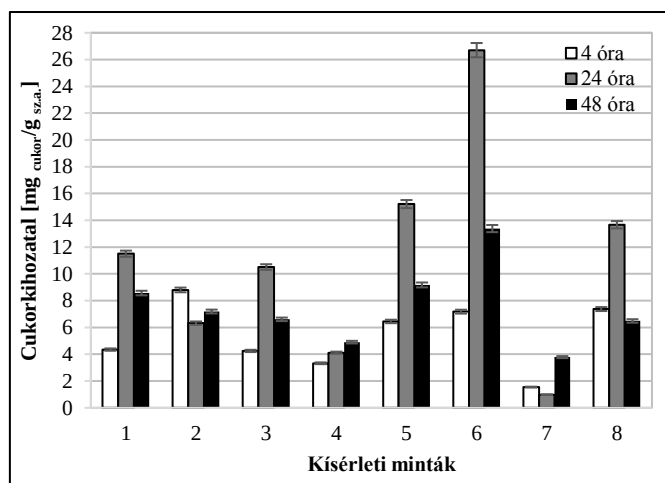
A 79. és a 80. ábrákat összehasonlítva jól látszik, hogy a gőzrobbantásos előkezelés kedvező hatással volt a cukorkihozatal szempontjából, az előkezelt mintáknál nagyobb volt a cukorhozam.



79. ábra: Gőzrobbantással előkezelt nyírfá cukor kihozatali értékei (pH 5; $T=50\text{ °C}$)

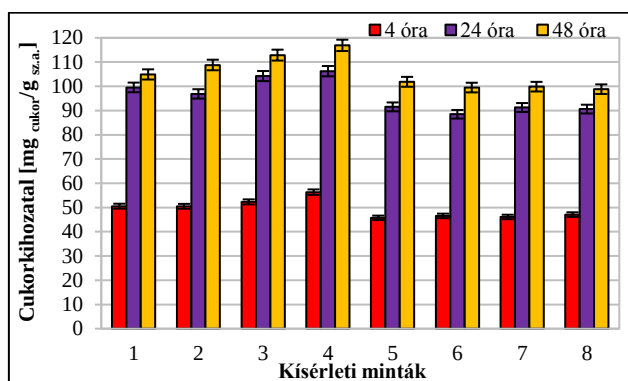


80. ábra: Előkezelés nélküli nyírfá cukor kihozatali értékei (pH 5; $T=50\text{ °C}$)



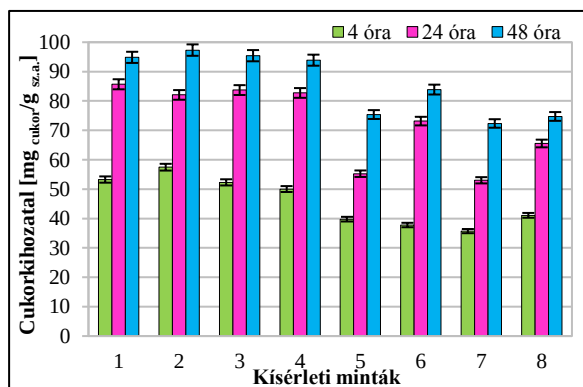
81. ábra: Az előkezelt és az előkezelés nélküli minták cukorkihozatal különbségei (pH 5; $T=50\text{ °C}$)

Összehasonlító méréseket végeztem cellulózzal (Avicel). A 82. ábrán megfigyelhető, hogy a cellulóz porral végzett kísérleteknél nagyobb cukorkihozatali értékeket kaptam, mint a nyírfa kéreg minták esetében. Továbbá ebben az esetben azt tapasztaltam, hogy egyrészt itt is szintén a 48 órás fermentálási idő bizonyult a legmegfelelőbbnek cukorkihozatal szempontjából, másfelől viszont a maximális cukorkihozatalt (116,9 mg_{cukor}/g_{sz.a.}) a glutation, réz és az enzim együttes alkalmazásával kaptam a 4. sorszámú minta esetében.

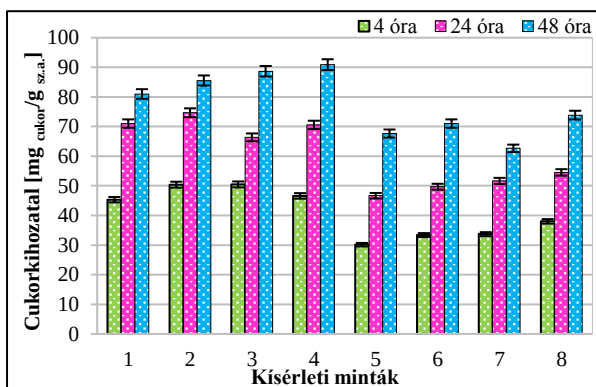


82. ábra: Avicellel végzett összehasonlító cukor kihozatali mérések (pH 5; T=50 °C)

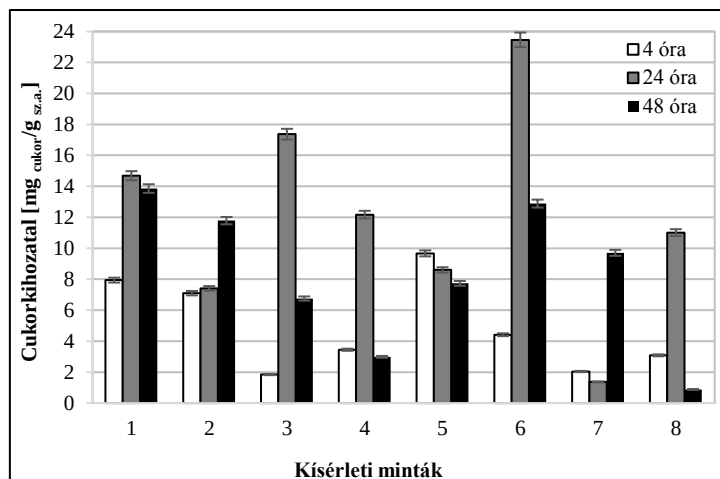
További célom a nyírfa kéreg vizsgálatánál az volt, hogy összehasonlítsam a cukorkihozatal értékeit a spektrofotometriás módszer mellett HPLC méréssel is, hogy egy pontosabb képet kapjak a cukortartalom meghatározásáról. A HPLC módszernél a cukrok optikai forgatóképességüket kihasználva egy amino funkciós csoportot hordozó kolonnán, valamint egy refraktív index (RI), vagyis törésmutató különbségen alapuló detektorral lehetőség nyílik a cukrok kvalitatív és kvantitatív analizálására is. A 83-86. ábrákon mutatom be a HPLC módszerrel analizált minták cukorkihozatali értékeit. Látható, hogy mindegyik esetben ezzel a módszerrel mért mintáknál nagyobb cukortartalmat mértem, mint a spektrofotometriás módszernél.



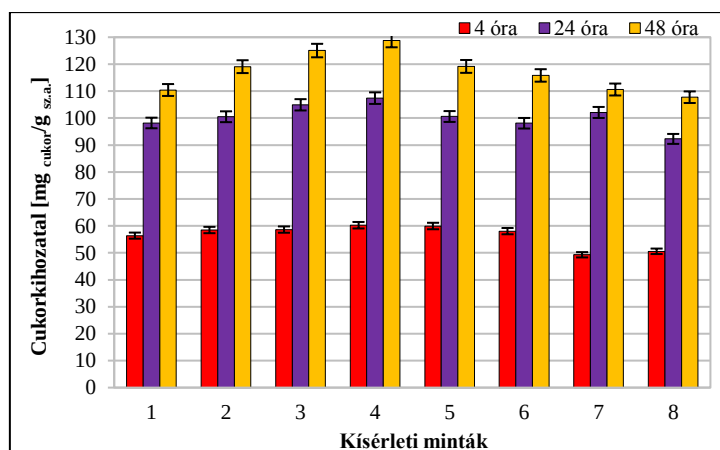
83. ábra: Gőzrobbantással előkezelt nyírfa HPLC által mért cukorkihozatali értékei (pH 5; T=50 °C)



84. ábra: Előkezelés nélküli nyírfa HPLC által mért cukorkihozatali értékei (pH 5; T=50 °C)



85. ábra: Az előkezelt és az előkezelés nélküli minták cukorkihozatal különbségei HPLC analízissel (pH 5; T=50 °C)



86. ábra: HPLC által mért Avicell cukorkihozatali értékek (pH 5; T=50 °C)

Összességében megállapítható tehát, hogy alkalmas fizikai előkezelésnek tekinthető a gőzrobbantásos előkezelés, ugyanis egyrészt elősegíti a hemicellulóz hidrolízisét, illetve fokozza a biomasszában még jelen lévő cellulóz enzimatis lebonthatását is, ezáltal nagyobb cukortermelődés érhető el. Az enzimatis kezelés hatékonyságának növelése céljából a szuszpenzióhoz adagolt redukálószeres nem okoztak jelentősebb cukortermelődést, így a költség-hatékonyság fokozása céljából nem szükséges a további alkalmazásuk.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Egyre több kutató és gyakorlati szakember véleménye megegyezik abban, hogy a világon a második generációs/másodgenerációs biomassza forrásokból előállított energiahordozók, pl. a bioetanol lehet a jövő egyik fő energiaforrása. A benzin üzemanyag átváltása cellulóz alapú etanolra lényegesen hozzájárulhat az üvegházhatású gázok csökkentéséhez, valamint a jelentős éghajlatváltozás enyhítéséhez. Ehhez a környezetbarát bioetanol gyártásához világszerte hatalmas biomassza nyersanyagforrás áll rendelkezésünkre, így a jövőben a másodgenerációs bioetanol tekinthető a legjobb megoldásnak az energiabiztonság szempontjából. Jelenleg a cukornád alapú etanol gyártás uralja a piacot és valószínűsíthetően a jövőben is így marad. Doktori értekezésemben a cukorrépaszelet, cukorrépa pellet, dohány és a nyírfakéreg apríték alapanyagokat vizsgáltam meg, mint lehetséges nyersanyagforrásokat. A minták előkezelését követően enzimes hidrolízis segítségével cukorrá, majd etanollá alakítottam a nyersanyagokat. A fő akadály a cellulózbontó enzimek magas ára, amelyek viszont szükségesek a cellulóz glükózzá történő hidrolíziséhez, így fontos szempont, hogy költséghatékony módon lehessen előállítani etanolt cellulóz alapú biomasszából. Ebből a megfontolásból tűztem ki célul, hogy membránszeparációs műveletek segítségével az alkalmazott enzimek visszaforgatásának lehetőségét is megvizsgáljam, természetesen úgy, hogy aktivitásukat megtartsák, így ezáltal is költséghatékonyabbá tegyem az eljárást.

A cukorgyártás melléktermékeként keletkező répaszeletet két formájában is vizsgálataim tárgyául választottam. A „friss” répaszeletnek magas víztartalma mellett cukortartalma is jelentős lehet a cellulóz/hemicellulóz tartalma mellett. A préselését és száradását követően kapott cukorrépa pellett víztartalmát jelentősen, cukortartalmát pedig számottevően elveszíti, így sokkal tömörebb, kompaktabb szerkezetet jelent a hidrolízis és a kémiai ágensek hozzáférése szempontjából. Amíg a cukorrépaszeletnél a celluláz (CLA) és cellobiáz (CLB) 1:1 arányú (300 µl – 300 µl) elegyét vizsgálva értem el a maximális cukorkihozataalt (cc. 80 mg_{cukor/g sz.a.}) 7,5 g/liter szuszpenzió koncentrációban, 45 °C-on, pH=5, 96 óra alatt, addig a pelletnél kisebb cukorkihozatali értékeket kaptam, max 24 mg_{cukor/g sz.a.} 30 °C-on, pH=4,5, 136 órás hidrolízis során. Az alacsonyabb cukorkihozatal és a hosszabb kezelési idő szükséglet mindenképpen a kompakt, kisebb víztartartalmú szerkezetnek köszönhető. A hőmérséklet csökkentését energetikai megfontolásból, a hosszabb kezelési időszükséglet kiegyensúlyozása céljából választottam. Ugyanis a β-glükozidáz enzimnek a szubsztráttól, az előfordulási helytől és a termelő szervezettől függően pH optimuma 3,0 - 7,0 között változik és aktivitásának hőmérséklet optimumát alapvetően meghatározza az enzimet termelő

szervezet hőmérséklet optimuma, így ez az érték 20 – 85 °C tartományban változik. A celluláznak 4–4,5 pH között van a működési optimuma, hőmérsékleti optimuma gyakorlati körülmények között 40–65 °C között van (Larner, 1960, Boyer, 1960).

A pellettel végzett vizsgálatoknál kísérletterv segítségével célom volt az optimális CLA/CLB enzim arányt is meghatározni, valamint az ideális aprítottsági értéket is. Mindkét paraméter igen szorosan összefügg és hatással van a cukormennyiségre: adott enzimarány mellett a nagyobb szemcseméret (0,5 mm fölött) a kedvezőbb, míg kisebb frakcióméreteknél nincs számottevő hatással az enzimarány a cukorkihozatalra. A membrános enzimvisszanyerés vizsgálat mindkét alapanyagánál sikeresnek bizonyult. Mind az 5 kDa vágási értékű poliéterszulfon (PES), mind a 4 kDa vágási értékű vékonyréteg (TF) ultraszűrő membránokkal végzett szeparációs kísérletek során nyert koncentrátumok enzimei is a cellulózlebontáshoz alkalmasnak bizonyultak. Az enzimvisszanyerés még akkor is sikeres volt, amikor a membránszeparációs művelet hatékonyságának megnövelése céljából ultrahang erőteret hoztunk létre a betáplálási oldalon. Sőt az ultrahang alkalmazása mintegy négyszeresére növelte a szűrés hatékonyságát, mind a modell oldatok, mind a valós fermentlevek esetében is. A fluxus értékek magasabbnak adódtak a pellet mintákból származó fermentlevek szűrésénél, aminek az oka valószínű a lényegesen hosszabb lebontási idő. Mindkét esetben azonban az eltömődési ellenállás (R_F) volt a meghatározó tényező, és az ultrahang erőter alkalmazásával ezt csökkentettem le (32. és 33. ábra). A 35. és 36. ábrák egyértelműen bizonyítják, hogy az ultrahang erőter alkalmazása nem csak a szeparáció hatékonyságát növeli meg, de pozitív hatással van az enzimaktivitásra is.

A második fő kísérleti mintacsoportként választott dohánynövény esetében is két alapvetően különböző mintát különböztettem meg. A melléktermék dohány (MD) minták a szárított dohánynövénynek a cigarettagyártásból visszamaradt mellékterméke, amely a finomabb szerkezetű levélből kevesebbet, a vastagabb cellulózkötegekben gazdagabb szárból, levélszárból, erekből többet tartalmaz. A kísérleti dohány (KD) minták ezzel szemben a teljes dohánynövényt tartalmazzák, nagyobb tőszámmal ültették, kimondottan biomassa alapanyag termelés céljából. A nem aprított MD és KD mintáknál a CLA és CLB enzimkeverékkel végzett lebontási kísérletek a vizsgált paraméter intervallumban nem adtak meghatározó enzim optimum értéket, vagyis a cukorkihozatali értékekben nincs szignifikáns különbség.

A kutterezett MD mintánál azonban az optimum enzimarány érték: 0,466/0,386 cm³ CLA/CLB, itt a cukorkihozatal: 9,11 mg cukor/g sz.a.; míg a KD mintáknál ez az érték: 18,73 mg cukor/g sz.a., az alkalmazott enzimarány pedig: 0,372/0,457 cm³ CLA/CLB.

A viszonylag alacsony, cukorkihozatali értékeket mikrohullámú energiaközléssel (MW) kívántam növelni. A mikrohullámú energiaközlés idejét és mértékét, azaz a kezelés teljesítményét is változtattam és azért, hogy valóban a mikrohullám hatását mérjem, és ne csak a mikrohullám által gerjesztett hő hatását. Ennek érdekében a mintákat párhuzamosan termikusan előkezelve is megvizsgáltam, valamint mértem a lúgos előkezelés valamint a fentiek kombinált hatását is. Az eredmények a MW kezelés hatásosságát mutatják, és azon belül azt is, hogy nem csak a bevitt összes energiaérték felelős a hatásért, hanem az is befolyásoló erővel bír, hogy milyen teljesítményszinten történt az energiabevitel. Esetemben a 250 W teljesítményszinten, 3 percig tartó kezelés hatásossága meghaladta az 500 W energiaszinten 1,5 percig végzett besugárzást, pedig a bevitt összes energia a két esetben megegyezik. A kombinált mérések esetében a KD mintáknál a 250 W, 5 perc, míg a MD mintáknál az 500 W 10 perc kezelés eredményezte, az optimális cukorkihozatal, sőt azt is megállapítottam, hogy a MW kezelés önmagában, enzim hozzáadása nélkül is képes növelni a cellulóz cukrosíthatóságát. A lúgos és termikus előkezelések is növelték a cukorkihozatalat de annak mértéke elmaradt a MW kezelt mintákhoz viszonyítva, viszont jelentős mértékben lecsökkentették az enzimes lebontáshoz szükséges időt.

A szimultán cukrosítás és fermentációs eljárásnál (SSF), ahol a rendszerhez az enzimek mellett élesztőgombákat is adagoltam, a cukrosításnál kimért enzimoptimumok fordított arányával értem el a legnagyobb etanolkihozatali értékeket különösen az MD mintáknál, míg az eredeti enzimarányok a KD mintánál bizonyultak hatékonyabbnak. A dohányminták fermentációját követően az enzim szeparációs vizsgálatok eredménye kismértékben eltér a cukorrépaszeletnél tapasztaltakhoz képest. Az eltérés az ultrahang erőter fluxus növelő hatására, azaz annak hiányára vonatkozik. Az MD és KD mintáknál az ultrahang alkalmazása nem növelte, inkább kismértékben csökkentette a permeátum tömegáramsűrűségét, és ezzel párhuzamosan az összes ellenállás értékét növelte. Ennek oka, hogy a dohánymintáknál, a répaszelet mintákkal ellentétben, nem az eltömődési ellenállás a meghatározó elem, hanem a polarizációs ellenállás, tehát a membrán felületre kiépült reverzibilis ellenállást adó réteg a jelentősebb, és az UH erőter által keltett kavitáció hatására, sok kirakódott részecske a pórusokba jut, „préselődik”, jelentősen növelve ezzel a belső pórusos eltömődési, azaz irreverzibilis ellenállás értékeket. Ezt az elméletet támasztja alá a membrán fehérje visszatartásainak eredményei is (55. ábra). Jól látható, hogy dohányminták esetében az ultrahang hatására a visszatartás szignifikánsan lecsökken azonos vágási értékű membrán használatakor, azonos transzmembrán nyomáson.

A két eltérő eredetű mintacsoport közötti különbség azok összetételbeli, szerkezetbeli eltéréséből adódhat. A dohánynövény mintáknál meglévő jelentős hemicellulóz tartalom miatt, fontosnak tartottam egy más típusú hidroláz, a xylanáz enzimesoport vizsgálatát is, melyet sokan sikeresen alkalmaztak cellulóz bontásra (Jinguang et al. 2011, Li et al., 2015). Ez az enzim, az elvárásnak megfelelően az MD mintákra volt nagyobb, jelentősebb cukorátalakító hatással, és még kifejezettebb volt ez a különbség a szimultán cukrosítás és fermentációs (SSF) technológia esetében. Rendkívül jól tetten érhető a xylanáz enzim pozitív hatása (69. és 70. ábra) ha a kezelési beállítások etanol kihozatalát vizsgáljuk, a CLA/CLB enzimek hasonló, optimum értékek alkalmazása melletti beállításaihoz viszonyítva. Az egységnyi szárazanyagra számított etanol mennyisége 20-30-szor nagyobb a xylanáz alkalmazása mellett, és ezeknél a beállításoknál az MD minták etanolkihozatala mindig meghaladja a KD mintáknál mért értékeket.

A xylanáz enzim visszanyerésére végzett membránszeparációs vizsgálatokat három különböző vágási értékű poliéterszulfon membránnal, rendre: 5 kDa, 7 kDa és 50 kDa, is elvégeztem. Mindhárom esetben a polarizációs, azaz reverzibilis ellenállás értékek voltak a meghatározó összetevői a teljes ellenállás értékének, csak úgy, mint a celluláz-cellobiáz enzimkomplex esetében. A modell oldathoz viszonyítva a fermentleveknél mért kisebb visszatartási értékek magyarázata a fehérjetartalom mérés módszerében rejlik ebben az esetben is, hiszen a Kjeldahl módszer a minta nitrogén tartalmát méri és abból generálja a fehérjetartalmat, és a permeátumban nagyon sok nitrogéntartalmú vegyület, fehérjetöredék, aminosav is jelen van, ami rontja a szétválasztási hatékonyság mutatóját. Az enzimaktivitás mérések eredményei azonban jól tükrözik, hogy az enzim a koncentrátum frakcióban marad vissza és nem veszíti el cellulózbontó aktivitását. A 78. ábrán az is bizonyítottá válik, hogy a xylanáz enzim szintén az 5 kDa-os membránnal választható le a legnagyobb hatékonysággal, itt a legnagyobb a cukorkihozatali érték, és a vágási értéktől függetlenül, itt is minden esetben a polarizációs ellenállás a meghatározó.

A nyírfakéreg apríték gőzrobbantásos előkezelése megnövelte a cukorkihozatali értékeket, különösen azokban az esetekben, ahol a minták nem tartalmaztak EDTA-t. A növekmény mértéke nem olyan mértékű, ami alátámasztaná a rendkívül energiaigényes eljárás szükségességét. A HPLC módszerrel és a spektrofotometriás módszerrel mért cukormeghatározás azonos minták esetében eltérő értékeket eredményezett, a HPLC-s mérés minden esetben magasabb értéket mutatott.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 1. Bizonyítottam, hogy a cukorrépa pellet esetében az ultrahang erőterében végzett membránszeparáció során a fluxus értékek nagyobbak, elsősorban az eltömődési ellenállás jelentős csökkenése következtében.**

A cukorrépa pellettel végzett szeparációs kísérleteimhez két különböző alapanyagú, de közel azonos vágási értékű (TF – teflon/4 kDa, PES – poliéterszulfon/5 kDa) membránt alkalmaztam. Mindkét membrán esetében azt tapasztaltam, hogy az ultrahang használata nélkül a modell oldat és a fermentlé fluxus értékei között nincs szignifikáns különbség, ellenben ultrahang erőter alkalmazása során viszont megfigyelhető, hogy az ultrahang által keltett kavitáció hatására lényegesen nagyobb fluxus értékeket kaptam mindkét membránnál, mind a modell oldat, mind pedig a fermentlé minták esetében.

- 2. A klasszikus szűrőpapír tesztel végzett enzimaktivitás mérések segítségével bizonyítottam, hogy az ultrahang alkalmazása az enzimek újbóli felhasználását nem befolyásolja.**

Az ultrahang-erőternek kitett enzimek újbóli felhasználása esetében aktivitásuk nem csökkent, sőt esetenként kicsit nagyobb cellulózbontást tapasztaltam, mint ultrahang használata nélküli esetekben.

- 3. A cukorrépa pellet esetében bizonyítottam, a szemcseméret és az enzim arány cukortermelődésre vonatkozó együttes hatását.**

A szemcseátmérő növelése (max.0,63 mm) adott enzimarány mellett nagyobb kihozatalt eredményez. Feltételezhetően a kisebb méretű, hosszabb idejű aprításnak kitett szemcséknél a lokálisan jelentkező, akár igen jelentős hőfejlődés által előidézett fizikai-, kémiai változások, megváltoztatják a minták makroszkópikus viselkedését, pl. a szuszpendáltathatóságot, az aldóz-ketóz arányt, stb.

- 4. Bizonyítottam, hogy a dohány minták esetében a mikrohullámú előkezelés növeli a minták enzimés lebonthatóságát, továbbá bizonyítottam azt is, hogy a mikrohullámú előkezelés hatását, elsősorban az alkalmazott teljesítményszint határozza meg, a közölt energia nagyságával szemben, és a kifejtett hatás mértéke függ a minták összetételétől.**

A mikrohullámú energia segítségével a cellulóz/lignocellulóz/lignin molekulák közötti kötések könnyebben felbomlanak, szerkezetük lazul, így a hidrolízis hatékonyabbá, a cellulóz molekulák pedig az enzimek számára hozzáférhetőbbé válnak, ami csökkenti a hidrolízis ideje is. A mintáktól függően eltérő teljesítményszintnél értem el a legnagyobb cukorkihozataalt, ez a kísérleti dohány mintáknál 250 W és 3 perc, a melléktermék dohány mintáknál 500 W és 1,5 perc volt. Ez az eltérés azzal magyarázható, hogy a kísérleti dohány minták az egész növényt, míg a melléktermék dohány minták elsősorban szár részeket tartalmaznak, tehát eltérő a lignin-cellulóz arány a mintáknál. A melléktermék minták esetében a lignocellulóz kötegek fellazításához nagyobb sugárzási energia bevitelre van szükség. A mikrohullámú és lúgos – termikus kezelések együttes alkalmazása a cukorkihozatali mutató további növekedését nem eredményezte, azonban az enzimes lebontási folyamathoz szükséges időt a harmadára csökkentette.

5. Bizonyítottam, hogy az alkalmazott kísérleti- és melléktermék dohány minták esetében xylanáz enzimmel hatékonyabban végezhető el a lebontás, nagyobb cukorkihozatal érhető el, mint a celluláz/cellobiáz enzimek alkalmazásakor.

A xylanáz enzim, az elvárásnak megfelelően, a melléktermék dohány mintákra volt nagyobb cukor-átalakító hatással, és még kifejezettebb volt ez a különbség a szimultán cukrosítás és ferementációs (SSF) technológia esetében. A celluláz/cellobiáz különböző enzimarányokkal végzett kísérletekhez képest a xylanáz enzim használatával minden esetben jelentősen nagyobb mennyiségben képződött cukor, ezáltal az etanol kihozatal is mindkettő dohány minta esetében nagyobb volt. Az egységnyi szárazanyagra számított etanol mennyisége is 20-30-szor nagyobb a xylanáz enzim alkalmazása mellett, mint a celluláz/cellobiáz enzimek használatakor.

6. Bizonyítottam, hogy a nyírfá apríték esetében a gőzrobbantás hatékony előkezelésként szolgál, valamint azt is kimutattam, hogy a redukálószeres adagolása nem okoz cukortermelődes növekedést.

Alkalmas fizikai előkezelés a gőzrobbantás, mert egyrészt elősegíti a hemicellulóz hidrolízisét, másrészt fokozza a biomasszában még jelen lévő cellulóz enzimátikus lebontását. Nincs szignifikáns különbség a csak enzimet tartalmazó minta és az adalékot tartalmazó minták között. Ezért gazdaságossági szempontokat figyelembe véve nem célszerű a hidrolízist redukálószerekkel fokozni.

7. SUMMARY

Second-generation bioethanol has the potential to be the major source of renewable energy in the world. Replacement of gasoline with cellulosic ethanol can reduce Green House Gases emission substantially and mitigate climate change significantly. Besides, there is a vast source of biomass feedstock for this environment-friendly biofuel throughout the world. Hence, second-generation bioethanol is regarded as the best solution for security in the future. Sugarcane-based ethanol is dominating the market and will remain for quite some time in the future.

In my dissertation, sugar beet pulp, sugar beet pellets, tobacco and birch wood-based materials were studied. After pretreatment of the samples the raw materials was transformation to sugar and ethanol. The key barrier of current technology to produce cost-effective ethanol from cellulose is the high cost of cellulose enzymes needed to hydrolyze the cellulose to glucose. For this reason, the main aim of my study was to recycling the enzymes with membrane separation technology so they can keep their activity and thus the process can be made more cost-effective. In my study two forms of sugar beet were investigated which resulted from the by-product of sugar production. In addition to the high water content of the sugar beet slices the sugar content can be a significant addition to the cellulose/hemicellulose content. After the pressing and drying of sugar beet pellets the water content significantly, the sugar content can considerably lose, it means more compact structure on the hydrolysis in terms of access of chemical agents. I obtained the maximum yield of sugar at the examination of sugar beet slice using the cellulase (CLA) and cellobiase (CLB) mixture in 1:1 (cc. 80 mg sugar/g dry material, 7.5 g/L suspension, 45°C, pH=5, 96 hours), and I got lower values of sugar beet pellets after hydrolysis (max 24 mg sugar/g dry material, 30°C, pH=4.5, 136 hours). Lower sugar yield and longer treatment time is due to the compact, less water structure content in any case. It was chosen reduce the temperature to the energy considerations and in order to balance of the longer treatment time. The pH optimum of β -glucosidase is varied from 3 - 7 depending on the substrate, incidence location and producer organization. The temperature optimum of the activity is define the temperature optimum of the enzyme-producing organism, so this value varies between 20-85 C°. The pH optimum of cellulase is 4 - 4.5 and the temperature optimum is between 40-65 C° under practical condition (Larner, 1960, Boyer, 1960).

My goal was to determine the optimal CLA/CLB enzyme dose and the ideal crushing value of the pellets with using experimental design. Both parameters are very closely related and affect the sugar concentration. The larger particle size of pellets (over 0.5 mm) is better, while by the smaller fraction size the enzyme rate was no significant effect on the sugar yield.

The enzyme recovery with membrane separation was successful with both raw material. The 5 kDa cut off value polyethersulfone (PES) and the 4 kDa cut off value thin film (TF) ultrafiltration membrane separation was suitable to degradation of cellulose with using ultrasound field as well. The ultrasound increased about fourfold the effectiveness of the ultrafiltration with model solution and fermentation broth. The flux values were higher of the ultrafiltration of the fermentation broth of pellets, which reason is the longer degradation time. In both cases the fouling resistance (R_F) was the determining factor and it was reduced with using the ultrasound field (Figure 32. and 33.). The Figures 35. and 36. are clearly shows that the application of ultrasound field is not only increase the efficiency of the separation, but it is a positive effect on the enzyme activity as well.

The second major experimental group was the tobacco plant and I compared two different tobacco samples. The by-product (MD) tobacco samples is the residual by-product of the dried tobacco plant from the cigarette manufacturing, which is contain less of the finer structure leaves and it contains more thick cellulose bundles of the leaf, stem and veins. The experimental tobacco (KD) samples contain the complete tobacco crop, it was higher plant density planted, specifically for the purpose of biomass feedstock production. The not sliced KD and MD samples with using the CLA and CLB enzyme mixture has not given definable enzyme optimum value and there is not significant difference the sugar yield values. However the optimum enzyme value of the sliced MD samples is 0.466/0.386 cm^3 CLA/CLB, the sugar yield: 9.11 g sugar/g dry matter, while these values in the KD samples are: 18.73 mg sugar/g dry matter, and the enzyme rate is: 0.372/0.457 cm^3 CLA/CLB. I increased the relatively low sugar yield values with using microwave energy (MW). It was changed the time, quantity and the treatment efficiency of the microwave energy, and in order to actually measure the influence of the microwaves and not only the effect of the heat generated by the microwaves, thus the samples were analyzed parallel after thermal pretreatment and it was measured the alkaline pretreatment and the combined effect of the pretreatment as well. The results show the effectiveness of the MW treatment, and not only the total energy value is responsible for the effect, but also what efficiency level had the MW. In this case the 250 W power level with 3 minutes treatment was better more than 500 W power level with 1.5 minutes, but the total input energy was the same in this two cases.

The optimal sugar yield was given 250 W and 5 minutes in the KD samples, while in the MD samples the 500 W and 10 minutes was the better energy level and time. Moreover it has been established, that the MW treatment alone without the addition of enzymes is able to increase the saccharification of cellulose. The alkaline and thermal pretreatments was also increased the sugar yield, but it is more loss compared to the MW treated samples, however it was significantly reduced the time for the enzymatic degradation.

The simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) where enzymes and yeast were dosed to the system, and it was reached the highest ethanol values with reverse ratio of enzyme optimum especially in the MD samples, while the original enzyme ratio was more efficient in the KD samples. After the fermentation of the tobacco plants the results of the enzyme separation is slightly different compared to the sugar beet slices. The difference is refers to the increasing flux of the ultrasound field i.e. its deficiency. The application of ultrasound was not increase rather slightly reduced the mass flow density of permeate and by this simultaneously increased the value of the total resistance. The reason is that the determining resistance is the polarization resistance and not the fouling resistance in the tobacco plants, thus on the membrane surface is major the reversible resistance layer, and the effect of the cavitation which is generated by ultrasound field, many deposited particles gets to the pores and significantly increasing the fouling resistance, i.e. irreversible resistance values. This theory is confirm by the measurement of the protein retention (Figure 54.) where it is apparent that the effect of ultrasound for the tobacco sample the retention is significantly decreasing, using the same cut off value membrane and the same transmembrane pressure. The difference between the two samples group are result from the compositional, structural differences. The tobacco crop have a major hemicellulose content, thus it was important to examine a different type of hydrolase, the xylanase enzyme as well, which used successfully to degradation of cellulose by many authors (Jinguang et al. 2011, Li et al., 2015). This enzyme was a higher, more significant effect on conversion of sugar in the MD samples as expected, and this difference was more relevant for the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) technology.

The extremely positive effect of the xylanase enzyme can be well detected (Figure 69. and 70.) when the ethanol yield of the treatment settings is examine, to compared the same settings of optimum CLA/CLB enzymes values. The amount of dry matter per unit of ethanol in addition to 20-30 times higher than the xylanase application, and in these configurations the ethanol yield of MD samples is always higher than the measured values of KD samples.

The examination of the xylanase membrane separation was measured with three different cut off value polyethersulfone membranes: 5 kDa, 50 kDa and 7kDa. In all three cases the polarization, that is, reversible resistance values were the major components of the total resistance, just like the case of cellulase – cellobiase enzyme complex. In this case to compared the model solution, the less retention values of the fermentation liquid is lies in the measurement method of the protein content, while the Kjeldahl method measures and generates from the content of protein nitrogen content of the samples, and the permeate has a lot of nitrogen-containing compounds, protein fragment, amino acid, which reduces the separation efficiencies. The results of the enzyme activity assays demonstrate that the enzyme is retained in the concentrate fraction and not lose the activity of cellulose degrading. The Figure 78. shows that the xylanase can also be separated from the 5 kDa membrane at the maximum efficiency, here is the highest sugar yield value, and independently of the cutting value, and each case the polarization resistance is determinative.

The steam explosion pretreatment of birch wood chips is increased the sugar yield values, especially in cases where the sample did not contain EDTA. The increase is not such as supporting the needed for a highly energy intensive process. The determination of the sugar yield with HPLC and spectrophotometric method was resulted different values, the HPLC measurement in all cases showed a higher value.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Abdel-Fattah Ahmed F., Osman Mona Y., Abdel-Naby Mohamed A.. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* A20. *Chemical Engineering Journal* 68, 1997, 189-196.

Almássy Gy. Mikrohullámú mérőműszerek és mérések. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1964, 380.

Al-Rawajfeh Aiman Eid. Nanofiltration pretreatment as CO₂ deaerator of desalination feed: CO₂ release reduction in MSF distillers. *Desalination* 380, 2016, 12–17.

Alvira P., Tomas E. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour Technol* 101, 2010, 4851-4861.

Azuma J., Tanaka F., Koshijima T. Enhancement of enzymatic susceptibility of lignocellulosic wastes by microwave irradiation. *J. Ferment. Technol.* 62, 1984, 377–384.

Bahmania Mohammad Amin, Shafieib Marzieh, Karimia Keikhosro. Anaerobic digestion as a pretreatment to enhance ethanol yield from lignocelluloses. *Process Biochemistry* 2016.

Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 2010.

Balat M., Balat H., Cahide O. Progress in bioethanol processing. *ProgEnergy Combust Sci* 34, 2008, 551-573.

Balla József. A gázkromatográfia analitikai alkalmazása. Edison House Kft., Budapest, 2006, ISBN 963 06 1470 7, ISBN 978 963 06 1470 2.

Barótfi István. Környezettechnika. Mezőgazdasági Kiadó 2000, ISBN 963 286 009 8.

Bélafi-Bakó K., Cserjési P., Beszédes S., Csanádi Zs., Hodúr C. Berry pectins: Microwave-assisted extraction and rheological properties. *Food and Bioprocess Technology* 5(3), 2012, 1100-1105.

Bélafiné dr. Bakó Katalin. Membrános műveletek. Veszprémi Egyetemi Kiadó 2002, Veszprém.

Ben-Ghedalia D., Miron J. The effect of combined chemical and enzyme treatment on the saccharification and in vitro digestion of wheat straw. *Biotechnology and Bioenergy* 23, 1981, 823-831.

Berghold Brigitta, Szabó Katalin, Berki András. A mezőgazdasági hulladékok és termékek energetikai célú hasznosítása. Felsőoktatási kutatóprogram: Magyarország-Szlovákia, ELMA Alapítvány a Környezeti Oktatás Támogatására, 2007, ISBN 978 963 87623 0 6.

Beszédes S., László Zs., Horváth Zs., Szabó G., Hodúr C. Comparison of the effects of microwave irradiation with different intensities on the biodegradability of sludge from the dairy and meat industry. *Bioresource Technology* 102, 2011, 814-824.

Binod Parameswaran, Sindhu Raveendran, Rani Singhanian Reeta, Vikram Surender, Devi Lalitha, Nagalakshmi Satya, Kurien Noble, K. Sukumaran Rajeev, Pandey Ashok. Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technology* 101, 2010, 4767–4774.

Blanchette R. A. Delignification by wood-decay fungi. *Annual Review Phytopathology* 29, 1991, 381-398.

Box, G. E. P., Wilson, K. B. On the experimental attainment of optimum condition. *Journal of the Royal Statistical Society. Ser. B.* 1. 1951.

Boyer P.D., Lardy H., Myrbäck K. *The Enzymes*, 2nd edn, vol. 4. New York: Academic Press. 1960.

Brodeur G, Yau E, Badla K, Collier J, Ramachandran KB, Ramakrishnan S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzym Res* 2011, doi: 10.4061/2011/787532.

Caddik S. Microwave Assisted Organic Reactions. *Tetrahedron Report* 38 1, 0040-4020(95)00662-1, *Tetrahedron* 51, 38, 1995, 10403-10432.

Cardona C. A., Sánchez Ó. J., Gutiérrez L. F.. Process synthesis for fuel ethanol production. CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC, 2010, ISBN 978-1-4398-1597-7.

Carolina C. M., Arturo J. G., Mahmoud EI-H. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Saf Environ* 90, 2012, 189-202.

Chandrasekaran S., Ramanathan S., Basak T. Microwave food processing—a review, *Food Res. Int.* 52, 2013, 243–326.

Chovau S., Degrauwe D., Van der Bruggen B. Critical analysis of technoeconomic estimates for the production cost of lignocellulosic bio-ethanol. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 26, 2013, 307e321.

Cicatiello Clara, Franco Silvio, Pancino Barbara, Blasi Emanuele. The value of food waste: An exploratory study on retailing. *Journal of Retailing and Consumer Services*, 96, 2016, 104.

Czupy Imre, Vágvolgyi Andrea. Mezőgazdasági (növénytermesztés, állattartás, erdészeti) hulladékok kezelése és hasznosítása. TÁMOP 4.2.5. Pályázat könyvei, 2011, elektronikus dokumentum.

Daylan B., Ciliz N. Life cycle assessment and environmental life cycle costing analysis of lignocellulosic bioethanol as an alternative transportation fuel. *Renewable Energy* 89, 2016, 578e587.

Decareau R. V. *Microwaves in the Food Processing Industry*. Academic Press, Orlando, FL, 1985.

Diaz Ana Belen, Marcia Maria de Souza Moretti, Bezerra-Bussoli Carolina, Costa Carreira Nunes Christiane, Blandino Ana, Roberto da Silva, Gomes Eleni. Evaluation of microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass immersed in alkaline glycerol for fermentable sugars production. *Bioresource Technology* 185, 2015, 316–323.

Dincer Ibrahim, Zamfirescu Calin, Chapter 3 – Fossil Fuels and Alternatives. *Advanced Power Generation Systems*, 2014, 95–141.

Dwivedi, P., Alavapati, J., Lai, P. Cellulosic ethanol production in the United developments. *Energy for Sustainable Development* 13, 2009, 174-182.

Echavarria A. P., Torras C., Pagán J., Ibarz A. Fruit juice processing and membrane technology application. *Food Eng. Rev.* 3, 2011, 136–158.

Ehsani Neda, Nyström Marianne, Ojamo Heikki & Siika-aho Matti. Separation of Enzymes Produced by *Trichoderma reesei* with Hydrophobic Ultrafiltration Membranes. *Process Biochemistry* 3, 3, 1995, 253-263.

Eggeman T., Elander RT. Process economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresour Technol* 96, 2005, 2019-25.

European Commission (EC). Roadmap to a resource efficient Europe. White Paper from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and Committee of the Regions. COM 11, 2011a, 571.

Fábry G. *Az élelmiszer-ipari eljárások és berendezések*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó 1992.

Fengel, D., Wegener, G. *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin, 1989.

Field Robert. *Fundamentals of Fouling in Membranes for Water treatment* ed.by: Klaus Viktor Peinemann and Suzana Pereira Nunes, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co,KGaA, Weinheim, 2010.

Filloux E., Teychene B., Tazi-Pain A., Croue J.P. Ultrafiltration of biologically treated domestic wastewater: how membrane properties influence performance. *Sep. Purif. Technol.*, 134, 2014, 178–186.

Focher B, Marzett A, Crescenzi V. *Steam Explosion Techniques, Fundamentals and industrial applications*. Philadelphia: Gordon and Breach 1991.

Fodor László. *Környezetjog. Debreceni Egyetem Állam – és Jogtudományi Kar, Debreceni Egyetemi Kiadó*, 2015, ISBN 978 963 318 495 0.

Gao C.J., Yu S.C., Zhang J.E., Cai H.R. Nanofiltration. *Membr. Sci. Technol.* 19, 1999 1–5.

Gasztonyi Kálmán. *Adalékok a sütőipar mikrobiológiájához I., SÜTŐIPAROSOK, PÉKEK* 50. évf. 2003. 2. sz. 9-10,13-16, 19.

Ghodki Bhupendra M, Goswami T.K. Effect of grinding temperatures on particle and physicochemical characteristics of black pepper powder. *Powder Technology*, 299, 2016, 168–177.

Gondrexon N., Cheze L., Jin Y., Legay M., Tissot Q., Hengl N., Baup S., Boldo P., Pignon F., Talansier E. Intensification of heat and mass transfer by ultrasound: Application to heat exchangers and membrane separation processes. *Ultrasonics Sonochemistry* 25, 2015, 40–50.

Gonzalez-García S., Gasol C.M., Gabarrell X., Rieradevall J., Moreira M.T., Feijoo G. Environmental aspects of ethanol-based fuels from *Brassica carinata*: a case study of second generation ethanol. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 2009, 2613e2620.

Gregg, D.J., Saddler, J.N. Factors Affecting Cellulose Hydrolysis and the Potential Enzyme Recycle to Enhance the Efficiency of an Integrated Wood to Ethanol Process *Biotechnology and Bioengineering* 51, 1996, 375-383.

Gusakov A.V., Sinitsyn A.P. A theoretical analysis of cellulase product inhibition: effect of cellulase binding constant, enzyme/ substrate ratio, and β glucosidase activity on the inhibition pattern. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1992, 663.

Gustafsson U., Wills W., Draper A. Food and public health: contemporary issues and future directions. *Critic Public Health* 21 (4), 2011, 385-393.

Haraszty Árpád, Hortobágyi Tibor, Fridvalszky Lóránd, Kiss István, Pólya László. *Növénysszervezetten és növényéletten*. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2004, 145-149, ISBN 963 19 4588 X.

Hoang Thi Ngoc Mai, Kyung Mi Lee, Shin Sik Choi. Enhanced oxalic acid production from corn cob by a methanol resistant strain of *Aspergillus niger* using semi solid – state fermentation. *Process Biochemistry* 51, Issue 1, 2016, 9-15.

Hodúr C., Beszédes S., Kertész Sz., László Zs., Szabó G. Maximum recovery of different types of berry byproducts. *Journal on Processing and Energy in Agriculture* 13(4), 2009 312-314 (ISSN:1821-4487).

Hoque A., Kimura K., Miyoshi T., Yamato N., Watanabe Y. Characteristics of foulants in air-sparged side-stream tubular membranes used in a municipal wastewater membrane bioreactor. *Sep. Purif. Technol.* 93, 2012, 83–91.

Horn Svein J., Nguyen Quang D., Westereng Bjorge, Nilsen Pal J., G.H. Eijssink Vincent. Screening of steam explosion conditions for glucose production from non-impregnated wheat straw. *Biomass and Bioenergy* 35, 2011, 4879-4886.

Horn Svein J., Vaaje-Kolstad Gustav, Westereng Bjorge, GH Eijssink Vincent. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels* 5:45, 2012, doi: 10.1186/1754-6834-5-45.

Hu Jinguang, Arantes Valdeir, Saddler Jack N. 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* 4:36 (2011).

Hugh A. McKenzie. The Kjeldahl determination of nitrogen: retrospect and prospect. *Trends in analytical chemistry* 13, 1994, 4.

Hussain A.A., Al-Rawajfeh A.E. Recent patents of nanofiltration applications in oil processing, desalination, wastewater and food industries. *Recent Pat. Chem. Eng.* 2, 2009, 51–66.

Hussain Ahtesham, Bose Shambhunath, Wang Jing-Hua, Yadav Mukesh Kumar, Mahajan Girish B., Hojun Kim. Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines. *Food Research International* 81, 2016, 1–16.

Hwanga Taeseon, Ohb Joon-Suk, Yima Woosoon, Namc Jae-Do, Baed Chulsung, Kime Hyung-ick, Kima Kwang Jin. Ultrafiltration using graphene oxide surface-embedded polysulfone membranes. *Separation and Purification Technology* 166, 2016, 41-47.

Jönsson Leif J., Martín Carlos. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* 199, 2016, 103-112.

Kádár Zs., Szengyel Zs., Réczey K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops Production* 20, 2004, 103-110.

Karam Marie Celeste, Petit Jeremy, Zimmer David, Djantou Elie Baudelaire, Scher Joel. Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. *Journal of Food Engineering* 188, 2016, 32-49.

Kamee S. K., Lin C. S. K. Valorisation of food waste to biofuel: current trends technological challenges. *Sustain Chem Process* 2, 2014, 22.

Kecskés Mihály, Naár Zoltán, Padisák Judit, Tóth Sándor, Babos Lórántné, Rimóczi Imre, Versegly Klára, Orbán Sándor. *Baktérium-, Alga-, Gomba-, Zuzmó- és Mohahatározó*. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2003, ISBN 963 19 2387 8.

Knutsen JS, Davis RH. Combined sedimentation and filtration process for cellulase recovery during hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Appl Biochem Biotechnol* 2002, 98–100, 1161–72.

Kong C., Kanezashi M., Yamamoto T., Shintani T., Tsuru T. Controlled synthesis of high performance polyamide membrane with thin dense layer for water desalination. *J. Membr. Sci.* 362, 2010, 76–80.

Kovács Kornél. *Környezetvédelmi Biotechnológia és biotechnológiai fermentációs műveletek*. Oktatási Jegyzet, SzFSz JATE Szegedi Élelmiszeripari Főiskolai Kar Élelmiszertechnológia és Környezetgazdálkodás Tanszék, 1998, „A felsőoktatás és a gazdaság együttműködése” HU-94.05. APP/1/006. KÉE-ÉFK/Dr. Szabó Gábor.

Kromkamp J., Faber F., Schroën K., Boom R.M. Effects of particle size segregation on crossflow microfiltration performance: control mechanism for concentration polarisation and particle fractionation. *J. Membr. Sci.* 268, 2006, 189–197.

Kurakake M., Ide N., Komokai T. Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. *Curr Microbiol* 54, 2007, 424-8.

Kyllönen H.M., Pirkonen P., Nyström M. Membrane filtration enhanced by ultrasound a review. *Desalination*, 181, 2005, 319–335.

Larner J. *Other glucosidases*. New York: Academic Press. 1960, 369—378.

László Zsuzsanna, Beszédes Sándor, Kertész Szabolcs, Hodúr Cecilia, Szabó Gábor, Kiricsi Imre. Bioethanol from sweet sorghum. *Hungarian Agricultural Engineering* 20, 2007, 15-17.

Lee C.H. Theory of reverse osmosis and some other membrane permeation operations. *J. Appl. Polym. Sci.* 19, 1975, 83–95.

Lee Ken Voon, Suh Cem Pang, Suk Fun Chin. Highly porous cellulose beads of controllable size derived from regenerated cellulose of printed paper wastes. *Materials Letters* 164, 2016, 264-266.

Leif J. Jönsson, Carlos Martín. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* 199, 2016, 103-112.

Li Kena, Wang Xiao, Wang Jingfeng, Zhang Junhua. Benefits from additives and xylanase during enzymatic hydrolysis of bamboo shoot and mature bamboo. *Bioresource Technology* 192, 2015, 424–431.

Li N.N., Fane A.G., Ho W.S.W., Matsuura T. *Advanced membrane technologies and application*. USA: John Wiley & Sons, 2008, Inc. ISBN 978-0-471-73167-2.

Lindorfer J., Fazeni K., Steinmüller H. Life cycle analysis and soil organic carbon balance as methods for assessing the ecological sustainability of 2nd generation biofuel feedstock. *Sustain. Energy Technol. Assess.* 5, 2014, 95e105.

Liua Yunyun, Xub Jingliang, Zhangb Yu, Yuanb Zhenhong, Heb Minchao, Liangb Cuiyi, Zhuangb Xinshu, Xie Jun. Sequential bioethanol and biogas production from sugarcane bagasse based on high solids fed-batch SSF. *Energy* 90, 2015, 1199e1205.

Madson P. W., D: A. Monceaoux. Fuel ethanol production. In *The alcohol textbook*, ed. T: P. Lyons, D. R: Kellsall, J. E. Murtagh. Nottingham, U.K. University Press, 1995.

Magnus Aska, Kim Olofssonb, Tommaso Di Felicec, Laura Ruohonend, Merja Penttilä, Gunnar Lidénb, Lisbeth Olssonb. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry* 47, 2012, 1452–1459.

Makabe Ryo, Akamatsu Kazuki, Nakao Shin-ichi. Mitigation of particle deposition onto membrane surface in cross-flow microfiltration under high flow rate. *Separation and Purification Technology* 160, 2016, 98–105.

Mark Wilf. *The Guidebook to Membrane Technology for Wastewater Reclamation*. Balaban Desalination Publications 2010, ISBN 0-86689-067-X.

Marta Waszak, Marek Gryta. The ultrafiltration ceramic membrane used for broth separation in membrane bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 2015.

McMillan JD. Pretreatment of lignocellulosic Biomass. In: Himmel ME, Baker JO, Overend RP, editors. *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*, ACS Symposium Series 566. American Chemical Society, Whashington, DC; 1994, 292-324.

Menon Vishnu, Rao Mala. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science* 38, 2012, 522-550.

Michelle CY Chang. Harnessing energy from plant biomass. *Chemical Biology* 11, 2007, 677-684, DOI 10.1016/j.cbpa.2007.08.039.

Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 1959, 426.

Mood S. H., Golfeshan A. H., Tabatabaei M., Jouzani G. S., Najafi M G. H. Gholami, et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew Sustain Energy Rev*, 27, 2013, 73-93.

Morales M., Quintero J., Conejeros R., Aroca G. Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: environmental impacts and energy balance. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 42, 2015, 1349e1361.

Mosier NS, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, et al. Futures of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 96, 2005, 673-86.

Muthukumaran Shobha, Kentish Sandra E., Stevens Geoffrey W. and Ashokkumar Muthupandian. Application of ultrasound in membrane separation processes: a review. *Reviews in chemical engineering* 22, no. 3, 2006, 155-194.

O' Sullivan A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 1997, 173-207.

Odhner P.B., Horváth I.S., Kabir M.M., Schabbauer A. Biogas from lignocellulosic biomass. *Rapport SGC* 247, 2012, 1102–7371.

Parvez S., Malik K., Ah Kang S., Kim H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 2006, 1171–1185.

Pauly M., Keegstra K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J* 54, 2008, 559-568.

Pécs M. Fermentációs Feldolgozási Műveletek (egyetemi tananyag). Typotex Kiadó 2011, ISBN 978-963-279-472-3.

Peng H., Chen H., Qu Y., Li H., Xu J. Bioconversion of different sizes of microcrystalline cellulose pretreated by microwave irradiation with/without NaOH. *Appl. Energy* 117, 2014, 142–148.

Percival Zhang, Jiong Hong, and Xinhao Ye. Cellulase Assays, Jonathan R. Mielenz (ed.), *Biofuels: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 581, DOI 10.1007/978-1-60761-214-8 14, ISBN 1064-3745 ISBN 978-1-60761-213-1.

Perry D. H. *Experimental design in Biotechnology*. Taylor & Francis Group 105, 1989, ISBN-10 0-8247-7881-2; ISBN-13 97-808247788-11.

Pham T. P. T., Kaushik R., Parshetti G. K., Russell M., Balasubramanian R. Food-waste-to-energy conversion technologies: current status and future directions. *Waste Manag* 2014.

Porto Carla, Decorti Deborha, Natolino Andrea. Microwave pretreatment of *Moringa oleifera* seed: Effect on oil obtained by pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction and Soxhlet apparatus. *J. of Supercritical Fluids* 107, 2016, 38–43.

Prasad S., Singh A., Joshi A. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources and Conservation Recycling* 50, 2007, 1-39.

Rahimi Z., Zinatizadeh A.A., Zinadini S. Milk processing wastewater treatment in a bioreactor followed by an antifouling O-carboxymethyl chitosan modified Fe₃O₄/PVDF ultrafiltration membrane. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2016.

Rajkó R., Horváth T., Szabó Zs., Horváth N. Aprítási művelet kemometriai szemléletű optimalizálása. *Műszaki Kémiai Napok'01 Veszprém*, 2001, 37-42.

Rákhely Gábor. Biokatalízis, biokonverziók, biotranszformációk. Szegedi Tudományegyetem, TÁMOP-4.1.2 A1 és TÁMOP-4.1.2 A2 könyvei, 2012, elektronikus dokumentum.

Ramos LP, Saddler JN. Enzyme recycling during fed-batch hydrolysis of cellulose derived from steam-exploded *Eucalyptus viminalis*. *Appl Biochem Biotechnol* 1994, 45–46, 193–207.

Reis van Robert, Zydney Andrew. Membrane separations in biotechnology. *Current opinion in biotechnology* 12, 2001, 208-211.

Ryu D.D.Y., Mandels M. Cellulase biosynthesis and applications. *Enzyme Microb. Tech.* 2, 1980, 9 1.

Salvachúa D., Prieto A., López-Abelairas M., Lu-Chau T., Martínez AT., Martínez MJ. Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour Technol* 102, 2011, 7500-6.

Samuelsson G., Huisman I.H., Trägårdh G., Paulsson M.A. Predicting limiting flux of skim milk in crossflow microfiltration. *J. Membr. Sci.* 129, 1997, 277– 281.

Sanjibi Kumar Karmee. Liquid biofuels from food waste: Current trends, prospect and limitation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 945-953.

Sarkar N., Ghosh S. K., Bannerjee S., Aikat K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renew Energy*, 37, 2012, 19-27.

Seema S. Shenvi, Arun M. Isloor, A.F. Ismail. A review on RO membrane technology: Developments and challenges. *Desalination* 368, 2015, 10–26.

Shen Xueliang, Xia Liming. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. *Process Biochemistry* 39, 2004, 1363-1367.

Shi Xiafu, Tal Galit, Hankins Nicholas P., Gitis Vitaly. Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review. *Journal of Water Process Engineering* 1, 2014, 121–138.

Soltanieh M., Gill W.N. Review of reverse osmosis membranes and transport models. *Chem. Eng. Commun.* 12, 1981, 279–363.

Speirsa Jamie, McGladeb Christophe, Sladea Raphael, Uncertainty in the availability of natural resources: Fossil fuels, critical metals and biomass. *Energy Policy*, 87, December 2015, 654–664.

Stevens D. J., Worgetten M., Saddler J. Biofuels for transportation: an examination of policy and technical issues. IEA Bioenergy Task 39, Liquid Biofuels Final Report, Canada 2001-2003.

Suhas S.P.J.M.C, Carrott R.M.M.L. Lignin - from natural adsorbent to activated carbon: A review. *Bioresource Technology*, 98, 2007, 2301-2312.

Sun Ye, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* 83, 2002, 1-11.

Tabaka M.G., Hereoel-Gimbert I., Monod F., Asther M., Sigoillot J.C. 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.

Tabka M.G., Herpoel-Gimbert I., Monod F., Asther M., Sigoillot J.C. 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.

Tarjáni Imre. Fizika orvosok és biológusok számára. Medicina Könyvkiadó1971, Budapest, MD 31 084 – c – 7174.

Tarkow H., Fiest W. C. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid NH₃. In: *Advence Chemistry series* Whashington, DC: Amreican Chemical Society 95, 1969, 197-218.

Thangavelu Saravana Kannan, Ahmed Abu Saleh, Ani Farid Nasir. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 56, 2016, 820–835.

Tonglairoum P., Chaijaroenluk W., Rojanarata T., Ngawhirunpat T., Akkaramongkolporn P., Opanasopit P. Development and characterization of propranolol selective molecular imprinted polymer composite electrospun nanofiber membrane. *AAPS PharmSciTech.* 14, 2013, 838–846.

Tu M, Chandra RP, Saddler JN. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnol Prog* 23, 2007a, 398–406.

Wang X.L., Zhang C.H., Zhao J. Separation mechanism of nanofiltration membranes and its applications in food and pharmaceutical industries. *Membr. Sci. Technol.* 20, 2000, 29–30.

Weng J-K, Li X, Bonawitz ND, Chapple C. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Curr Opin Biotechnol* 19, 2008, 166-72.

Wijmans J.G., Baker R.W. The solution-diffusion model: a review. *J. Membr. Sci.* 107, 1995, 1–21.

Wood T.M. Preparation of crystalline, amorphous and dyed avicel cellulase substrates, W.A. Wood and S.T. Kellog (eds.). *Methodes of enzymology* 160, 19-25 Academic Press, San Diego, CA, 1988.

Woodward J., Wiseman A. Fungal and other p glucosidase: their properties and applications. *Enzyme Microb. Tech.* 4, 1982, 73.

Wyman C.E, Spindler D.D., Grohmann K., Lastick S.M. Simultaneous Saccharification and Fermentation of cellulose with the yeast *Brettanomyces clasusenii*. *Biotechnology and Bioengineering symp* 17, 1986.

Xiong J., Ye J., Liang W.Z., Fan P.M.. Influence of microwave on the ultrastructure of cellulose I. *J. South China Univ. Technol.* 28, 2000, 84–89.

Yang G.C.C., Yen C., Wang C. Monitoring and removal of residual phthalate esters and pharmaceuticals in the drinking water of Kaohsiung City, Taiwan, *J. Hazard. Mater.* 277, 2014, 53–61.

Yi He Y. H., Bagley David M., Leung Kam Tin, Liss Steven N., Liao Bao-Qiang. Recent advances in membrane technologies for biorefining and biotechnology production. *Biotechnology Advances* 30, 2012, 817-858.

Zeeman G., Hendriks A.T.W.M. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 100, 2009, 10–18.

Zhou J.S., Chen G.W. Development of nanofiltration membrane. *Membr. Sci. Technol.* 19, 1999, 1–116.

Zhu S, Wu Y, Yu Z, Liao J, Zhang Y. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymatic hydrolysis. *Process Biochem* 40, 2005, 3082-6.

Zhu S, Wu Y, Yu Z, Wang C, Yu F, Jin S, et al. Comparison of three microwave/chemical pretreatment process for enzymatic hydrolysis of rice straw. Biosyst Eng 93, 2006, 279-83.

<http://agrobio.hu/hu/hirek-archivum/vancsura-jozsef-quot-az-elenjaro-gazdak-talajbakteriumot-hasznalnak-quot/>

<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/Sejtbiologia/ch17s02.html>

<http://ttk.pte.hu/analitika/letoltesek/jegyzet/ch07s02.html>

9. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPZŐ KÖZLEMÉNYEK

1. Membrane separation and sonication in bio-ethanol production

Marietta Ábel, Gábor Keszthelyi-Szabó, Dóra Vitay, Cecilia Hodúr
Desalination and Water Treatment (2014), pp. 3725-3730. IF: 1,272

Folyóirat szakterülete: Ocean Engineering, helyzete: 39/156 (Q1)

Folyóirat szakterülete: Water Science and Technology, helyzete: 90/230 (Q2)

Folyóirat szakterülete: Pollution, helyzete: 56/124 (Q2)

IV. Agrártudományok Osztálya A

2. Enzyme recovery and fouling mitigation by ultrasound-enhanced ultrafiltration

Marietta Ábel, Gábor Szabó, Oriane Poser, Zsuzsanna László, Cecilia Hodúr
Desalination and Water Treatment, 51 (25-27) (2013), pp. 4921-4926. IF: 1,18

Folyóirat szakterülete: Ocean Engineering, helyzete: 35/86 (Q2)

Folyóirat szakterülete: Water Science and Technology, helyzete: 78/185 (Q2)

Folyóirat szakterülete: Pollution, helyzete: 50/99 (Q2)

IV. Agrártudományok Osztálya A

Független idéző: 1, Összesen: 1

3. Ultrasonically Assisted Ultrafiltration of Whey Solution

Marietta Ábel, Zsolt László Kiss, Sándor Beszédes, Cecilia Hodúr, Gábor Keszthelyi-Szabó, Zsuzsanna László

Journal of Food Process Engineering, 38 (2015), pp. 467-473. IF: 0,745

Folyóirat szakterülete: Chemical Engineering (miscellaneous), helyzete: 120/364 (Q2)

Folyóirat szakterülete: Pollution, helyzete: 56/124 (Q2)

IV. Agrártudományok Osztálya A

Független idéző: 2, Függő idéző: 1, Összesen: 3

4. Combined pre-treatment for saccharification

Marietta Ábel, Kinga Drenda, Balázs Lemmer, Sándor Beszédes, Gábor Keszthelyi-Szabó, Cecilia Hodúr

Acta Technica Corviniensis – Bulletin of Engineering, 8 (4) (2015), pp. 111-114.

5. Enhanced bioethanol production from extracted sugar beet chips

Marietta Ábel, Zsolt László, Gábor Szabó, Cecilia Hodúr

Hungarian Agricultural Engineering, 23 (2011), pp. 50-52.

6. Cukorrépa cellulóz cukrosítása bioetanolhoz

Ábel Marietta, László Zsuzsanna, Szabó Gábor, Hodúr Cecilia

Membrántechnika és Ipari Biotechnológia, 2 (3) (2011), pp. 34-39.

IV. Agrártudományok Osztálya A

ELŐADÁSOK, POSZTEREK, KONFERENCIA RÉSZVÉTELEK

1. Microwave pre-treatment combined saccharification

Cecilia Hodúr, Marietta Ábel, Kinga Drenda, Sándor Beszédes, Gábor Keszthelyi-Szabó

The Energy & Materials Research Conference, Madrid, Spain, 2015.02.25-27.

2. **Membrane separation and sonication in bio-ethanol production**
Marietta Ábel, Gábor Keszthelyi-Szabó, Dóra Vitay, Cecilia Hodúr
 Conference and Exhibition on Desalination for the Environment Clean Water and Energy, Limassol, Ciprus, 2014.05.11-15.
3. **Enzyme recovery by membrane separation and sonication**
Marietta Ábel, Dóra Vitay, Zsuzsanna László, Gábor Keszthelyi-Szabó, Cecilia Hodúr
 3. International ISEKI Food Conference, Athens, Greece, 2014. 05.21-23.
4. **Membránszeparáció alkalmazása az élelmiszeripari hulladékokból történő enzim visszanyerésre: Enzym recovery by membrane separation method from waste products of the food industry**
Ábel Marietta, Sproch Róbert, Szélpál Szilárd, Hodúr Cecilia
 Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, Magyarország, 2013.04.23-25.
 (ISBN: 978-615-5044-79-3)
5. **Tobacco as a raw material for fuel-ethanol**
Marietta Ábel, Orsolya Sütöri, Gábor Keszthelyi-Szabó, Cecilia Hodúr
 40th International Conference of SSCHE, Tatranske Matliare, Szlovákia,
 2013.05.27-31. (ISBN: 978-80-89475-09-4)
6. **Biogas production in dairy waste water**
Marietta Ábel, Kristóf Szabó, Zsolt László Kiss, Sándor Beszédes, Cecilia Hodúr,
 Gábor Keszthelyi-Szabó, Zsuzsanna László
 Food Science Conference, Budapest, Magyarország, 2013 11.07-08.
 (ISBN: 978-963-503-550-2)
7. **Enzyme recovery and fouling mitigation by ultrasound enhanced ultrafiltration**
Marietta Ábel, Gábor Szabó, Oriane Poser, Zsuzsanna László, Cecilia Hodúr
 International Conference on Membranes in Drinking and Industrial Water Production,
 Leeuwarden, Hollandia, 2012. 09.10-12.
8. **Microwave enhanced biodegradability of food processing wastewater sludge**
 Beszédes Sándor, Ludányi L, Ábel Marietta, Hodúr Cecilia, Szabó Gábor
 IWA Regional Conference on Wastewater Purification & Reuse
 Heraklion, Görögország, 2012.03.28-30. (ISBN: 978-960-99889-2-6)
9. **Enzyme separation experiments for membrane bioreactor**
Marietta Ábel, Róbert Sproch, Zsolt Kiss, Gábor Szabó, Cecilia Hodúr
 International conference on science and technique in the agri-food business –
 ICoSTAF Szeged, Magyarország, 2012.06.07.
10. **Húsipari szennyvizek membrános koncentrálni eljárásainak vizsgálata biogáz fermentáció hatékonyságának növelése céljából - Examination of membrane pre-concentration of meat industry wastewater to enhance the efficiency of anaerobic digestion process**
 Beszédes Sándor, Ábel Marietta, László Zsuzsanna, Szabó Gábor, Hodúr Cecilia
 Műszaki Kémiai Napok 2011, Conference of Chemical Engineering 2011.
 Veszprém, Magyarország, 2011.04.27-29. (ISBN: 978-615-5044-07-6)

11. Enhanced bioethanol production from extracted sugar beet chips

Marietta Ábel, Zsuzsanna László, Gábor Szabó, Cecilia Hodúr
33 International Symposium of Section IV of CIGR, Bucuresti, Romania,
2011.06.23-25. (ISBN: 978-606-521-686-0)

12. Biogas production from food industry wastewater sludge intensified by microwave irradiation

Sándor Beszédes, Marietta Ábel, Zsuzsanna László, Gábor Szabó, Cecilia Hodúr
33 International Symposium of Section IV of CIGR, Bucuresti, Romania,
2011.06.23-25. (ISBN: 978-606-521-686-0)

13. Enhanced bioethanol production from extracted sugar beet chips

Marietta Ábel, Zsuzsanna László, Gábor Szabó, Cecilia Hodúr
Synergy 2011 - Synergy in the Technical Development of Agriculture and Food
Industry, Gödöllő, Magyarország, 2011. (ISBN: 978-963-269-249-4)

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Enzyme recovery by membrane separation method from waste products of the food industry

Szélpál Szilárd, Oriane Poser, Ábel Marietta
Acta Technica Corviniensis – Bulletin of Engineering 6, (2) (2013), pp. 149-154.

2. A Szlovák Kémikusok 40. Nemzetközi Konferenciája: Beszámoló

Szélpál Szilárd, Ábel Marietta, Kiss Zsolt László
Membrántechnika és Ipari Biotechnológia 4, (3) (2013), pp. 53-54.

3. Bio-fuels from cellulose by microwave irradiation

Sándor Beszédes, Aurelie Tachon, Balázs Lemmer, Marietta Ábel, Gábor Szabó, Cecilia Hodúr
Annals of Faculty of Engineering Hunedoara - International Journal of Engineering
10, (2) (2012), pp. 43-48.
Független idéző: 3, Függő idéző: 3, Összesen: 6

4. Application of response surface methodology to optimize microwave sludge conditioning for enhanced biogas production

Sándor Beszédes, Marietta Ábel, Zsuzsanna László, Gábor Szabó, Cecilia Hodúr
Annals of Faculty of Engineering Hunedoara - International Journal of Engineering 9,
(2) (2011), pp. 189-193.
Független idéző: 1, Függő idéző: 1, Összesen: 2

5. Enhanced enzymatic saccharification of agri-food solid wastes by microwave pre-treatment

Sándor Beszédes, Marietta Ábel, Gábor Szabó, Cecilia Hodúr, Zsuzsanna László
Annals of Faculty of Engineering Hunedoara - International Journal of Engineering 9,
(3) (2011), pp. 453-458.
Független idéző: 4, Függő idéző: 1, Összesen: 5

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik doktori értekezésem elkészítésében segítettek.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Dr. Hodúr Cecilia egyetemi tanárnak, hogy a doktori munkám elkészítése során mindig számíthattam rá, a kísérleti munkámban és az eredmények értékelésében és elemzésében, valamint a disszertációm készítésében nyújtott önzetlen segítségéért, folyamatos támogatásáért. Köszönöm, hogy szakmai tudásával elősegítette fejlődésemet, nélküle soha nem jutottam volna idáig.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Keszthelyi-Szabó Gábor Dékán Úrnak hogy lehetőséget biztosított kutatómunkám elvégzéséhez az SZTE Mérnöki Kar, Folyamatmérnöki Intézetében, illetve szakmai problémáim megoldásában tudásával mindvégig segítette munkámat, támogatott a tanulmányaim során és a kutató munkám nehézségeiben.

Köszönettel tartozom továbbá Prof. Dr. Rajkó Róbert egyetemi tanárnak, aki kiemelkedő segítséget nyújtott a kemometria területén, kutatómunkám során mindvégig hathatós segítséget nyújtott a kísérlettervezés elsajátításában és alkalmazásában.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. László Zsuzsanna egyetemi docensnek, aki kutatómunkám során mindvégig kiemelkedő szakmai tudásával elősegítette fejlődésemet, továbbá az SZTE Mérnöki Kar, Folyamatmérnöki Intézetének, hogy kutatómunkámat itt végezhettem el, és az SZTE Mérnöki Kar minden dolgozójának, doktori képzésem alatt nyújtott segítségükért, támogatásukért, biztatásukért.

Hálával tartozom Szüleimnek, Testvéremnek, Férjemnek, valamint a tágabb családomnak és barátaimnak az önzetlen támogatásért, és hogy mindvégig mellettem álltak, biztattak.