

SZENT ISTVÁN EGYETEM
ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

**BÚZAKORPA ÉS PAPÍRHULLADÉKOK
BIOETANOL CÉLÚ HASZNOSÍTÁSÁNAK
MODELLEZÉSE**

FARKAS CSILLA

Doktori (PhD.) értekezés

Budapest

2019.

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Simonné Dr. Sarkadi Livia DSc**

egyetemi tanár

SZIE, Élelmiszertudományi Kar

Élelmiszerkémiai és Táplálkozástudományi Tanszék

Témavezetők: **Dr. Nguyen Duc Quang PhD**

egyetemi tanár

SZIE, Élelmiszertudományi Kar

Sör- és Szeszipari Tanszék

Rezessyné Dr. Szabó Judit PhD

egyetemi magántanár

SZIE, Élelmiszertudományi Kar

Sör- és Szeszipari Tanszék

A doktori iskola- és a témavezetők jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Szent István Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tesz, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1	TÉMA JELENTŐSÉGE ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	5
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1	Növényi biomassa	8
2.1.1	A növényi biomassa és hasznosítási lehetőségei.....	8
2.1.2	A lignocellulóz biomassa energetikai célú hasznosítása	11
2.1.3	A lignocellulózok összetétele és szerkezete.....	13
2.1.4	A növényi biomassa előkezelése és annak követelményei	16
2.2	Az előkezelési eljárások	19
2.2.1	Fizikai előkezelés.....	19
2.2.2	Fizikai adhézión alapuló színezőanyag eltávolítása.....	19
2.2.2.1	Flotációs technika.....	19
2.2.2.2	Kitozán biopolimer és származékainak alkalmazása	20
2.2.2.3	Mikrohullámú és ultrahangos kezelés	21
2.2.3	Kémiai és fiziko-kémiai módszerek.....	21
2.2.4	Biológiai előkezelés	23
2.2.4.1	A fonalgomba szervezetek lignocellulóz bontó enzimmészlete	26
2.2.4.2	Lignocellulóz bontó mikrobiológiai konzorciumok.....	29
2.2.4.3	Szilárd szubsztrátumon történő előkezelés	31
2.3	Bioetanol	33
2.3.1	Általános tulajdonságok és a jelentőségek.....	33
2.3.2	A második generációs bioetanol előállítás és a technológia kihívásai.....	35
2.3.3	Az enzimes szénhidrát hidrolízis	36
2.3.4	Az alkoholos erjesztés és technikái.....	38
3	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	42
3.1	Felhasznált anyagok	42
3.1.1	Lignocellulóz tartalmú alapanyagok.....	42
3.1.2	Mikroorganizmusok.....	42
3.1.3	Ipari enzimmészítmények	44
3.1.4	Tápközegek.....	44
3.1.5	Oldatok és pufferek.....	45
3.1.6	Adszorbensek.....	46
3.2	Alkalmazott módszerek.....	46
3.2.1	Törzsfenntartás.....	46
3.2.2	Inokulum tenyészet előállítása.....	47
3.2.3	A búzaborpa biológiai előkezelése	47
3.2.4	Előkészítési és tisztítási technikák a papír festékmentesítéséhez.....	48
3.2.4.1	Mosás és áztatás	48
3.2.4.2	Mikrohullámú és ultrahangos kezelések	48
3.2.4.3	Flotáció.....	48
3.2.4.4	Kitozán adszorbensek előállítása és alkalmazása.....	49
3.2.5	Lignocellulózok hidrolízise	50

3.2.5.1	Savas hidrolízis	50
3.2.5.2	Enzimes hidrolízis.....	50
3.2.6	Etanol fermentációs kísérletek.....	51
3.3	Analitikai módszerek.....	51
3.3.1	Festékanyag megkötésének meghatározása	51
3.3.2	Az oldható szénhidráttartalom meghatározása	53
3.3.3	HPLC technika.....	54
3.3.4	Alkohol tartalom meghatározása	55
4	KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	56
4.1	A búzakorpa etanol célú hasznosításának modellezése.....	56
4.1.1	A búzakorpa biológiai előkezelése	56
4.1.1.1	Fonalgomba törzsek szelektálása.....	56
4.1.1.2	Biológiai konzorciumok kialakítása és tesztelése	62
4.1.2	A gomba konzorcium teljesítményének optimalása	66
4.1.2.1	A fonalgomba törzsek arányainak meghatározása.....	66
4.1.2.2	A pH hatása.....	67
4.1.2.3	Búzakorpa nedvesítési aránya	68
4.1.2.4	Különböző beoltási technikák hatása	69
4.1.2.5	Kétlépéses biológiai előkezelés.....	70
4.1.3	Cefrézési technikák optimalása.....	71
4.1.3.1	A cellulóz enzimes hidrolízise	71
4.1.3.2	Enzim keverékek alkalmazása	72
4.1.4	Alkoholos erjesztési műveletek búzakorpa hidrolizátumon	74
4.1.4.1	Erjesztési kísérletek élesztő monokulturákkal	74
4.1.4.2	Erjesztési kísérletek baktérium monokultúrával	77
4.1.4.3	Ko-fermentációs erjesztési kísérletek.....	78
4.2	Papír hulladékok etanol célú hasznosításának modellezése.....	81
4.2.1	Előkészítő és tisztítási műveletek	81
4.2.1.1	Mosási és áztatási technikák	81
4.2.1.2	Mikrohullámú és ultrahangos kezelések hatása	82
4.2.1.3	Az alkoholos flotálási technikák	84
4.2.1.4	Kitozán és módosított kitozán biopolimerek festékanyag megkötése.....	86
4.2.1.5	Papír mintákon lévő festék eltávolítása.....	88
4.2.2	A papír hidrolizátumok alkoholos erjesztése	89
4.2.2.1	Néhány élesztő monokultúra hatása az etanol koncentráció alakulására ...	89
4.2.2.2	Különböző erjesztési technikák összehasonlítása	91
4.2.2.3	Ko-fermentációs erjesztési kísérletek.....	92
4.3	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	94
5	ÖSSZEFOGLALÁS.....	96
6	SUMMARY	99
	MELLÉKLET	102
	M1. IRODALOMJEGYZÉK.....	102
	KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	118

1 TÉMA JELENTŐSÉGE ÉS CÉLKITŰZÉSEK

„A természetben nincsenek sem jutalmak sem büntetések: következmények vannak.”

Robert Green Ingersoll

A mai világban egyre nagyobb kihívást okoz a növekvő népesség energiaigényeinek biztosítása. E probléma megoldásához és a hosszabb távon fenntartható energetikai rendszerek kialakításához a primer (fosszilis) energiahordozók kiaknázását mérsékelni kell, ami az energiahatékony technológiák alkalmazásával, valamint a megújuló és megújítható energiahordozók energiaellátáson belüli részesedésének növelésével történhet. Az erdészet, a mezőgazdaság, valamint az egyes ipari ágazatok (cellulóz- és papíripar, textilipar stb.) tevékenysége során évente igen nagy mennyiségben növényi maradványok, melléktermékek és hulladékok keletkeznek, amelyek ma még kiaknázatlan energiahordozókként (cellulóz, hemicellulóz), bio-energetikai termékek (biogáz, biohidrogén, bioetanol, biobutanol stb.) előállításához kiválóan hasznosíthatóak. A kutatók és a gyártók törekvéseinek köszönhetően a másodgenerációs bio-konverziós technológiák kidolgozása és fejlesztése intenzíven kutatott területté vált. A másodgenerációs bioetanol előállításával és széleskörű alkalmazásával a környezetet (nagyobb mértékben) terhelő benzin használatát csökkenteni lehetne, továbbá a világszerte agályokkal övezett elsőgenerációs technológiák kiváltásához biztosítana részbeni megoldást.

Az új, alternatív energiatermelési technikák magvalósítása terén azonban problémát okoz a lignocellulóz biomassa összetett és a biokémiai hatásokkal szemben ellenálló szerkezetének feltárása, az értékes szénhidrátok elválasztása és monomerekké történő bontása, ezáltal a gazdaságos és hatékony etanol előállítási technológia kivitelezése. Az előkezelések terén még nem érték el nagy áttöréseket annak ellenére, hogy ma már számos módszer ismert. Az előkezelés mellett további kritikus technológiai művelet az előkezelt biomassa enzimes hidrolízise, alkoholos erjesztése, valamint a keletkező hulladékok hasznosítása, kezelése és ártalmatlanítása. E nehézségeket csak egy igen összetett technológiával lehetne megoldani, ami ma még nem áll rendelkezésünkre.

Az elmúlt években nagy érdeklődés mutatkozott a növényi biomassa mikrobiális előkezelésére, amelynél a mikroorganizmusok az általuk szintetizált cellulolitikus és az egyéb hidrolitikus, valamint oxidatív enzimeikkel végzik el a szerkezet feltárását és a szénhidrátok részbeni (vagy akár teljes) bontását. E biológiai módszer az iparban alkalmazott fiziko-kémiai módszerekkel - sav katalizált gőzrobbantás, ammónium-szálas

gőzrobbantás, nedves oxidáció stb. - szemben ugyan a környezetet kíméli, de a hatékonysága és az időigényessége miatt az alkalmazása laboratóriumi és félüzemi szinten tart.

A papírhulladékok (harmadlagos növényi maradványok) kémiai szerkezete kevésbé összetett, valamint a szénhidrát összetételben szinte homogénnek (cellulóz) tekinthetőek, emiatt azok szintén nagy potenciállal rendelkeznek az etanol célú hasznosítás terén. A papírhulladékok gyártástechnológiába történő bevezetésénél azonban az elsődleges problémát a kísérő adalék- és színezőanyagok eltávolítása okozza.

Doktori munkámban célul tűztem ki két, éves szinten igen nagy mennyiségben keletkező növényi mellékterméknek, a búzakorpának (malomipari melléktermék) valamint a papírhulladékoknak az előkezelését, enzimes hidrolízisét és etanol célú hasznosítását. E két szubsztrátumot a magas cellulóz tartalom miatt választottam a második generációs bioetanol előállítás modellezéséhez.

Az alábbi részfeladatokat terveztem:

1. A búzakorpa szubsztrátum előkezelése

- Különböző mezofil, komposztból is izolálható korhadást okozó gombák, valamint élesztők beszerzése és törzsfenntartása.
- A beszerzett törzsek laboratóriumi szinten történő alkalmazása biodegradációs kísérletekhez, kontrollált körülmények között, finoman őrölt búzakorpa szubsztrátumon. A jó biodegradációs tulajdonsággal rendelkező törzsek szelektálása.
- A kiválasztott törzsek társíthatóságának vizsgálata, két és három törzs közötti kölcsönhatások feltérképezése.
- A kialakított, mikrobiális konzorcium alkalmazásával az előkezelés paramétereinek optimalálása:
 - a szabad nedvességtartalom
 - a pH
 - a konídiumok aránya
 - időben eltolt beoltási technikák

2. A hulladék papír szubsztrátumok előkezelése

- Különböző fizikai és fiziko-kémiai módszerek alkalmazása a papírostokon lévő festékanyagok és egyéb nemkívánatos komponensek eltávolításához:
 - áztatás és mosás
 - besugárzásos technikák

- flotáció
- kitozán és annak módosított változatai

3. Az előkezelt biomassza enzimes hidrolízise és alkoholos erjesztése

- Enzimes cefrészési technológia fejlesztése az erjeszhető cukortartalom növeléséhez.
- Különböző erjesztési technikák alkalmazása és fejlesztése:
 - mono- és vegyes kultúras etanolfermentáció
 - szeparált cukrosítás- és erjesztés (SHF)
 - szimultán cukrosítás és erjesztés (SSF)
 - SHF és SSF technikák összehasonlító elemzése.

A doktori kutatómunkámat a Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Sör- és Szeszipari Tanszék laboratóriumaiban végeztem.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Növényi biomassza

2.1.1 A növényi biomassza és hasznosítási lehetőségei

Megújuló és megújítható energiahordozóknak azokat a természeti forrásainkat tekintjük, amelyek egész évben ugyanonnan és ugyanolyan minőségben ismételten állnak rendelkezésre, valamint az újtatermelődésük emberi beavatkozás nélkül is (néhány éven belül) biztosított. Ezek között található a nap-, a víz-, a szél-, a geotermikus energia és a biomasszából nyert energia, továbbá néhány kutató itt említi az atomenergiát is. A biomassza a primer (fosszilis) energiaformákat (kőszén, kőolaj, földgáz) követően a negyedik nagy potenciállal rendelkező energiahordozó, ami széleskörűen hasznosítható számos ipari területen (BAI, 2004; HANCSÓK, 2004).

A biomassza - szűkebb értelemben - az adott élettérben egy adott pillanatban megtalálható, biológiai úton lebontható élőlényeket (növények, állatok, mikroorganizmusok) és elhalt szerves anyagokat összesíti. Eredet szerint a biomasszának három alapvető típusa: a növényi fotoszintézis által előállított elsődleges biomassza, az állattenyésztés termékeit és melléktermékeit, hulladékait hordozó másodlagos biomassza, valamint a szerves anyagokat hasznosító ipari ágazatokból és a kommunális szerves hulladékokból származó harmadlagos biomassza ismert (SEMBERY és TÓTH, 2004; SAJITH *et al.*, 2016).

Hazánkban a növényi biomassza (fitomassza) készlet a kedvező éghajlati- és domborzati tulajdonságoknak köszönhetően megközelíti a 350-360 millió tonnát, amiből mintegy 105–110 millió tonna újratermelődik évente. Az **1. táblázat** néhány hazai erdészeti és szántóföldi maradvány keletkezésének éves mennyiségét szemlélteti.

1. táblázat: Néhány mezőgazdasági, erdészeti és ipari melléktermék keletkezésének éves mennyisége hazánkban (GÖGÖS, 2005)

Melléktermék	Termelt mennyiség (millió tonna)
Gabona szalma	4,5-7,5
Kukorica csutka	10-13
Kukoricaszár	1-1,2
Napraforgó venyige	0,4-1
Nyesedék	1-1,2
Fa hulladékok ágak, faforgács, fűrészpor stb.	28-36

A mezőgazdaságban, az erdészetben és egyéb növényi biomasszát feldolgozó ágazatokban keletkező melléktermékek, hulladékok (lignocellulóz biomassza) nagy hányadát - becslések szerint akár 60-80 %-át is - összetett szénhidrátok (cellulóz, hemicellulóz) teszik ki. E növényi biomassza kezelése, hasznosítása ma még nagyrészt hagyományos eljárásokkal történik, azonban az elmúlt időszakban e kiaknázatlan energiahordozók (cellulóz, hemicellulóz) alternatív hasznosítási lehetőségeinek feltérképezése intenzíven kutatott területté vált (KUHAD és SINGH, 2008; SÁNCHEZ *et al.*, 2009; BÜKI, 2010).

A növényi maradványok nagy százaléka a kellő előkezelést követően állati takarmányként, alomként hasznosul. A talaj termőképességének biztosítása és javítása érdekében szerves trágya és komposzt előállításához is alkalmazzák, de közvetlenül a talajba történő visszaforgatása is ismert. Az elmúlt években tapasztalt csökkenő haszonállat létszám azonban egyre erősödő problémát okoz e két, racionális alkalmazási területnél (állattartás, növénytermesztés). A szántóföldeken visszamaradt, kezeletlen növényi maradványok lebomlása igen sok időt igényel, ami miatt a szántóföldi területek nehezebben válnak művelhetővé. Ez utóbbi probléma ma már kiküszöbölhető az e célra kialakított lignocellulóz bontó mikrobiológiai készítmények alkalmazásával, amelyek az összetett növényi szerkezet kellő lazítását, bontását, ezáltal a talaj szerves anyag pótlását teszik lehetővé (HUBBE *et al.*, 2010). A növényi maradványok közvetlen úton történő elégetésének - a tökéletlen égés miatt - komoly környezet terhelő hatása van, ezért az e módon történő melléktermék- és hulladékkezelés nem tekinthető hosszabb távon alkalmazhatónak. A jelentős energiataralomnak köszönhetően, azonban termikus átalakítással hő- és villamos energia termelhető, ezáltal bizonyos mértékben csökkenthető az ipari tevékenységek fosszilis energiahasználata. A szántóföldi növények betakarítása után visszamaradt szalmafélék igen jó égési tulajdonságokkal rendelkeznek, valamint azok nedvességtartalma csupán 10-20 % között van. Az egyéb növényi maradványoknál (kukoricacsutka, napraforgószár, faapríték, szőlővenyige stb.) a nedvességtartalom igen változó, emiatt az elégetést megelőzően a növényt szárítani kell, ami a technológia költségeit növeli (ANWAR *et al.*, 2014; MARQUES *et al.*, 2008; SÁNCHEZ, 2009).

Az ipari ágazatok között kimagaslóan nagy mennyiségű szilárd hulladékot termel a cellulóz- és a papíripar, valamint a textilipar. A papír előállítás elsődleges alapanyagaként a tűlevelű (lucfenyő, erdei fenyő stb.) vagy lombos (rezgő nyár, nyírfa stb.) fából kémiai valamint mechanikai úton kinyert növényi rostok szolgálnak, amelyek mellett a különböző gabonaféléknek (hazánkban a búzaszalma), valamint a bambusznak a rost tartalma is hasznosítható. A különböző papír termékek (irodai papír, újságpapír, kartonpapír, stb.)

használatukat követően rövid időn belül hulladékká alakulnak. A papírhulladékok összetétele viszonylag homogén, nagyrészt cellulóz rostokat tartalmaznak, ami miatt gyorsan lebomlóak, azonban az előállításuk már közel sem tekinthető környezetkímélőnek. Ennek oka, hogy a gyártástechnológia energia igénye nagy, valamint nagy mennyiségű szennyvizet bocsát ki. Becslések szerint, évente a világon keletkező papír hulladék mennyisége megközelíti a 370 millió tonnát, melynek hazai viszonylatokban a becsült értéke 700-750 ezer tonna. Az Európai Papíripari Szövetség (CEPI) adatai szerint 2016-ban a papír hulladékok újra hasznosításának aránya Európában elérte a 73 %-ot, amely a későbbiekben várhatóan további növekedést mutathat (CEPI, 2016). A primer rostok mellett a visszanyert, szekunder rostok ágazatba történő visszaforgatása és újra hasznosítása egyre nagyobb teret nyer. A szekunder rostok előnye, hogy azok hasznosításával a környezetet terhelő hatás csökkenthető, másrészt az ára, a közel hasonló minőségű primer rostokéval szemben, kedvezőbb. A szekunder rostok szerkezete, minősége azonban közel 4-7 alkalommal történő használatot követően romlást mutat, s ezen elhasználdott rostokat célszerű már más, alternatív módon hasznosítani (NAGY, 2011, LELE és VÍG, 2007). Egy korábbi, 2011-es közlemény arról számolt be, hogy a papíripari hasznosítás mellett, a papír hulladékok kisebb része (kevesebb, mint 7 %-a) termikus átalakítással alternatív energiatermeléshez, illetve ennél is kisebb része (kevesebb, mint 0,5 %-a) biológiai úton történő kezelést követően komposztként hasznosult (CEPI, 2011).

Az új, alternatív kezelési eljárásokkal, az alkotóelemek szelektív elválasztásával, biofinomításával előállított értéknövelt (közti)termékek valamilyen más, már ipari szinten előállított (közti)termékek alternatív helyettesítői, részbeni kiváltói lehetnek (MOLNÁR *et al.*, 2013). A növényi hetero-mátrix szénhidrát összetevői, elsősorban a cellulózok és a hemicellulózok, többek között humán-célú élelmiszerek és élelmiszer-összetevők előállításához is használhatóak (HÖLKER *et al.*, 2004; RAHMAN *et al.*, 2006; MUSSATTO és TEIXEIRA, 2010). A cellulóz élelmi (diétás) rost forrásként tekinthető, ami mellett emulgeálószerként, térfogatnövelőként történő alkalmazása is ismert. A hemicellulózok természetes formában oligoszacharidokat tartalmaznak. A hemicellulóz rostfrakciók, nagyobb részt a xilán, valamint a mannán rostfrakciók enzimes bontásával, prebiotikus hatású xilo-oligoszacharidok (XOS) és manno-oligoszacharidok (MOS) állíthatók elő. E termékeket funkcionális élelmiszerösszetevőként is alkalmazzák, az emberi szervezetre gyakorolt jótékony hatásuk miatt (CANILHA *et al.*, 2013; OTIENO és AHRING, 2012). Az élelmiszeriparban és a cukrásziparban is széleskörűen használt növényi eredetű cukorhelyettesítők, a cukoralkoholok - szorbit, mannit, xilit stb. - előállításához az erdészeti és mezőgazdasági eredetű növényi rostok szintén kiváló lehetőséget biztosítanak

(ERYASAR és KARASU-YALCIN 2016). További kutatások folynak a lignocellulóz biomasszán történő enzim szintézis, antibiotikum, egysejtfehérje (SCP) és más termék (glükonsav, itakonsav, tejsav, aszkorbinsav, felületaktív anyagok, bioműanyagok stb.) előállításának megvalósítására is (BROWN, 2003; KIM és DALE, 2004; OKANO *et al.*, 2009; SÁNCHEZ *et al.*, 2002).

A papíripari ágazatból származó rost maradványokat és törmelékeket nagy mennyiségben alkalmazza az építőipar szigetelő gipszrost lemez gyártásához (NISHIMURA *et al.*, 2015; BARÓTFI, 2003). Ezzel ellenben, a szennyvizek kezelése már nagyobb gondot okoz, mivel azok jelentős szervesanyag tartalma miatt a környezetbe közvetlenül nem bocsáthatóak ki. Kutatások bizonyították, hogy a szekunder rostokból történő cellulóz- és papírgyártás akár 60 %-kal csökkentheti a keletkező szennyvíz mennyiségét. A szennyvizek hemicellulóz tartalma számottevő, emiatt annak elválasztásával azon takarmányélesztő állítható elő. A tülevelű fákból történő cellulóz és papír előállítás esetén a szennyvízből értékes fenyőgyanta is nyerhető (BAJPAI, 2010).

A növényi maradványok kisebb mennyiségben aromás komponenseket (lignin) is tartalmaznak, amelyeket viszonylag még kevés termék előállításánál lehet hasznosítani. A növényi biomassa típusára jellemzően eltérő összetételű, aromás komponenseket tartalmazó kátrány vagy szén előállítható elő. A lignin cserzőanyagok, diszpergálószeres alapanyagként is alkalmazható, sőt oxidatív úton ételízesítő aroma, vanillin gyártására is alkalmas (NUNN *et al.*, 1985; KUDSY, 1995; LIMAYEM és RICKE 2012).

A hazai kutatások vonatkozásában a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszékén évek óta mélyrehatóan foglalkoznak a lignocellulózok - kukoricarost, kukoricacsutka, kukoricaszár, búzaszalma, búzakorpa, hulladékpapír, olajbogyó mag, cukorcirok bagasz - biofinomításával, az értéknövelt hasznosítási technológiák kivitelezésével laboratóriumi- és félüzemi szinten.

2.1.2 A lignocellulóz biomassza energetikai célú hasznosítása

A klímaváltozást és ennek következményeként a világszintű környezeti problémákat a primer (fosszilis) energiahordozók rohamos kitermelése és elégetése okozta. Becslések szerint, e kitermelt energiahordozók több, mint 80 %-a a gépjárművek motorhajtóanyag előállításánál hasznosul, amelynek közel 60 %-a a közlekedési szektorba kerül. Ez a magyarázata annak, hogy az üvegházhatású gázok (vízgőz, szén-dioxid, dinitrogén-oxid stb.) kibocsátásáért közel 30%-ban a közlekedési ágazat érintett a fejlett országokban (POPP és POTORI, 2008). Az energiahordozók kisebb része különböző ipari ágazatok között oszlik

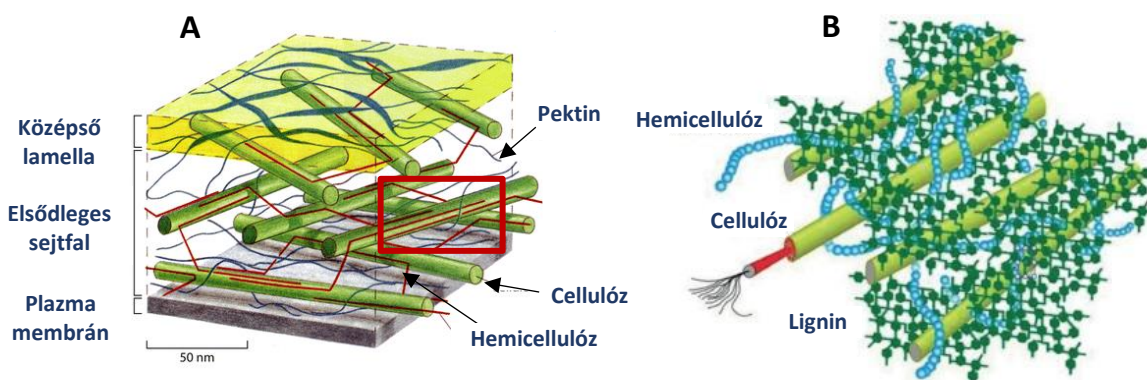
el. A cellulóz- és papírgyártás az energiahasználat közel 4 %-át veszi igénybe. A primer energiahordozók gazdaságosan kitermelhető mennyiségének apadása, valamint ennek hatásaként érzékelhető növekvő árak, a gazdasági fejlődés ütemét is korlátozza. Ezen negatív hatásokat tovább erősíti, hogy a fosszilis energiahordozók egyenetlen földrajzi eloszlása miatt számos ország importfüggőségben áll. A probléma enyhítése és ezzel párhuzamosan a népesség növekvő energiaigényének biztosítása miatt intenzív kutatások és politikai törekvések (EU direktívák és hazai szabályozások) irányulnak a környezettudatos energiahasználat, illetve az új, alternatív energiahordozók megismerése terén (CHENG *et al.*, 2008; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015). A lágyszárú növények és maradványaik, a tudatosan termesztett energia ültetvények, valamint a fásszárú növényi maradványok (fűrészpor-, fa- és kéreghulladék stb.) és gyorsan növekvő fafajták (nyár, akác, fűz, stb.) mellett a mezőgazdaságban, az élelmiszeriparban és egyéb ipari ágazatokban keletkező növényi maradványok szerepe egyre jelentősebb a fenntartható energiagazdálkodásban, a magas energiatartalomnak köszönhetően egyaránt alkalmazhatóak alternatív, bioenergia előállításához (PRASAD, 2007).

A lignocellulózok e módon történő hasznosítása számos, különböző technikával: mechanikai, termokémiai, valamint biokémiai úton, az értékes komponensek elválasztását követően vagy akár ezen művelet nélkül, a teljes növényi maradvány hasznosításával történhet. Az előállított energia gáz, szilárd és cseppfolyós halmazállapotú is lehet. A mechanikai átalakítás alatt a növényi maradvány daraboláson, tömörítésen vagy sajtoláson esik át. Ezen a módon szilárd tüzelőanyagok - biopellet, biobrikett - is gyárthatóak. A termokémiai technológiák alkalmazásával a növényi anyagokban lévő energiamennyiség hasznos hő- és villamos energiává alakítható. A termikus kezelési technológiák között ismert alaptechnológia a hagyományos égetés, amely mellett a pirolízis, a gázosítás vagy a plazmatechnológia illetve ezek kombinációi is alkalmazhatóak. A termokémiai technológiák eredményeként szilárd biomasszából gáz halmazállapotú energiahordozó, szintézisgáz állítható elő. A pirolízis esetén a gáz fázis (pirogáz) mellett kiváló égési tulajdonságokkal rendelkező pirokksz, valamint pirolaj is keletkezik, melyek az erőművekben a kőszén és az olaj helyett használhatóak. A pirolaj átalakításával akár alternatív motorhajtóanyag, biodízel is előállítható. A cellulóz- és papírgyártás során keletkező iszapok, lúgok és egyéb szerves anyagok (növényi részek) szintén nagy energiatartalommal rendelkeznek, amelyek a kívánt előkezeléseket (ülepités, tisztítás, besűrítés) követően elégetésre kerülnek. A termikus kezeléseik előnye az, hogy részben biztosítható az adott technológia energiaigénye, valamint csökkenthető a szén-dioxid és egyéb káros gázok kibocsátásának mértéke (DONGHAI, 2006).

A biokémiai technológiák alkalmazásával, mikroorganizmusok és az általuk termelt enzimek segítségével, két úton, az anaerob lebontással (rothasztás) és az alkoholos erjesztéssel állíthatók elő energiahordozók, amelyek alternatív üzemanyagként (biobutanol, bioetanol stb.) is használhatóak (SHAFIEI *et al.*, 2015). Az Európai Parlament strasbourggi ülésén (2018) megszavazott megújuló energia használatról szóló irányelv javaslata szerint a zöld energia arányát 2030-ra 35 %-ra kellene emelni az energiaellátáson belül, ahol a lignocellulóz tartalmú növényi maradványok energetikai célú hasznosításának elsőbbséget kell élveznie. A további célok között szerepel, hogy a közlekedési szektor energia ellátásának egy részét (közel 12 %) megújuló forrásokkal váltsák ki, mindamellet pedig az elsőgenerációs élelmiszer-alapú etanol gyártás az előző évek szintjén maradjon.

2.1.3 A lignocellulózok összetétele és szerkezete

A növények sejtvezát alkotó három fő polimer vegyület a cellulóz, a hemicellulózok és a lignin, amelyek kovalens és nem kovalens kötésekkel összetett, ellenálló, szerkezetet alakítanak ki (SJÖSTRÖM 1981; PÉREZ *et al.*, 2002). Az **1. ábra** a növényi sejtfa szerkezetét, illetve az egyes sejtfa összetevőket szemlélteti.



1. ábra: A növényi sejtfa elsődleges szerkezete és alkotóelemei (A), valamint az érissel átalakult hetero-mátrix részlete (B) (WANG *et al.*, 2017; MARRY, 2018)

A cellulóz a Földön a legnagyobb mennyiségben megtalálható szerves anyag, a növények váz anyagának nagy részét képezi, ami a magasabb rendű növényeknél általánosan 40-50 %-ot jelent. A természetben, tiszta formában nem található - a gyapot cellulóz tartalma is csak a 90 %-ot éri el. Ezzel szemben, az ipari termékek között a vatta és a papír is akár 100 %-ban cellulóz molekulákból tevődhet össze. Kémiai szerkezete hasonlít a keményítőéhez, lineárisan ismétlődő anhidro-glükóz egységekből (100-15000) áll, azonban a glükóz molekulák az α -1-4 kötések helyett β -1-4 térállású kötésekkel kapcsolódnak össze. E szerkezeti eltérés miatt a cellulóz bontásához a keményítő bontó enzimek nem alkalmasak.

A biodegradációt tovább nehezíti, hogy a szomszédos, parallel elrendeződésű cellulóz molekulák között a kialakuló másodlagos kötőerők, az inter- és intramolekuláris hidrogén-híd kötések, valamint a gyengébb van der Waal's kötések és hidrophil kölcsönhatások, szupramolekuláris szerkezetet alakítanak ki (HA *et al.*, 1998; MCKENDRY *et al.*, 2002; MUSSATTO *et al.*, 2008). A növényi sejtvezban a cellulóz szálak nagyobb részét, közel kétharmadát, stabil, igen nagy rendezettséggel rendelkező kristályos forma jellemzi. A cellulóz akár többféle kristályos szerkezettel is rendelkezhet (I.-IV.), amelyek közül a természetben csak az I. típus található. A magas kristályosodási arány miatt vízben, valamint híg savas és híg lúgos oldatokban szobahőmérsékleten nem vagy korlátozottan oldódik. A kevésbé rendezett, amorf szerkezetű cellulóz szálak aránya jóval kisebb a növényi sejtvezban. A papíripari termékek gyártásánál egyre nagyobb arányban alkalmaznak ipari, valamint erdészeti, mezőgazdasági eredetű maradványokból származó növényi rostokat. E növényi eredetű cellulóz rostok mellett kémiai, valamint mechanikai cellulóz, esetleg mesterséges növényi rostok (viszkocellulóz) illetve szintetikus rostok (töltött polietén) is megtalálhatóak (ZHANG *et al.*, 2006; TAHERZADEH és KARIMI, 2008).

A hemicellulózok nem lineáris szerkezetű, nagymértékben elágazó heteropoliszacharidok, amelyek a növényi biomassza mintegy 20-45 %-át teszik ki. A hemicellulózok összetétele és kémiai szerkezete növény típusonként és azok részeinél is eltéréseket mutat. A hemicellulóz láncok hossza kisebb, mivel a cellulózzal ellentétben jóval kevesebb egységből (150-1500) állnak. A szénhidrát vázon nagyszámú oldallánc található, amelyből adódóan kevésbé kristályos, rendezett a hemicellulózok szerkezete (JEFFRIES, 1994; PÉREZ *et al.*, 2002; NI és TOKUDA, 2013). A hemicellulózok pentóz (xilóz, arabinóz) és hexóz (glükóz, galaktóz, fukóz, mannóz, rhamnóz) cukrokból, valamint azok acetilezett származékaiból állnak (TIMELL, 1997). A csoportosításuk elsősorban a váz szénhidrát egysége(i) szerint történik, ezáltal vannak a xilánok, a mannánok, a glükánok, a galaktoglükomannánok, a glükuronoxilánok, az arabinoxilánok, a glükomannánok, a galaktomannánok, a β -glükánok és a xiloglükánok (ASPINALL, 1962). A hemicellulózok a cellulóz szálakhoz főleg hidrogén-kötésekkel, a ligninnel pedig nagyrészt kovalens kötésekkel kapcsolódnak, amelyek egyrésztől védelmet adnak a cellulóz szálaknak, másrészt pedig összeköttetést biztosítanak a cellulóz szálak és a lignin régiói között. A természetben a legnagyobb mennyiségben előforduló hemicellulóz a xilán (SUN *et al.*, 2005).

A lignin összetett aromás heteropolimer vegyület, amely fenil-propán vázmolekulákból, kumaril-alkoholból, koniferil-alkoholból és szinapil-alkoholból áll. Ezen egységek egymással, valamint a cellulózzal és a hemicellulózzal éter- és észter kötésekkel, illetve szén-szén kötésekkel kapcsolódnak össze, ezáltal háromdimenziós, térhálósított

szerkezetet alakítanak ki (JEFFRIES, 1994; RALPH *et al.*, 2004). A növényi sejtváz cellulóz és hemicellulóz tartalma erősen hidrofil, amellyel szemben a lignin erősen hidrofób, ami a víz és az enzim molekulák rostok közé történő behatolását megnehezíti. A lignin a növényi szövetek számára a szilárdságot, a merevséget, továbbá a kémiai és biológiai hatások elleni védelmet is egyaránt biztosítja (MUSSATTO *et al.*, 2008; XIE, 2000).

A növények kémiai összetétele növény típusonként - a keményfákban, a puhafákban, a lágyszárú növényekben, a gabonanövényben, valamint az ezekből készített termékekben és maradványaikban - eltérő. Az alkotó elemek arányát továbbá meghatározza a növény növekedési szakasza és kora, a termesztés helye, valamint a környezeti viszonyok is. A cellulóz, a hemicellulóz és a lignin százalékos megoszlását szemlélteti az **2. táblázat** néhány növényi maradvány esetén.

2. táblázat: Néhány elsődleges és másodlagos növényi eredetű melléktermék, hulladék cellulóz, hemicellulóz és lignin tartalma (MAES és DELCOUR, 2002; BEAUGRAND *et al.*, 2004; KRISTENSEN *et al.*, 2009)

Biomassza	Cellulóz*	Hemicellulóz*	Lignin*
Kukoricaszár	39 – 47	26 – 31	3 – 5
Napraforgó szár	42,1	29,7	13,4
Kukoricacsutka	15	35	45
Búzaszalma	37 – 41	27 – 32	13 – 15
Búzakorpa	10-15	30	4-8
Árpaszalma	31 – 45	27 – 38	14 – 19
Cirokszalma	32	24	13
Cukornád bagasz	19-24	27-32	32-44
Cirok szár	27	25	11
Keményfa	45 ± 2	30 ± 5	20 ± 4
Keményfa kéreg	22 – 40	20 – 38	30 – 55
Puhafa	42 ± 2	27 ± 2	28 ± 3
Puhafa kéreg	18 – 38	15 – 33	30 – 60
Energiafű	52	26	20
Papír hulladék	18 – 30	25 - 40	1-15

*Az adatok % (m/v)-ban szerepelnek.

Általánosan elmondható, hogy a növényi biomassza szárazanyagtartalmának közel 55-75 %-a szénhidrát, aminek mintegy 38-58 %-át a cellulóz, 23-32 %-át a hemicellulóz, 15-25%-át a lignin teszi ki (MCKENDRY, 2002; SINDHU *et al.*, 2016). A vázanyagok mellett

kisebbségi mennyiségben más összetevők, extrahálható anyagok (zsírsavak, fitoszterolok, terpenoidok stb.), szerves anyagok (kálium, kalcium, magnézium, nátrium, vas, mangán stb.), továbbá keményítő, pektinek és fehérjék is találhatóak.

A másodlagos növényi maradványok között a búzakorpa, mint malomipari melléktermék, csupán 4-8 %-ban tartalmaz lignint. A búzakorpa a gabonaszemek közel 14-19 %-át teszi ki, amely a külső burkolatból, az aleuronrétegből és a visszamaradt keményítő tartalmú endospermből tevődik össze. A cellulóz és a keményítő mellett a hemicellulóz tartalmának nagyrészt az arabinoxilánok teszik ki, ahol a β -1-4-xilopiranoz egységek alkotta főláncához nagy számban α -L-arabinofuranozil egységek kapcsolódnak. (EBRINGEROVÁ *et al.*, 2005; PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005).

A papíripari ágazat a cellulóz rostokon kívül különböző adalékanyagokat is alkalmaz a késztermék előállításához, amelyek között töltőanyagok (kaolin, gipsz stb.), enyvező anyagok (fenyőgyanta, műgyanták stb.), bevonó anyagok (kálcium-karbonát, titánium-dioxid, viasz, keményítő) is vannak. Ezen anyagok a kívánt minőségi paraméterek (simaság, szilárság, nedvszívó képesség stb.) kialakításában játszanak szerepet (IOELOVICH, 2014). A papír emellett még tartalmaz kísérőanyagokat is, amelyek nagyrészt a nyomdaiparhoz köthetők. Ezek között találhatóak a színezőanyagok, amelyek három fő alkotóeleme a petróleum vagy növényi olajok (55-85 %), a gyanta (0-20 %) valamint a festék pigmentek (5-20 %) (LELE és VÍG, 2007).

2.1.4 A növényi biomassza előkezelése és annak követelményei

A növényi (és növényi eredetű) maradványok értékes komponenseinek elválasztásához elengedhetetlen művelet az előkezelés, ami során a komplex szerkezet megváltozik, a részbeni átalakítási folyamatok következtében bomlás indul el, ezáltal a szénhidrátok elérhetővé válnak a különböző, biofinomított termékek előállításához. Kutatások bizonyították, hogy az etanol célú hasznosításnál amennyiben a lignocellulóz alapú biomassza enzimes hidrolízisét megelőzően nem végeznek előkezelést, azáltal az elméleti cukorhozamnak kevesebb, mint 20 %-a érhető el. Az előkezelés alkalmazásával ez az érték akár 90 %-ra is növelhető (ALIZADEH *et al.*, 2005; BENSAH és MENSAH, 2013). Néhány esetben ez a művelet lehet egy enyhébb szerkezet bontás vagy dúsítás is, azonban a növényi anyagok többsége az eltérő kémiai összetétel és szerkezet miatt ennél bonyolultabb technológiák alkalmazását igényli. HAHN-HÄGERDAL és munkatársai (2006) több kutatóhoz hasonlóan, tanulmányukban arról számoltak be, hogy a különböző növényi anyagokat típusonként más-más módon célszerű előkezelni, mivel olyan egységes előkezelési mód nem létezik, amit minden esetben azonos hatékonysággal lehetne alkalmazni. Az előkezelési

módszer(ek) megválasztása során, ezért az adott lignocellulóz biomassza esetén vizsgálni kell, hogy a rendelkezésre álló előkezelési technikák között, melyek azok, amelyek az előkezeléssel szemben támasztott kívánalmaknak részben eleget tesznek és mindemellett gazdaságos szerkezet bontás érhető el. A kutatók és a gyártók törekvéseinek eredményeiként ma már számos előkezelési módszer ismert, illetve áll még fejlesztések alatt. A **3. táblázat**ban néhány üzemi és laboratóriumi előkezelést, valamint azok hatásait ismertetem.

3. táblázat: Néhány előkezelési módszer hatása* a lignocellulóz biomassza szerkezet lazítására és bontására (SUN *et al.*, 2016)

Előkezelés	Cellulóz	Hemicellulóz	Lignin	Fajlagos felület	Porozitás	Inhibitor(ok)
Fizikai						
Őrlés, Darálás	H	-	-	H	H	L
Kémiai						
Lúgok	H	H	H	-	H	L
Savak	-	H	M	H	M	M
Nedves oxidáció	-	-	H	-	H	L
Szerves oldószer	-	L	H	H	M	L
Ionos folyadék	H	L	M	H	H	L
Fiziko-kémiai						
Gőzrobbantás	L	H	L	H	H	M
Ammóniaszálas robbantás	H	L	M	H	H	L
Hidrotermikus	-	H	M	M	M	H
Szuperkritikus szén-dioxid	-	L	L	H	H	L
Biológiai	-	M	H	H	H	L

*Hatások: H: számottevő; M: közepes; L: alacsony

Az előkezelések kritériumainál igen nagy fontossággal bír a porozitás csökkentése, a szénhidrátok és az aromás lignin szétválasztása, valamint a cellulóz kristályosságának csökkentése (SADDLER, 1993). A lignin kioldásával a hemicellulózok eltávolítása hatásosabbá tehető, ami révén az enzimek és a mikroorganizmusok számára a cellulóz szálak könnyebben elérhetővé válnak. További kedvező hatás, hogy az enzimek ligninen és hemicellulózon történő irreverzibilis kötődése csökken. Az előkezelés során azonban a lignin és a hemicellulózok oldatba vitelét nagymértékben meghatározzák az olyan környezeti tényezők, mint a biomassza összetétele, a nedvességtartalma, a kémhatás, a nyomás vagy a hőmérséklet (MUSSATTO *et al.*, 2008; KARIMI és TAHERZADEH, 2016).

Ahogy az előkezelések tulajdonságait, úgy a környezeti tényezőket sem külön-külön, hanem együttesen célszerű értékelni, ugyanis ezek által a későbbi technológiai műveletek hatékonysága számottevően növelhető (MAURYA *et al.*, 2015).

További technológiai kihívást jelent az előkezelés során a nem kívánt melléktermékek (inhibitorok) keletkezésének visszaszorítása, valamint eltávolítása. Ezen melléktermékek származhatnak a növényi biomasszából, valamint a technológia során is keletkezhetnek (furfural, 5-hidroximetil-furfural, hangyasav, ecetsav stb.). Az előkezelésnél célszerű mérsékelni az inhibitorok keletkezését, ugyanis azok megléte mellett az enzimek részben inaktívvá, használhatatlanná válnak, valamint az erjeszhető cukrok hozama, illetve az erjesztő mikroorganizmusok etanol képzésének képessége lényegesen csökken (BERLIN *et al.*, 2006; ANDRIC *et al.*, 2010).

A papírhulladékok esetében, mivel nagyrészt cellulózt tartalmaznak, a szerkezet megbontása nem igényel nagy energiát, termofizikai kezeléseket, ezáltal az kevésbé okoz technológiai problémát. A cellulóz mellett azonban az egyéb kísérő anyagok (adalékanyagok és színezőanyagok) nem kellő elválasztása nagyobb mértékben meghatározza a későbbi szénhidrát konverzió kimenetelét (NISHIMURA *et al.*, 2015; BUZAŁA *et al.*, 2017). Az előkezelésnél az egyes kísérőanyagok a rostsuszpenzió kémhatásának növekedését idézhetik elő, ami az enzimek aktivitására kedvezőtlenül hat, azt csökkenti. WANG és munkatársai (2011) e probléma megoldására kénsavval (cc. H_2SO_4) alakították át a kalcium-karbonátot ($CaCO_3$) kalcium-szulfáttá ($CaSO_4$), aminek már nincs gátló hatása a cellulóz rostok enzimes hidrolízisére nézve, sőt a kémhatás az enzimnek kedvező értékre állítható vissza. A nyomdaiparban használt színezőkben, festékekben lévő pigmentek ugyan kisebb mennyiségben, de nehézfémeket is tartalmazhatnak, amelyek az enzimek és mikroorganizmusok működésére szintén erősen gátló hatást fejtenek ki (IBARRA, 2012). A különböző festékanyagok eltávolításának hatékonyságát nagymértékben meghatározza annak kora, fajtája, továbbá a papír típusa, valamint a nyomtatás körülményei is. Ez utóbbi esetben, az indirekt, lézeres és xerografikus technikával felvitt festékek eltávolítása igen nehéz, mivel a színes pigmentek a hőre lágyuló (termoplaszt) gyantával (szirén-akrilát kopolimer, sztirén-butadién kopolimer, epoxi gyanta stb.) összekapcsolódnak és a cellulóz rostokra olvadnak rá (TATSIS *et al.*, 2017).

Ma már világszerte számos előkezelési eljárás áll rendelkezésre, amelyek négy csoportba, a fizikai, a kémiai, a fiziko-kémiai és a biológiai módszerek közé sorolhatók. Általánosan elmondható, hogy az előkezelések egyike sem teljesíti az előkezelés minden kívánalmát, azonban kettő vagy három módszer előnyeinek ötvözésével kialakított kombinált előkezelések alkalmazásával növelhető azok hatékonysága. Becslések szerint, az

előkezelések a lignocellulóz alapon történő etanol előállítási technológiák költségeinek számottevő részét, akár 40 %-át is kitehetik, ezért az további fejlesztéseket igényel (SUN és CHENG, 2002). A kutatók és gyártók intenzív kutatásokat végeznek a meglévő módszerek hatékonyságának növelése, továbbá nem egy, hanem több növényi anyag egyidejű előkezelési lehetőségét biztosító technológia kivitelezésének terén is (ERDEI *et al.*, 2010; TAHERZADEH és KARIMI, 2008; VALDÍVIA *et al.*, 2016).

2.2 Az előkezelési eljárások

2.2.1 Fizikai előkezelés

A mechanikai és fizikai módszerek alkalmazásával a méret csökkentése, ezáltal a fajlagos felület növelése érhető el. Ez megvalósítható őrléssel, vágással, aprítással, pirolízissel, valamint a besugárzásos technikák (gamma-, mikrohullámú- és infra sugárzás, ultrahangos szonikálás) által is (SUN és CHENG, 2002). E módszerek nagy hátránya az, hogy igen magas az energia és költség igényük, ami gátat szab az önálló alkalmazásuk elterjedésénél (MENON *et al.*, 2012). Továbbá, a besugárzásos technikák kivételével a lignin eltávolítása nem vagy kismértékben mutatható ki (KUMAR és SHARMA, 2017).

A lignocellulózok mechanikai és fizikai előkezelését, nagyrészt más előkezelési módszerekkel (kémiai vagy biológiai) kombináltan alkalmazzák (BRODEUR *et al.*, 2011).

2.2.2 Fizikai adhézió alapuló színezőanyag eltávolítása

A papírhulladékok rostszálairól történő színezőanyagok - valamint az egyéb nem kívánt komponensek, szennyeződések - eltávolítása (deinking) terén sikeresen alkalmazott módszer a mosás és a flotáció, valamint e két módszer kedvező tulajdonságainak egyesítésével a kombinált tisztítási technika is. Emellett a kutatások a szilárd porózus hordozókon (adszorbensek) történő eltávolítási technikák kivitelezésére is irányulnak, amely területen több, biztató eredmény is leírásra került (KYZAS és LAZARIDIS, 2009; HADI, 2013).

2.2.2.1 Flotációs technika

E festékeltávolítási művelet során a festék részecskék a rostsuszpenzióban elosztatott gázbuborékokkal az adhéziós erők hatására gáz-szilárd komplexumokká állnak össze. A keletkezett komplexumok sűrűsége kisebb, mint a folyadék fázisé, ezáltal felfelé szállnak és a folyadék felszínén folyamatosan megújuló réteget képeznek, ami könnyen eltávolítható. A mosási technikával szemben, a rostvesztés - a körülményektől eltérően - 5-10 % közé tehető, ami mosás esetén elérheti a 20-30 %-ot is. A magasabb rost hozamon kívül további

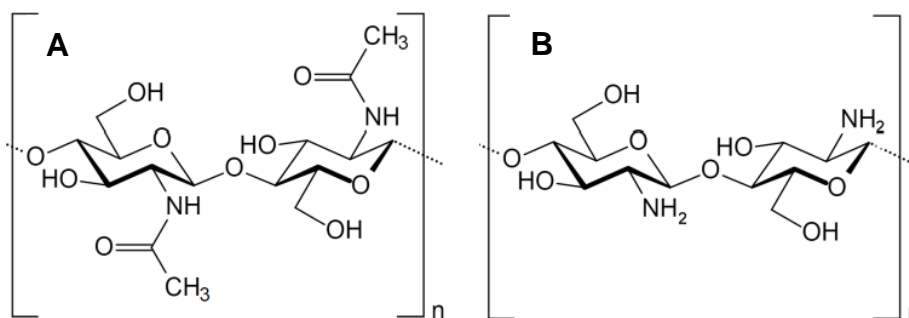
előnye, hogy a finom és ultrafinom, valamint kolloidméretű diszperz komponensek szétválasztását is lehetővé teszi, s mindezt alacsonyabb vegyszerköltség, kisebb vízhasználat és szennyvíz kibocsátás mellett éri el. A flotációt követően a papírpép besűrítése azonban a technológia költségeit növeli (CARRÉ *et al.*, 2000).

A rostok flotálására számos tényező: a festék szemcsék (10-250 μm) fizikai és kémiai tulajdonságai, a környezeti tényezők (kémhatás, hőmérséklet, levegőáram, ionkoncentráció stb.), valamint a levegőbuborékok mérete is hatással van. A hőmérséklet és kémhatás (lúgos közeg) növelése a rostok és a rostokon lévő keményítő szemcsék duzzadását segíti elő. A víz molekulák vagy levegőbuborékok megtapadásának mértékét növeli a különböző felületaktív anyagok, kemikáliák, enzimek készítmények használata (VENDITTI *et al.*, 2007). A felületaktív anyagok a felületi feszültség változtatásán keresztül hatnak, azáltal, hogy csökkentik a levegőbuborékok fajlagos felületét. Továbbá, a hidrofil tulajdonságú részecskéket hidrofóbbá tehetik, így a tintaszemcsék eltávolítása tovább fokozható (VASHISTH *et al.*, 2011; CHUTANI, 2015).

2.2.2.2 *Kitozán biopolimer és származékainak alkalmazása*

Az adszorbensek nagyrészt hidrofil tulajdonságú és poláros anyagok, valamint szén alapú, apoláros, hidrofób anyagok, esetleg polimerek, amelyek poláris vagy apoláris funkciós csoportjaiknak köszönhetően alakítanak ki felületi kötődést. Az adszorbensek között régóta használt és az egyik igen hatékony anyag az aktív szén, ami a szerkezetének és a nagy fajlagos felületének köszönhetően sokféle komponens megkötésére alkalmazható, továbbá könnyen regenerálható (PEZTOLD és SCHWARZ, 2015; RAVI *et al.*, 2016). Az utóbbi években egyre nagyobb figyelem irányul a mezőgazdaságban keletkező melléktermékek (cukornád bagasz, búzaszalma, rizs pelyva stb.), valamint a különböző biopolimerek (kitozán és módosított származékai) adszorbensként történő alkalmazhatóságának vizsgálatára. E termékek/biopolimerek olcsóbbak és nagyobb mennyiségben is állnak rendelkezésre (HUBER és CARRÉ, 2012, JIANG *et al.*, 2017).

A kitozán biopolimer a rákok páncéljában, gombákban, rovarok vázában lévő kitin acetamid csoportjainak dezacetilezésével nyerhető (ANNADUZAMAN, 2015) (2. ábra). A kedvező oldhatósági tulajdonságainak (ásványi savakkal növelhető), valamint az antibakteriális hatásának köszönhetően, alkalmazása (emulziókban, hidrogélként, sebfező anyagként, hordozóként mikro- és nanorészecske formájában stb.) széleskörűen ismert. Kutatások bizonyították, hogy a festék pigmentek megkötésében a kitozán hidroxil csoportjai (-OH) vesznek részt, míg az amino csoportok (-NH₂) a hordozó működésére fejtenek ki lényegi hatást (CRINI és BADOT, 2007; VAKILI *et al.*, 2014).



2. ábra: A kitin (A) és a kitozán (B) szerkezete (YOUNES és RINAUDO, 2015)

A korábbi kutatások eredményeit tekintve, láthatóan a kitozán adszorpciós kapacitása eltéréseket mutat az egyes változatoknál, származékoknál. A kitozán por és pehely 20-1100 mg/g, a gyöngy, a szál és egyéb módosított kitozán formák pedig 25-1653 mg/g közötti festéket tudnak megkötni (VAKILI *et al.*, 2014). Több tanulmány is említi, hogy a kitozán a festékmentesítés mellett kiválóan alkalmazható a rostok minőségi tulajdonságainak javításához is. A kitozán a cellulóz szálakkal hidrogén kötéseket alakít ki, ami a szakító szilárdságot növeli, ezáltal a szekunder rostok elhasználódásából származó veszteség csökkenthető (BOBU *et al.*, 2002; ASHORI *et al.*, 2006; NICU *et al.*, 2013).

A kitozán alkalmazásának hátránya, hogy a felületi kölcsönhatások (adszorpciós kötőerők) a hőmérséklet, a kémhatás, valamint ionkoncentráció változásának hatására könnyen megbomlanak (ROBINSON *et al.*, 2001).

2.2.2.3 Mikrohullámú és ultrahangos kezelés

A besugárzásos technikák általános működési elvét tekintve, a papír rostok és az elektromágneses mező között közvetlen kölcsönhatás alakul ki, aminek következményeként a hőmérséklet robbanásszerű növekedésével a rostok szerkezetének roncsolását idézik elő. E technikák rostokra, valamint a festék- és nemkívánatos anyagokra kifejtett hatása azonban részletesen még nem ismert. A mikrohullámú kezelés és az ultrahangos szonifikálás az előzőekben ismertetett mosási és a flotációs technikákkal szemben kevesebb vegyszer igényvel bír, továbbá nem marad vissza szennyvíz sem (DE LA HOZ *et al.*, 2005).

2.2.3 Kémiai és fiziko-kémiai módszerek

A lignocellulóz biomassa ipari szinten történő előkezelésénél a kémiai, illetve a fiziko-kémiai módszerek hatékony és gyors szerkezet bontást tesznek lehetővé. A kémiai előkezelések a kémhatású környezettől függően alkalikus, savas és neutrális előkezelések

lehetnek. A savas előkezelés régóta ismert és sikeresen alkalmazott technika. A koncentrált ásványi savak (sósav, salétromsav és kénsav) alkalmazása azonban kevésbé ajánlott, mivel a durva reakciókörülmények - a nagy sav koncentráció (10-30 %), valamint a magas hőmérséklet és nyomás - mellett viszonylag nagy mennyiségben keletkeznek nem kívánatos melléktermékek, ezzel jelentős szénhidrát veszteséget okozva (SUN és CHENG, 2002; KUMAR *et al.*, 2009). A kétlépéses, híg savas előkezelés nagyüzemi szinten alkalmazható, a hemicellulózokat hatékonyan oldatba viszi, habár az előkezelt zagy vegyszer mentesítése, valamint a korrózióval szembeni speciális, saválló és rozsdamentes acél berendezések beszerzése miatt a technológia jelentős költségekkel jár (ANWAR *et al.*, 2014; VARGA *et al.*, 2002). A lignocellulóz biomassza hemicellulóz tartalma lúgos extrakcióval szintén könnyen kioldható. A lúgok hatásaként a szénhidrátok és a lignin közötti strukturális kötések, elsősorban a hemicellulózok és a lignin közötti észter kötések megbontása, ezáltal a polimerizációs fok csökkenése következik be (VAN DER POL *et al.*, 2014). Az alkalikus előkezelés során többnyire a nátrium-, kálium-, kalcium- vagy az ammónium-hidroxid alkalmazása terjedt el. A lúg alkalmazásának hatékonyságát elsősorban a növényi anyag lignin tartalma határozza meg, ugyanis az minél magasabb, annál kisebb mértékben bontható e módon a lignocellulózok szerkezete (SINGH *et al.*, 2015).

A neutrális körülmények között végzett kémiai előkezelések között elsősorban az ozonolízis, az ionos folyadékokkal történő előkezelés vagy a hidrotermikus előkezelés ismert. A lignin eltávolításánál ígéretes eredményeket közölnek a növényi maradványok ózonnal történő kezelése esetén, ami mindezt szobahőmérsékleten és légköri nyomáson teszi lehetővé, valamint az alkalmazásával mérsékelt a toxikus melléktermékek keletkezése. Az ózon használata azonban igen költségessé teszi az előkezelést, ezért ipari szinten alkalmazása nem terjedt el. A hidrotermikus előkezelés vegyszer használat nélkül is hatásos szerkezet lazítást eredményez, azonban az energia- és víz használata igen magas, valamint a melléktermék képződés szintén nem kerülhető el, azok mennyisége viszont sokkal kevesebb, mint a széleskörűen alkalmazott ammónium-szálas robbantás (AFEX) esetén (GOH *et al.*, 2010). A szuperkritikus extrakció során inhibitorok nem keletkeznek, a szén-dioxid viszonylag könnyen visszanyerhető és ismételten alkalmazható. Az előnyök ellenére ipari szinten alkalmazása nem terjedt el, mivel a szuperkritikus szén-dioxid létrehozásához igen nagy nyomást kell biztosítani (TAHERZADEH és KARIMI, 2008). Az ionos folyadékok szintén hatékony szerkezet bontást eredményeznek, azonban toxikusok, gyúlékonyak és környezetterhelők, valamint a működési mechanizmusuk és a hasznosításukkal kapcsolatos ismeretek hiánya gátat szab az ipari alkalmazásuknak (HOU *et al.*, 2017)

A kutatások egyik iránya a fiziko-kémiai és a kombinált előkezelések vizsgálatát és fejlesztését tartja célszerűnek, melyek közül ipari szinten a gőzrobbantás (autohidrolízis) egyes változatai világszerte ismertek. E módon végzett előkezelés lényege, hogy a nagy nyomás és a telített gőz a növényi szerkezet széteséséhez vezet. Az előkezeléssel kedvező cukorhozam (glükóz) érhető el, azonban a durva reakció körülmények miatt nem kívánt, káros melléktermékek termelődésével, valamint a hemicellulózok részbeni bomlásával kell számolni (CHANDRA *et al.*, 2007; VARGA *et al.*, 2004). Az ammónium-szálas robbantás (AFEX) nagy mennyiségű ammóniát igényel, azonban ennek közel 99 %-a használatát követően visszanyerhető és a következő előkezeléseknél ismét használható. Az eljárás nagy előnye, hogy a szerkezet megbontása során a melléktermékek keletkezése mérsékelt, azonban a magas lignin tartalmú biomassza előkezelésénél kevésbé fejti ki a hatását (LI *et al.*, 2011). Bízató eredményeket értek el kombinált előkezelések terén, ahol a híg savas, a hidrotermikus vagy a gőzrobbantás ötvözése az alkalikus előkezeléssel növelte a lignin eltávolításának mértékét. LEE és munkatársai (2015) kukoricaszár előkezelésénél első lépésben híg savas (kénsav) kezeléssel a xilán közel 75 %-át, majd azt követően alkalikus kezeléssel (nátrium-hidroxid) a lignin több mint 85 %-át távolították el. A kombinált technikák további előnye, hogy a reakció körülmények enyhíthetőek, a vegyszer és energia igény csökkenthető, a toxikus melléktermékek pedig kisebb mennyiségben keletkeznek.

2.2.4 Biológiai előkezelés

A természet különböző helyein - élő talajokban, korhadó fás anyagokon, komposztokban stb. - olyan élő szervezetek (elsősorban gombák és baktériumok) találhatóak, amelyek a lignocellulóz biomassza összetett szerkezetének lazítását és megbontását a cellulolitikus és egyéb hidrolitikus, valamint oxidatív aktivitású enzimeik segítségével végzik el. E szervezeteken kívül más élőlényeknél, mint a rovaroknál, férgekél, csigáknál és egyes kérődzőknél is kimutatták már a lignocellulóz bontás képességét (GALBE és ZACCHI, 2007).

Az organizmusok között általában előnyt és domináns szerepet a fonalas gombák élveznek, ugyanis azok számottevően nagyobb mennyiségben termelnek extracelluláris enzimeket. Továbbá, e szervezetek a micéliumaik segítségével a növényi biomassza szerkezetét könnyen átszövik, ahol az enzimeik kiválasztásával elindul a kötések hasítása, a szerkezet fokozatos feltárása (WOO *et al.*, 2014). Ez a magyarázata annak, hogy az ipari enzimtermelő törzsek is ezen könnyen tenyészthető és a környezethez is gyorsabban alkalmazkodó szervezetek (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. stb.) közül

kerülnek ki. A növényi biomassza mikrobiális előkezelése terén kevesebb ismeret áll rendelkezésre a baktériumok és az élesztők szerepét illetően.

A baktériumok körében csak néhány olyan faj ismert, amely megfelelő mennyiségben termel lignocellulóz szerkezetet bontó enzime(ke)t. A különböző növényi mintákról izolált baktériumok között az anaerob (*Clostridium* sp. stb.) és az aerob (*Cellulomonas* sp., *Bacillus* sp., *Thermomonospora* sp., *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp. stb.) fajoknál kimutatták, hogy az aerob fonalas gomba szervezetek enzimszisztémájuktól eltérően, a cellulóz bontásban résztvevő enzimek membránhoz kötött cellulozóma struktúrákat alakítanak ki (COUGHLAN, 1985). JIMÉNEZ és munkatársai (1991) által korhadó fáról izolált összesen 51 élesztő törzs (többségében *Candida* és *Pichia* törzsek) eltérő mértékű bontási aktivitását mutatott vörösfenyőből kinyert xilán szubsztrátumon. THONGEKKAEW és munkatársai (2014) a *Candida easanensis* JK-8 élesztő törzs esetén írták le, hogy a növényi melléktermékek (rizsszalma, kukorica héj és cukornád bagasz) összetett szerkezete, valamint az összetevők különböző aránya eltérően indukálta az enzimek termelését.

A lignocellulózt bontó fonalas gombákról régóta ismert, hogy a természetben a fás szárú növények korhadását idézik elő. A biológiai úton lebontott növényi biomasszából izolált fonalas gombák a barna-, lágy- vagy fehérkorhadást okozó gombák közé sorolhatók aszerint, hogy a növényi sejtváz mely komponensét vagy komponenseit bontják el (WAN és LI, 2012). A barna korhadást okozó gombák (*Serpula lacrymans*, *Lenzites trabea*, *Fomitopsis lilacano*, *Meruliporia incrassate*, *Coniophora putenana* stb.) a cellulóz és a hemicellulózok bontásában vesznek részt és viszonylag gyors depolimerizációt eredményeznek. A lignin szerkezete csak kis mértékben módosul, a visszamaradt lignin a száradása során vöröses színt ad az elkorhadt növényeknek (KIM és SINGH, 2000). A lágy korhadást okozó gombák (*Chaetomium funicola*, *Daldinia concentric*, *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma reesei* stb.) szintén a cellulóz és a hemicellulózok bontását idézik elő. E gombák azonban eltérést mutatnak a barna korhadást okozó gombákkal szemben, mivel a szaporodáshoz és az enzimtermeléshez nagyobb a szabad vízigényük, továbbá a lebontott növényi maradványon nyálkás réteget képeznek (KIM és SINGH, 2000; DANIEL, 2003). A fehérkorhadást okozó gombák (*Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* stb.) elsősorban a lignin bontásában, emésztésében játszanak szerepet, emiatt a növényi maradványoknál rostos, szálak, kivilágosodott szerkezet tapasztalható (ANDERSON és AKIN, 2008; DASHTBAN *et al.*, 2009). A kutatások azt mutatták, hogy e gombák nagyrésze, ugyan alacsony mértékben, de a cellulózok és a hemicellulózok degradációjában és hasznosításában is részt vesznek. Néhány fehérkorhadást előidéző organizmusnál, mint a *Ceriporiopsis subvermispora*, a *Daedalea*

flavida, a *Pleurotus ostreatus*, a *Pleurotus eryngii* vagy a *Phlebia radiata* faj egyes törzseinél is sikerült kimutatni a szelektív lignin bontást (ARORA *et al.*, 2002; TANIGUCHI *et al.*, 2005). Az alábbi 4. táblázat néhány eltérő természeti forrásokról izolált mezofil és termofil baktérium és fonalas gomba fajt az oxigén igényük szerint megkülönböztetve ismertet.

4. táblázat: Cellulóz, hemicellulóz és lignin bontásában résztvevő néhány baktérium és fonalas gomba szervezet (HIMMEL *et al.*, 2007)

BAKTÉRIUM		GOMBA	
Faj	Forrás	Faj	Forrás
Aerob		Aerob	
Mezofil		Mezofil	
<i>Bacillus brevis</i>	termesz	<i>Aspergillus nidulans</i>	talaj, korhadó fa
<i>Cellulomomas fimi</i>	talaj	<i>Aspergillus niger</i>	talaj, korhadó fa
<i>Cellvibrio japonicus</i>	talaj	<i>Agaricus bisporus</i>	komposzt
<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	talaj, komposzt	<i>Coprinus truncorum</i>	talaj, komposzt
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	komposzt	<i>Geotrichum candidum</i>	talaj, komposzt
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	talaj, iszap	<i>Penicillium chrysogenum</i>	talaj, korhadó fa
<i>Saccharophagus degradens</i>	mocsár	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	komposzt
		<i>Trichocladium canadense</i>	talaj
		<i>Trichoderma reesei</i>	
		<i>Trichoderma viride</i>	
Termofil		Termofil	
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	hőforrás	<i>Chaetomium thermophilum</i>	talaj
<i>Thermobifida fusca</i>	komposzt	<i>Corynascus thermophila</i>	gomba komposzt
		<i>Thielavia terrestris</i>	talaj, komposzt
Anaerob		Anaerob	
Mezofil		Mezofil	
<i>Acetovibrio cellulolyticus</i>	szennyvíztisztító	<i>Orpinomyces joyonii</i>	bendő
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	szennyvíztisztító	<i>Orpinomyces PC-2</i>	bendő
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	komposzt	<i>Piromyces E2</i>	ürülék
<i>Clostridium cellulovorans</i>	korhadó fa		
<i>Ruminococcus albus</i>	bendő		
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	bendő		
Termofil		Termofil	
<i>Anaerocellum thermophilum</i>	hőforrás		

A biológiai előkezelés előnye, hogy nem igényel vegyszereket, ezáltal nem terheli a környezetet és jóval biztonságosabb technológiai megoldást kínál a többi előkezelési eljárásnál. Továbbá az energiaigénye alacsony és az enyhe reakciókörülmények miatt minimális a nem kívánatos melléktermékek keletkezése. Ennek ellenére a biológiai úton történő szerkezet bontása még nem terjedt el széleskörűen, ugyanis az előkezelés folyamata (biodegradáció) hosszabb ideig is eltarthat - akár több napot vagy hetet is igénybe vehet. Mind a mikroorganizmusok, mind pedig az enzimeik számára az értékes komponensek -

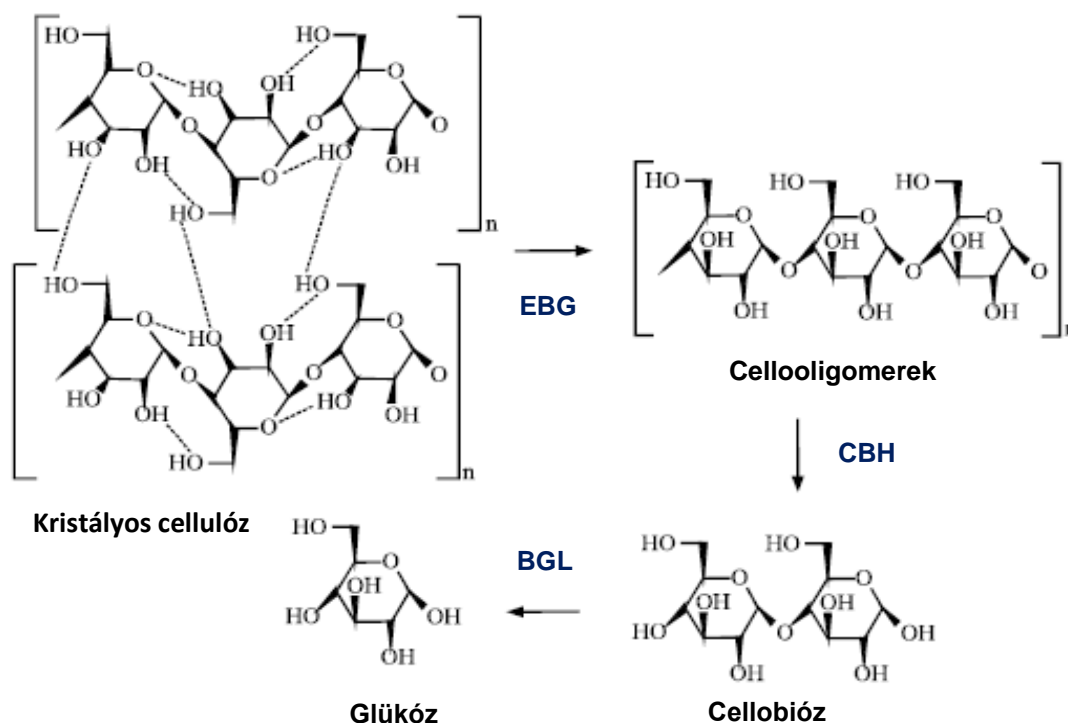
elsősorban a kristályos cellulóz - nehezen támadható, ezáltal a kezelés hatékonysága jelentősen kisebb a kémiai, a fiziko-kémiai és a kombinált eljárásokhoz viszonyítva (MENON *et al.*, 2012; GUPTA *et al.*, 2014). A növényi szerkezet megbontása során az oldatba vitt egyszerű cukrok - elsősorban a glükóz - egy része a mikroorganizmusok anyagcsere tevékenységei során könnyen hasznosul, ami cukor veszteséget és a későbbi etanol termelés hatékonyságának csökkenését okozza. Ezen hátrányok miatt ipari szinten ma még nem alkalmazható, de jelenleg világszerte az egyik intenzív kutatási terület a hatékony és gazdaságos biológiai előkezelések megvalósítása (MAURYA *et al.*, 2015).

2.2.4.1 A fonalagomba szervezetek lignocellulóz bontó enzimmérszlete

A fonalagombák többségénél a lignocellulózt bontó enzimek induktívák, csak akkor termelődnek, ha a környezetükben az ehhez szükséges szubsztrátum (cellulóz, hemicellulóz, lignin) jelen van. A konstitutív enzimeket ezidáig csak néhány anaerob fonalagomba szervezetnél mutatták ki, amelyek a baktériumokéhoz hasonló celluloszóma enzimstruktúrával rendelkeznek. A celluloszóma katalitikus egységei a bontási folyamat során a cellulóz szálakhoz kötődnek, ezáltal megmarad a kapcsolat a szintetizáló szervezettel is. E struktúrával társulva egyéb poliszacharid, valamint ligninbontó enzimek aktivitása is leírásra került. Az enzimmérszlet azonban lassabban bontja a cellulózt és más sejtfal komponenseket (JAKUCS 1991; BAYER *et al.*, 2004).

A lignocellulóz biomassza bontásában a cellulázok végzik el a cellulóz hidrolízisét és cukrosítását. A lágy korhasztó gombák körében a *Trichoderma* nemzetséghez tartozó néhány faj (*Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii*, *T. reesei*, *T. viride*) a nagy mennyiségben, extracellulárisan szintetizált exo- és endoglükánáz enzimjei miatt széleskörűen alkalmazott modell szervezet a celluláz enzimrendszer mechanizmusának megismeréséhez (RÉCZEY *et al.*, 1996; JUHÁSZ *et al.*, 2005). Ezek között a *Trichoderma reesei* gomba faj celluláz enzimrendszere 60-80 %-ban endoglükánázokat - ami az extracelluláris fehérjék mintegy 15-20 %-a -, míg 20-40 %-ban exoglükánázokat tartalmaz. Ezidáig legalább 5 endoglükánáz enzimet (Cel5A, Cel7B, Cel12A, Cel45A és Cel61A) és 2 exoglükánáz enzimet (Cel6A és Cel7A) kódoló gént sikerült azonosítani ezekben a szervezetekben. A β -glükozidáz aktivitása azonban (1 %) igen alacsony, ami miatt a cellobiózok (glükóz-dimer) bontásának sebessége kicsi, másrészt a glükóz koncentráció növekedése az enzim működésére termékgátlást fejt ki, ami szintén csökkenti a cellulóz cukrosításának hatékonyságát (STRAKOWSKA *et al.*, 2014). E kedvezőtlen hatás különböző módon mérsékelhető. A kutatások arról számolnak be, hogy a β -glükozidáz enzimkészítmények adagolásával (Novozyme 188 stb.), valamint az enzimtermelő

mikroorganizmusok (*Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. italicum* stb.) konzorciumban történő alkalmazásával sikeresnek bizonyult a cukorhozam növelése (GUTIERREZ-CORREA *et al.*, 1999; GARCIA *et al.*, 2002). Továbbá azt tapasztalták, hogy az ecetsav ($\leq 3\text{g/l}$) a β -glükózidáz termelését serkenti. A celluláz hatékonyságát nem csupán a termelő szervezet, hanem a növényi biomassza összetétele, a lignin aránya is meghatározza, ugyanis a cellulázok - illetve az egyéb lignocellulóz bontásban résztvevő enzimek is - irreverzibilisen kötődhetnek a ligninhez. Néhány felületaktív anyag (Tween 20, Tween 80, polioxietilén-glikol stb.) alkalmazásával az enzimek terméketlen, adszorpciós kötődése csökkenthető (SEO *et al.*, 2011; SIPOS *et al.*, 2010).

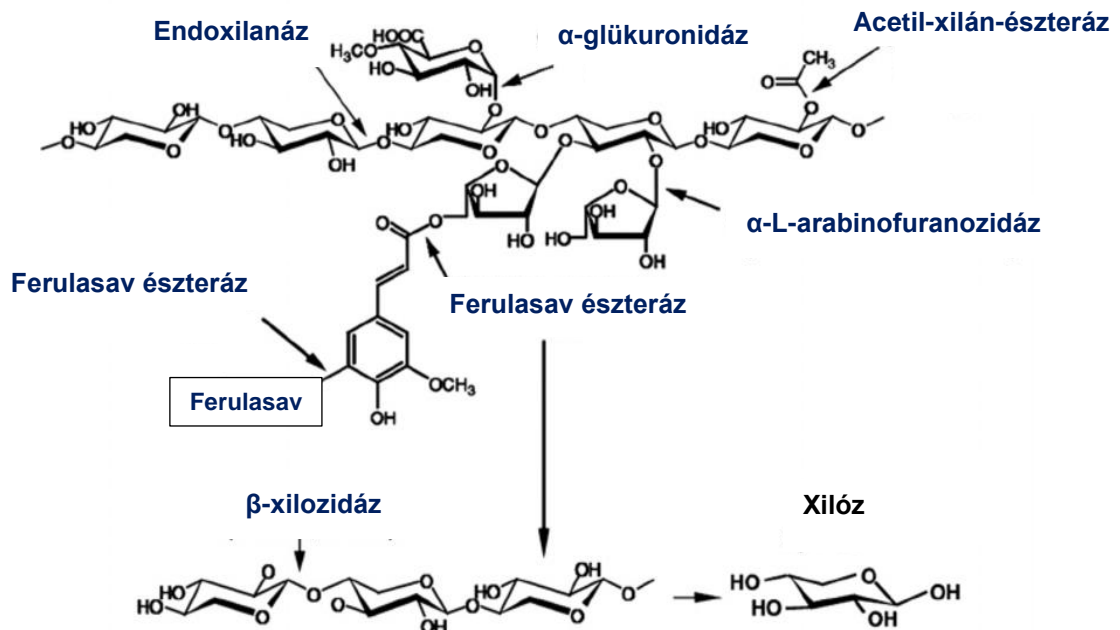


3. ábra: A celluláz enzim rendszer mechanizmusa és a keletkező termékek
(KARMAKAR és RAY, 2011)

A celluláz enzimkomplexen belül az endo-glükánázok (EBG) a cellulóz rostok amorf régióiban véletlenszerűen végzik el a β -1-4-es glikozidos kötések hasítását, ezáltal új, reaktív láncvégződéseket hoznak létre, termékként cellooligomerek keletkeznek. Az exo-glükánázok (CBH) a meglévő vagy az enzimes hatás által létrejövő nem redukáló láncvégekről két glükóz molekulából álló cellobióz molekulákat hidrolizálnak le. Végezetül, a β -glükózidázok (BGL) a glükóz-dimerek bontása során glükózt visznek az oldatba (PÉREZ *et al.*, 2002; AMOURI és GARGOURI, 2006; SÁNCHEZ, 2009). Az endoglükánázok és a β -glükózidázok részt vesznek a celloextrinek hidrolízisében is, azonban elmondható, hogy

a cellulóz glükózzá történő bontásához önmagában egyik enzim sem alkalmas. Az enzimek szinergens hatásának eredményeként, a többlépéses enzimes folyamat során játszódik le a cellulóz hidrolízise, azonban az oldatba vitt monomer (glükóz) és dimer (cellobióz) egységek gátló hatása miatt a konverzió korlátozott (HOWELL és STUCK, 1975; ZHAO *et al.*, 2004). A cellulóz enzimes hidrolízisének sematikus szemléltetése a **3. ábrán** látható.

A hemicellulóz-aktív enzimek egy része a glikozid-hidrolázok (GH), a másik része a szénhidrát-észterázok (CE) enzim családhhoz sorolható (ZHAO *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2012). A xilán bontásában az endo-1-4- β -xilanáz, a β -xilozidáz, az L-arabinofuranozidáz, valamint az acetil-xilán-észteráz mellett egyéb kiegészítő enzimek (ferulasav- és p-kumarinsav észterázok, acetilglükomannán észterázok, α -glükuronidáz, α -4-O-metilglükuronozidázok) is részt vesznek (ABBAS *et al.*, 2003). A hemicellulóz enzimes bontásának mechanizmusát az **4. ábra** szemlélteti.



4. ábra: A hemicellulóz enzimes bontásának mechanizmusa (DODD és CANN, 2009)

Ezen enzimek a szinergista hatásuk révén hatékonyabb xilán, valamint mannán bontást végeznek (ABDEL-SATER és EL-SAID, 2001; IRFAN és SYED, 2012). HO és munkatársai (2014) eltérő mezőgazdasági melléktermékeken vizsgálták az *Aspergillus brasiliensis* xilanáz enzim termelését és azt a következtetést vonták le, hogy a búzaborpa lényegesen növelte a xilanáz aktivitását. Ennek az a magyarázata, hogy a xilanáz enzim szintézisét e növényi szubsztrátum nagyobb arabinoxilán tartalma stimulálta, s mindemellett az alacsony lignin tartalomból adódóan e szénhidrát könnyebben támadható volt.

Az aromás lignin bontásában és módosításában szintén egy összetett enzimszisztéma vesz részt, melyet elsősorban a fehér korhadást okozó gombák termelnek. Ezen oxidoreduktáz enzimek között ismert képviselők a peroxidázok - a mangán(II)-függő peroxidázok (MnP), a lignin-peroxidázok (LiP) és a veratril-alkohol-oxidázok (VAO) -, valamint a polifenol-oxidázok (PoX), más néven a lakkázok (SANTOYA *et al.*, 2008; KUMAR és WYMAN, 2009). A lignin elválasztását megnehezíti, hogy ellentétben a cellulózzal vagy a hemicellulózokkal, ismétlődő egységeket nem tartalmaz, ezáltal a kötések hasítása igen összetett, bonyolult folyamat (ISIGKOR és BECER, 2015). A régóta ismert és kedvező lignin bontást mutató *Phanerochaete chrysosporium* gomba faj is rendelkezik részbeni cellulóz bontási képességgel, ráadásul a más fehérkorhadást okozó gomba fajoktól eltérően, oxidatív úton, oxidoreduktációs enzimekkel - cellobióz-kinon oxidoreduktázok (CBQ), cellobióz dehidrogenázok (CDH) - történik (MARÁZ és HORNOK, 2003; WAN és LI, 2012).

2.2.4.2 Lignocellulóz bontó mikrobiológiai konzorciumok

A természetben is végbemenő mikrobiális lebontási folyamatok igen összetett mechanizmuson, több enzim együttes működésén, szinergens kölcsönhatásán alapulnak. A növényi biomassa e módon történő kezelését ezért egy-egy mikroorganizmus - a lignocellulóz bontó enzimeknek csak egy részét termeli - nem képes megvalósítani, csak mikroorganizmusok által alkotott összetett, diverz közösségek végezhetik el. A különböző összetételű és szerkezetű lignocellulózok bontása tehát kettő vagy annál több mikroorganizmus, egymást követő tevékenységeinek - aerob illetve anaerob környezeti viszonyoktól eltérően - az eredménye. A kutatások ezen természetes konzorciumok összetételének, valamint az egyes mikroorganizmusok közötti kapcsolatok és szerepek meghatározására irányulnak, amelynek elsődleges célja az új, tudatosan kialakított társulások kialakítása. E konzorciumok alkalmazása az előkezelési idő csökkenését, a szerkezet bontás hatásfokának növelését eredményezheti (BALDRIAN 2004; CHI *et al.*, 2007).

A kutatók számára azonban kihívást okoz ezen összetett, természetes közösségek esetén az egyes mikroorganizmusok szerepének elválasztása, mivel azok önállóan eltérő viselkedést, tulajdonságokat mutathatnak, mint közösségben, más szervezetek - mikroorganizmusok és egyéb élőlények (rovarok, férgek, csigák stb.) - mellett. E kapcsolatok ismeretének hiánya gátat szab a konzorciumok ipari szinten történő alkalmazása és az előkezelés megtervezése elé. Továbbá, a környezeti mintákban a mikroorganizmusok dúsítása és kimutatása nem minden esetben történhet sikeresen, melynek következményeként a nem izolált mikroorganizmusok szintén nehezítik a természetes lebontási folyamatok modellezését. Több tanulmányban is leírásra került, hogy célszerű a

szelektálást követően inkább csökkentett tagszámú konzorciumokat létrehozni, amelyek lehetővé teszik a mikroorganizmusok közötti kapcsolatok, kölcsönhatások jobb megismerését (NAVARRETE-BOLAÑOS *et al.*, 2007; HÖFFNER és BARTON, 2014; VALDÍVIA *et al.*, 2016).

5. táblázat: Néhány növényi maradványból izolált baktérium és fonalas gomba konzorciumban történő alkalmazásának eredménye

Konzorcium	Melléktermék	Konverzió	Hivatkozás
Talajmintákból izolált baktériumok <i>Ralstonia</i> sp. <i>Clostridium</i> sp. <i>Firmicutes</i> sp. <i>Propionibacterium</i> sp. <i>Betaproteobacterium</i> sp. <i>Pantoea</i> sp.	kukoricaszár (porrá őrölt)	51% 40°C, 8 nap	Feng <i>et al.</i> , 2008
Izolátumok gabona alapú érett komposztból (9 faj)	gyapot rizsszalma	77% 50°C, 3 nap	Wang <i>et al.</i> , 2011
Izolátumok elhalt növényi maradványokról <i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptomyces</i> sp. <i>Cellulomonas</i> sp.	cukornád levele	90 % 40-50°C, 21 nap	Guevara és Zambrano, 2006
Cukornád bagasz komposztból izolált baktériumok <i>Clostridium</i> sp. <i>Thermoanaerobacterium</i> sp. <i>Rhodocyclaceae</i> sp.	kukoricaszár cukornád bagasz	70 % 50°C, 7 nap 60 % 50°C, 7 nap	Wongwilaiwalin <i>et al.</i> , 2010
Konzorcium-29 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Trichoderma koningii</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus ficuum</i> NTG-23	ecetgyártási melléktermék	68 % 25 °C, 5 nap	Cui <i>et al.</i> , 2016
<i>Panerochaete chrysosporium</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Trichoderma</i> sp.	búzaszalma	70 % 37 °C, 62 nap	Lin <i>et al.</i> , 2011

A mikroorganizmusok között - a konzorcium(ok) összetételétől eltérően - különböző ökológiai kapcsolatok alakulhatnak ki. E hatás lehet kompetitív (versengő), mutualista (kooperatív), szinergens (egymást segítő) valamint kommenzalista és ammenzalista is. A két utóbbi esetén az egyes mikroorganizmusok a mellettük élő más mikroorganizmus(ok) élettevékenységeire elhanyagolható hatással vannak, amiket szigorúan véve nem tekinthetőek kölcsönhatásoknak, azonban az evolúciós ökológia szempontok szerint, e kapcsolatok szélsőséges eseteknek számítanak (CRESPI, 2001; FAUST *et al.*, 2012). A lignocellulóz bontásban résztvevő mikroorganizmusok konzorciumokban történő

alkalmazása során egyes esetekben biztató szerkezet feltárását sikerült elérni. Ezek közül néhány természetes és tudatosan kialakított közösséget tartalmaz az **5. táblázat**, ahol az adott mikroorganizmusok szinergens kölcsönhatása elősegítette azok környezethez való alkalmazkodását, szaporodását és biológiai aktivitását, továbbá serkentette az enzimek szintézisét és aktivitását is (TAHA *et al.*, 2015).

A szilárd szubsztrátumon végzett előkezelés kiválóan alkalmazható a természetben lezajló komposztálási és silózási folyamatok modellezéséhez. Az elmúlt néhány évtizedben számos kutatás is alátámasztotta, hogy a fonalas gomba szervezetek kis vízáktivitás mellett, szilárd szubsztrátumon (solid state fermentation, SSF) nagyobb enzim szintézist mutatnak, mint az ipari szinten széleskörűen alkalmazott süllyesztett fermentáció (submerged fermentation, SF) során (SINGHANIA *et al.*, 2010).

2.2.4.3 Szilárd szubsztrátumon történő előkezelés

A szilárd szubsztrátumon történő előkezelés során a szabályozott és egyben csökkentett szabad víztartalom (általánosan 20-80 %) mellett olyan környezet alakítható ki, ami szelektíven, elsősorban a fonalas gomba szervezetek szaporodásának, növekedésének és biológiai aktivitásának kedvez (DOS SANTOS *et al.*, 2004). Az előkezelését több tényező külön-külön és együttesen is meghatározza, ezáltal akár egyetlen tényező változtatása is csökkentheti vagy növelheti a biodegradáció hatékonyságát.

A biológiai előkezelés során kiemelt technológiai tényező a lignocellulóz biomassa összetétele és a szemcseméret eloszlása, a mikroorganizmus típusa vagy mikroorganizmusok alkotta konzorcium(ok) összetétele, az előkezelés hőmérséklete, időtartama és kémhatása, a szabad víztartalom, a szén- és nitrogén, valamint egyéb tápanyagforrások mennyisége és minősége, továbbá az oxigénellátottság mértéke.

A növényi biomassa összetételét tekintve, minél magasabb a hemicellulózok és a lignin százalékos megoszlása az adott biomassa szárazanyag-tartalmán belül, annál több időt vesz igénybe a lebontása (SAINI *et al.*, 2015).

A fonalas gomba szervezetek szaporodásának és az enzimtermelésének nagyrészt azt enyhén savas kémhatású környezet (pH=4-6) kedvez. A neutrális környezeti viszonyok mellett már inkább a baktériumok szaporodnak el (BRACEY 1998, KANSOH *et al.*, 1998).

A biológiai előkezelés során az inkubációs hőmérséklet (vagy hőmérséklet tartomány) szinten tartása szintén kiemelt tényező, ugyanis a mikroorganizmus(ok) az anyagcsere folyamatai(k) során hőt termel(nek), ami a megfelelő hőelvezetés nélkül gátolja a mikroorganizmus(ok) szaporodását és biológiai aktivitását, valamint bizonyos hőmérséklet felett már a mikroorganizmus(ok) pusztulását idézi elő. A fonalas gombák nagyrésze

mezofil, ebből adódóan a kedvező hőmérséklet tartományuk 20 °C és 40 °C között található. Néhány pszichrofil (hidegtűrő) illetve termofil és termotoleráns (hőkedvelő és hőtűrő) lignocellulózt bontó gomba is ismert. Az előbbi esetén az 5-15 °C, az utóbbi esetén pedig 40-70 °C közé tehető a szaporodásához és az enzimek szintéziséhez optimális hőmérséklet. Ezen hőt kedvelő gombák elsősorban a szerves maradványokból előállított komposztokban, valamint a trágyákban fordulnak elő, s az elmúlt néhány évtized óta a biotechnológiai alkalmazási lehetőségeik száma egyre nagyobb mértékben bővült (LIN *et al.*, 2011). A hőmérséklet növelésével a biokémiai reakciók sebessége növelhető, ezáltal a lignocellulóz előkezelésének időtartama csökkenthető, azonban ebben az esetben sem szabad eltekinteni az egyéb tényezők hatásától. Az előkezelés időtartamának csökkenését eredményezheti az alkalmazott mikroorganizmusok kedvező arányának kialakítása is (VAN KUIJK *et al.*, 2015).

A lignocellulóz biomassa szabad víztartalma elengedhetetlen a mikroorganizmusok szaporodásához és az enzimek termeléséhez. Már a kezdetekben kimutatták, hogy az lignocellulóz biomassa esetén a 40-80 % közötti nedvességtartalom kedvez a fonalas gomba szervezetek enzim szintézisének, ezáltal a szerves anyagok hatékonyabb átalakítási, bontási folyamataihoz (REID, 1989). A csökkentett víz használat miatt az előkezelés kisebb reaktorokat is igényel. JAYANT és munkatársai (2011) a gyapotszálon, a papír hulladékon és a cukornád bagacson vizsgálták a *Penicillium chrysogenum* és az *Aspergillus niger* izolátum celluláz enzimtermelését. Kísérleteiknél viszonylag nagyobb mértékű (75-80 %) nedvesítés mellett írtak le kedvezőbb enzimaktivitást. Az ennél alacsonyabb szabad víztartalom csökkentette a mikroorganizmus szaporodását és az enzimek termelését. A szubsztrátumok nagyobb mértékű nedvesítése viszont anaerobiózist okozott, tehát a levegőztetés hatékonysága leromlott, amely szintén negatívan hatott a mikroorganizmus élettevékenységeire. A levegőztetés hatékonyságát nem csupán a nedvességtartalom befolyásolhatja, hanem a szubsztrátum szemcsemérete is. A kisebb szubsztrátum szemcseméret nagyobb támadási felületet biztosít, azonban a túl finom szemcseméret a szubsztrátum aggregátumok képződését idézheti elő, ami csökkenti az oxigén diffúzió mértékét, a szén-dioxid és az illékony komponensek eltávolítását, ezáltal a mikroorganizmus(ok) növekedését. Ezek a hatások írhatóak le a túl nagy szemcseméret esetén is. A levegőztetés során keletkező párolgási veszteség, valamint a mikroorganizmusok hőt termelő anyagcsere tevékenységei miatt a szabad víztartalom megőrzését biztosítani kell. Továbbá, a levegőztetés során az oldott oxigén szintet állandó értéken kell tartani, ami általánosan 30 % vagy egyes esetekben e feletti is lehet (PANDEY *et al.*, 1999; SINDHU *et al.*, 2016).

A technológia léptéknövelésénél komoly kihívást okoz a rendszer sterilitásának biztosítása, a szaporodás és enzimtermelés számára kedvező környezeti elemek biztosítása és szinten tartása, valamint a folyamat szabályozása és ellenőrzése. A kutatások egy része a kompromisszum szerinti konzorciális előkezelések, másik része az egymásra épülő lépésekben, időben eltoltan, a mikroorganizmusok számára kedvező környezeti viszonyok mellett történő előkezelések tanulmányozására irányul (PÉREZ-GUERRA *et al.*, 2003; CHATURVEDI és VERMA, 2013; VAN KUIJK *et al.*, 2015; SOCCOL *et al.*, 2017).

2.3 Bioetanol

2.3.1 Általános tulajdonságok és a jelentőségek

Az etanol (etil-alkohol, spiritusz) színtelen, jellegzetes szagú és ízű, magas forráspontú (78°C) és égéshőjű (1367 kJ/mol) szerves vegyület, amit biológiailag megújuló energiaforrások (növények) hasznosításával állítanak elő. Az etanol üzemanyagként való hasznosítása történhet tisztán, különböző arányokban benzinnel keverten (E5, E10, E15, E20), ETBE (etil-tercier-butil-éter) adalékként, valamint gázolajhoz, illetve biodízelhez adagolva is. A bioetanol a belső égésű motoroknál benzinnel elegyítve korlátozott arányban (20 %-nál nagyobb nem lehet) használható - a kedvező arány 85:15 (E15) - míg a tiszta etanol csak az erre a célra átalakított motorokban alkalmazható (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A kutatások arra mutattak rá, hogy a bioetanol használata lehetővé teszi a káros üvegházhatást okozó gázok kibocsátásának csökkenését - a növényi maradvány típusától, összetételétől és a technológiától eltérő mértékben -, valamint a benzinnel szemben az oktánszáma és oxigén tartalma is magasabb, ami a közel tökéletes égését eredményezi (KALIYAN *et al.*, 2011). A bioetanol használata „szén-dioxid semleges”, mivel az elégetésével ugyanannyi szén-dioxid kerül vissza a légkörbe, mint amennyit a növény a fotoszintézis során megkötött, emiatt környezeti szempontból kedvezőbb a használata. Továbbá, a rákos megbetegedések kialakulásáért okolható aromás szénhidrogének mennyisége is számottevő mértékben csökkenthető (ADITYA *et al.*, 2016). E pozitívum a bioetanol életciklusa esetén már közel sem hasonló, amelynek az az oka, hogy a gyártástechnológia - valamint az alapanyag betakarítása és a késztermék szállítása - ma javarészt primer (fosszilis) energiahordozókat igényel (HANCÓSOK *et al.*, 2006, SÁNCHEZ és CARDONA, 2008). Az energiatartalma azonban csupán a benzin 60-65 %-át teszi ki, ami miatt a gépjármű fogyasztása azonos úthossz megtételénél közel másfélszeresével nő. A kenőképessége is rosszabb, amely az alkatrészek kopását, valamint a gyakoribb olajcserét okozza, ami viszont sikeresen kiküszöbölhető, többek között a ricinusolaj alkalmazásával.

A nagy gőznyomás és az alacsony párolgáshője miatt hidegindítási problémákkal is számolni kell (BALAT *et al.*, 2008). Az etanol alkalmazásának azonban járulékos haszna is van, ugyanis szerepe van a munkahelyek teremtésében, ezáltal elősegíti a vidék gazdasági fejlődését.

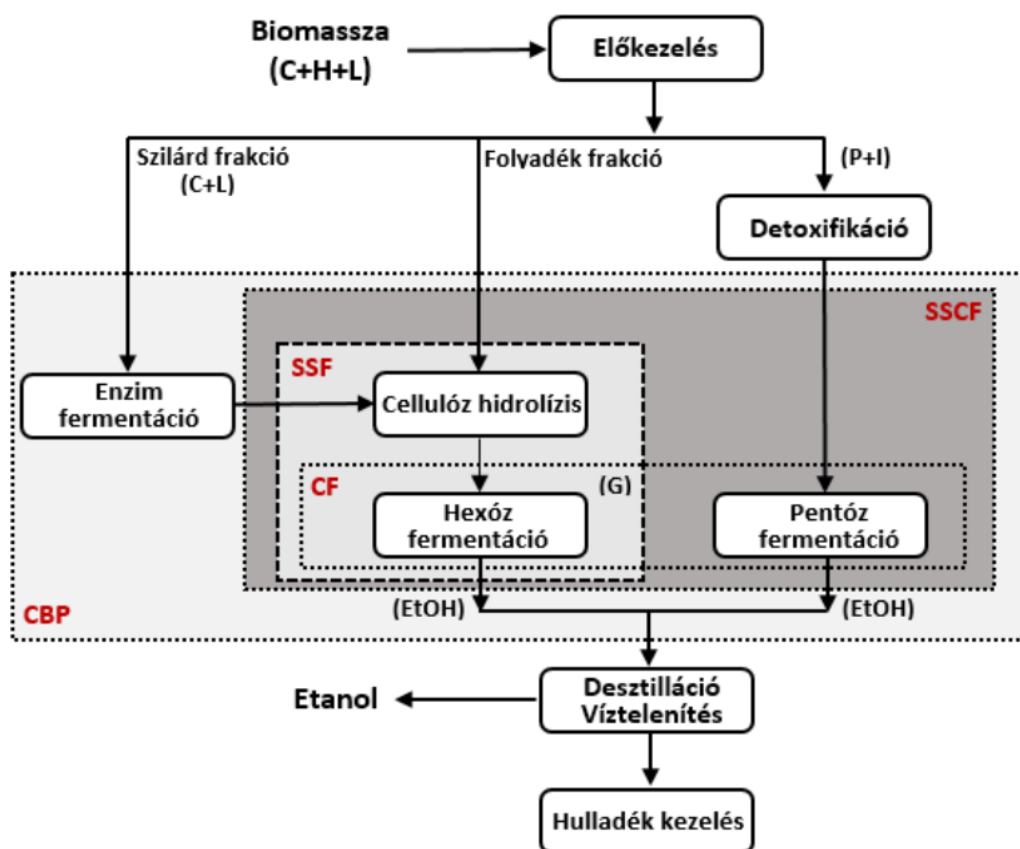
A biokémiai úton történő etanol előállítás az alapanyagtól és az alkalmazott technológiától függően generációs technológiákra bontható. A szacharóz és keményítő tartalmú, szántóföldeken termesztett kultúrnövények (cukorrépa, cukorcirok, búza, kukorica, csicsóka stb.) hasznosítására épülő elsőgenerációs bioetanol előállítás igen jól ismert, a technológiát évtizedek óta ipari méretekben sikeresen alkalmazzák. A cukor tartalmú növények roncsolását követően az extrakcióval kinyert cukrokat (glükóz, szacharóz) közvetlen úton, az etanol-termelő mikroorganizmus, elsősorban élesztő etanollá erjeszti. Az összetett szénhidrátokat (keményítő, inulin) tartalmazó növényeknél az aprítást, őrlést az enzimes (vagy savas) cukrosítás követi. Az iparban alkalmazott erjesztő mikroorganizmusok csak közvetetten, azonban kiváló hatásfokkal tudják az így oldatba vitt cukrokat hasznosítani (MACEDO *et al.*, 1995; VOHRA *et al.*, 2014; DÉNES *et al.*, 2013). Ma a piacvezető bioetanol előállító Brazília (cukornád), Amerikai Egyesült Államok és Kína (keményítő tartalmú növények) mellett intenzív gazdasági és technológiai fejlődést mutat India (melasz) is. Hazánkban a kukorica, a búza, valamint kisebb mennyiségben még a burgonya szolgált alapanyagot az ipari szintű bioetanol előállításához.

Mindezen előnyök mellett, azonban az elsőgenerációs bioetanol előállítás elterjedése komoly etikai, sőt környezeti és politikai aggályokat vet fel, amelyeknek a fő kiváltó oka, hogy az alapanyagok termesztése egyre nagyobb termőterületeket von el az élelmezésre szánt növények elől (RATHMANN *et al.*, 2010). A Föld növekvő népessége és energiaigénye miatt a kutatások a nagy biomassza tömeget biztosító növények termesztése mellett a lignocellulóz biomassza hatékony és gazdaságos etanol célú hasznosítását, a másodikgenerációs technológia fejlesztését helyezik előtérbe (DEMIRBAS *et al.*, 2009).

A másodikgenerációs etanol előállítás igen nagy előnye, hogy amíg az elsőgenerációs technikáknál a növénynek csak kis hányada (gyökér, szár vagy termés) kerül hasznosításra, addig e technológiánál a teljes növény hasznosítható, így egységnyi növényi biomasszából több etanol állítható elő (LIN és TANAKA, 2006). A papírhulladékok (újságpapír, szórólapp, kartondoboz stb.) hasznosítása ma még nem érte el azt a szintet, amit a környezetvédelmi érdekek megkívánnak, ezért az etanol termelésnél való levezetésük kiváló hulladékkezelési megoldás is. A szilárd hulladékok mellett a cellulóz- és papírgyártásból származó szennyvizek a szénhidrát tartalmuk - szulfid szennyvíz (2-3 %), híg feketelúg (14-18 %) - miatt a kellő előkezelést követően e célra szintén felhasználhatóak (JORGENSEN, 1979).

2.3.2 A második generációs bioetanol előállítás és a technológia kihívásai

A lignocellulókat - az összetett és ellenálló szerkezet miatt - nem lehet közvetlenül használni a biokémiai folyamatokhoz, az etanol célú fermentációhoz sem, ami miatt azok előkezelése nélkülözhetetlen gyártástechnológiai művelet (HSU, 1996; LEE, 1999). A kutatók és a gyártók számára igen nagy kihívás a lignocellulóz szerkezetének hatékony lazítása és megbontása, ezáltal az értékes szénhidrát komponensek (elsősorban cellulóz) elválasztása, amely meghatározza a későbbi enzimes hidrolízis és az azt követő etanol termelés sikerét (GÁSPÁR *et al.*, 2007; SIPOS *et al.*, 2009).



5. ábra: A lignocellulóz biomassza etanol célú hasznosításának lehetőségei és a technológia folyamata (CARDONA és SÁNCHEZ, 2007)

C: cellulóz; H: hemicellulóz; L: lignin; P: pentózok (xilóz, arabinóz); I: inhibitorok;

G: glükóz; EtOH: etanol; CF: ko-fermentáció;

SSF: szimultán cukrosítás és erjesztés; SSCF: szimultán cukrosítás és ko-fermentáció;

CBP: közvetett mikrobiális konverzió

Az előkezelést követő műveletek, a hagyományos, szeszipari technológiával történő alkoholgyártás lépéseivel: a szénhidrátok enzimes cukrosítása, az erjeszhető cukrok etanollá konvertálása, a keletkező etanol kinyerése (desztillálása) és víztelenítése, valamint visszamaradt növényi anyag hasznosítása, egyezést mutatnak (5. ábra).

A mezőgazdasági és ipari melléktermékek között a búzakorpa, a búzaszalma, valamint a papírhulladék is viszonylag alacsony mennyiségben tartalmaz aromás lignint, aminek köszönhetően a másodgenerációs bioetanol előállítás modellezéséhez és a technológia további fejlesztéséhez kiváló alapanyagul szolgálhatnak.

A második generációs gyártástechnológia még intenzív fejlesztések alatt áll, ugyanis annak ipari alkalmazását az előkezelés mellett az enzimmészítmények és az erjesztő mikroorganizmusok kiválasztása és használata, valamint a gyártás során nem hasznosított összetevők, szerves növényi maradványok értéknövelt-hasznosítása is meghatározza (CHERUBINI, 2010). A szerves maradványok takarmányozási célra történő hasznosítása esetén problémát okozhat, hogy az etanolfermentációt követő desztillálással visszamaradt hulladék (törköly) a nyersrost tartalom mellett inkruszáló anyagokat, elsősorban lignint tartalmazhat. A kérődzők emésztőrendszerében (bendőben, vakbélben, remesebélben) a mikrobiális emésztés során a lignin nem bomlik le, sőt a nyersrost hasznosítását, valamint a tápanyagok felszívódását is csökkenti. A maradványok további kezelésével, az alkotóelemek frakcionálásával (ligninmentesítés), azok takarmányozási értéke növelhető. Az e célú hasznosítás további kockázata a mikotoxin tartalom. A technológiai hulladékok (mikotoxinnal szennyezett alapanyag, lignin frakciók) termikus átalakításával - szárítást követően - hő- és villamos energia állítható elő, ami a bioetanol előállítás során használt fosszilis energia használat csökkentéséhez járulhat hozzá. A második generációs gyártástechnológia tehát bonyolult műveleteket és speciális berendezéseket igényel, továbbá a termelési és üzemeltetési költségek még meghaladják az elsőgenerációs bioetanol előállításáét (SUN és CHENG, 2002). Ezen probléma megoldása érdekében világszerte végeznek kutatásokat, melyek két szemlélet szerint csoportosíthatók. A kutatók egy része az előkezelés, a másik része az enzimes hidrolízis és erjesztés fejlesztésétől vár biztató eredményeket.

2.3.3 Az enzimes szénhidrát hidrolízis

A lignocellulóz biomassa előkezelését követő művelet az értékes szénhidrátok - a cellulóz és a hemicellulózok - hidrolízise, ami az etanolfermentációhoz egyszerű cukrokat, monomereket (glükóz) szabadít fel. Ha az előkezelés elég hatásosnak bizonyult, tehát a szerkezet bontás mellett megvalósult a szénhidrát konverzió is - néhány fiziko-kémiai és kombinált módszerek esetén - akkor nem szükséges a hidrolízis műveletét elvégezni.

A szénhidrátok hidrolízise alapvetően két módon, a savak és enzimek által katalizált reakciók során történhet. A sav használatával a cukrok nem kívánt degradálása (cukorvesztés) következik be, ami csökkenti a későbbi etanolfermentáció hozamát,

valamint a melléktermékek eltávolítása a technológia költségeit jelentősen növeli. A sav továbbá korróziós problémát is okoz, emiatt alkalmazásához speciális berendezéseket kell biztosítani. Ma már a szénhidrátok hidrolízisét és cukrosítását ipari szinten csak enzimekkel végzik el. Ennek oka, hogy az enzimek működése nagyfokú specifitással jellemezhető, azok enyhébb reakció körülmények - enyhén savas kémhatás, 45-55°C körüli hőmérséklet – mellett alkalmazhatóak, amivel az inhibitorok keletkezése elkerülhető, ezáltal pedig a cukorhozam is kedvezőbben alakul. Az enzimes eljárásnál korrózióval nem kell számolni. A bontási folyamat a lignocellulózok heterogén összetétele és komplex szerkezete miatt sokféle enzim együttműködését igényli (WEN *et al.*, 2004). A kereskedelmi enzimekészítmények nagyobb része fonalas gomba eredetű (Celluclast 1.5L, Cellic CTec2, Pergalase A40, Novozym 188 stb.), ugyanis ezen élő szervezetek számos enzim termelése esetén kedvezőbb extracelluláris enzimproduktivitást mutatnak (SELIG *et al.*, 2008; ALVIRA *et al.*, 2010).

Az enzimes szénhidrát konverzió hatékonyságának növelése elsősorban a növényi biomassa előkezelésével, az enzimek számára támadható fajlagos felület növelésével érhető el (TUCKER *et al.*, 2003). Emellett további tényező az előkezelést követően a szénhidrátok összetétele, az enzim(ek) típusa és dózisa, valamint a környezeti viszonyok - az optimális hőmérséklet és pH tartomány, az aktivátorok és inhibitorok minősége és mennyisége, valamint a hidrolízis időtartama.

A cellulózzal szemben, a hemicellulózok nem alkotnak rendezett, kristályos szerkezetet, ami miatt azok enzimekkel könnyebben bonthatóak. A hemicellulóz oldalláncok eltávolítása jelentősen növeli a szénhidrát vázat bontó enzimek aktivitását, ezáltal - a szinergens kölcsönhatásnak köszönhetően - lehetővé válik a hemicellulózok monomerekké történő - akár teljes - lebontása. A hemicellulózok mellett az aromás lignin eltávolítása a cellulóz szálak támadhatóságát segíti elő, ami az enzimek inaktív kötődésének - szterikus gátlását – kialakulását mérsékli, ezáltal pedig az enzimek dózisa csökkenthető, az enzimes bontás sebessége pedig növelhető (TENKANEN *et al.*, 1998; DE VRIES és VISSER, 2001).

Az enzimes hidrolízis és cukrosítás költségei lényegesen csökkenthetők az „on-site” technika alkalmazásával, amely során a növényi biomassa előkezelésével a felszabadított szénhidrátok egyszerű cukrokká való konvertálásához a kívánt mikroorganizmus(ok) szaporítása és az általuk szintetizálható enzimek előállítása az üzemben, a termék előállítási technológián belül történik (PANDEY *et al.*, 1999; NIGAM *et al.*, 2009). Az integrált technológia további előnye, hogy az enzimtermelés optimálható az enzimes hidrolízishez, valamint lehetővé teszi akár az enzimes hidrolízis és az alkoholos erjesztés szimultán megvalósítását is. Emellett törekvések mutatkoznak a speciális reaktor-technikai

megoldások (elő-hidrolízis, reaktorok kevertetése stb.) kivitelezésére, az új, cellulázt termelő mikroorganizmusok izolálására, valamint az ismertebb termelő törzsek cellulóz bontó tulajdonságának géntechnikai úton történő módosítására, javítására is.

2.3.4 Az alkoholos erjesztés és technikái

Az etanolfermentáció alapvetően két módon, a hagyományos, elkülönített (szeparált) cukrosítás és erjesztés (SHF), valamint szimultán cukrosítás és erjesztés (SSF) technikával történhet. Ez utóbbi esetén ismert néhány továbbfejlesztett technológia is, mint a szimultán cukrosítás és ko-fermentáció (SSCF) vagy a közvetett mikrobiális konverzió (DMC).

A szeparált hidrolízis és erjesztés előnye, hogy mivel a két részfolyamat időben és/vagy térben elkülönítve megy végbe, ezáltal mind az enzimek, mind a mikroorganizmusok számára biztosítani lehet az optimális környezeti viszonyokat. A problémát az okozza, hogy az enzimes hidrolízissel oldatba vitt cukrok az enzimek esetén termékinhibíciót (glükóz, cellobióz), az etanoltermelő mikroorganizmusoknál szubsztráthinhibíciót (glükóz) vált ki, ami a cukorhozamot és az etanolhozamot is csökkenti (SANCHEZ és CARDONA, 2008; SARKAR *et al.*, 2012).

E technológiai probléma a szénhidrátok monomerekre történő bontásával és ezzel párhuzamosan, az erjeszthető cukrok etanollá való alakításával kiküszöbölhető. A szimultán erjesztési eljárásnál az energia és idő szükséglet is lényegesen kisebb, valamint a zárt rendszernek köszönhetően elkerülhető a befertőződés, a termék szennyeződése (YAMASHITA *et al.*, 2008; KÁDÁR *et al.*, 2004). A kritikus probléma az, hogy azon enzimek, illetve az erjesztő mikroorganizmusok hőmérséklet és pH optimumai többnyire eltérő tartományban találhatóak, ezért fontos lehet a megfelelő enzimeknek és mikroorganizmusoknak a kiválasztása (OJEDA *et al.*, 2011; DAHNUMA *et al.*, 2015).

A lignocellulóz biomassza etanol célú hasznosításánál az etanoltermelő mikroorganizmusokkal (élesztők, baktériumok) szemben támasztott kívánalmak között igen nagy fontossággal bír a gyors erjesztési képesség, a nagy etanol hozam és produktivitás, a magas szénhidrát és etanol tolerancia, inhibitorokkal szembeni tűrés, valamint a hexózok és pentózok szimultán etanollá konvertálása. Az alkoholos erjesztéshez ipari méretekben elsősorban élesztőgombákat alkalmaznak. Régóta ismert, fakultatív anaerob *Saccharomyces cerevisiae* élesztőfaj törzsei gyors erjesztési tulajdonsággal és kimagasló alkohol toleranciával (akár 18-21 %) rendelkeznek, továbbá a nagy szénhidrát koncentrációval és ozmózisnyomással szemben is igen ellenállóak (PARK *et al.*, 2010). Ezen élesztő a hexózokból (glükóz) képez etanolt, míg a pentózokat (xilóz, arabinóz) nem erjeszti. Néhány, a természetben megtalálható nem *Saccharomyces* élesztőfaj, mint a *Candida shehatae*, a

Pachysolen tannophilus, a *Pichia stipitis* azonban képes a xilóz erjesztésére, míg az arabinóz szubsztrátumnál a sejttömeg növelése tapasztalható. Az arabinóz etanollá való erjesztése vad típusú mikroorganizmusokkal nem megoldott (PAREKH és WAYMAN, 1986; NIGAM 2002). A *Pichia* és *Candida* élesztők az etanollal szemben mutatott érzékenységük - 40 g/L felett az alkoholtermelés leáll -, valamint a speciális, mikroaerofil körülmények miatt az ipari szinten nem alkalmazott (DASHTBAN *et al.*, 2009).

A *Zymomonas mobilis* fakultatív anaerob, Gram-negatív baktérium faj számos előnyt mutat az élesztőkkel szemben. Lényegesen nagyobb szénhidrát koncentrációt (akár 40 %) is el tud viselni, valamint magasabb hőmérsékleten, 35-36 °C-on is erjeszt (MOHAGHEGHI *et al.*, 2002). A savtűrő tulajdonsága elősegíti a szelektív erjesztést, továbbá erős védelmet biztosít a külső szennyeződések ellen is (TAO *et al.*, 2005). A baktérium sejtek akár 10-12 % etanolt is elviselnek károsodás nélkül. Sajnos az erősebb környezeti hatásoknál a baktérium sejtek szaporodása lelassul, a sejtek lappangási szakasza akár 4-5 napra is kitolódhat. Ez a kedvezőtlen hatás különböző adalékanyagok (szorbit vagy ectoin) alkalmazásával mérsékelhető (ZHANG *et al.*, 2016).

E baktérium a szénhidrátok (hexózok) bontását és etanol célú hasznosítását nem az élesztőknél ismert Embden-Meyerhof (EM) útvonalon, hanem az Entner-Doudoroff (ED) úton végzi el. Ebben az esetben egységnyi cukor (glükóz) molekulánként 2 molekula etanol és 2 molekula szén-dioxid képződik, ami mellett csupán 1 ATP keletkezik. Az energianyerési úton a baktérium sejtek által felvett cukornak csupán 2 %-a hasznosul a biomassza termeléséhez, aminek köszönhetően az elméleti etanol hozam a 97-98 %-ot is elérheti, míg a *Saccharomyces cerevisiae* esetén ez maximálisan 93-95 % átalakítási rátát mutat (PENTJUSS *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2016). A baktérium számára erjeszthető szénhidrát a glükóz, a fruktóz és a szacharóz, míg az enzimek hiánya miatt az összetett szénhidrátokat, valamint a pentóz cukrokat nem tudja etanollá erjesztetni (WIRAWAN *et al.*, 2012). Néhány kutatás arról számolt be, hogy a baktérium faj egyes törzsei képesek a xilóz hasznosítására is, azonban annak mértéke nem számottevő. ZHANG és munkatársai (2016) leírták, hogy a baktérium ugyanazon a transzporterén keresztül veszi fel a xilózt, mint a glükózt, viszont a glükózt részesíti előnyben.

Az etanol fermentáció hatékonysága kettő vagy annál több erjesztő mikroorganizmus alkalmazásával (vegyes kultúra) is növelhető, ugyanis azok szinergens hatásának eredményeként a termék inhibíció mérsékelhető, az erjeszthető cukor spektrum megnő.

6. táblázat: Néhány lignocellulóz biomassza erjeszhető cukortartalmának laboratóriumi szinten tanulmányozott alkoholos erjesztése és az elért etanol hozamok alakulása különböző hexóz és/vagy pentóz cukrot erjesztő mikroorganizmus(ok) alkalmazásával

Erjesztő mikroorganizmus(ok)	Alapanyag	Etanol konc. (% _{v/v})	Hivatkozás
rekombináns <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	glükóz	3,4	GUNASEKARAN és RAJ, 1999
rekombináns <i>Klebsiella oxytoca</i> P2	kukoricarost hidrolizátum	2,5-3,2	MONIRUZZAMAN <i>et al.</i> , 1996
rekombináns <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MNIV/GS	rizs szalma hidrolizátum	0,9	YAMADA <i>et al.</i> , 2011
rekombináns <i>S. cerevisiae</i> KF-7	előhidrolizált papírpép	5,3	NISHIMURA <i>et al.</i> , 2015
rekombináns <i>Kluyveromyces fragilis</i> CECT 10875	cukornád bagasz	2,4	BALLASTEROS <i>et al.</i> , 2004
<i>Candida shehatae</i> ATCC 22984	rizs szalma	0,4	TANIMURA <i>et al.</i> , 2012
rögzített <i>Zymomonas mobilis</i> NBRC 13756	előhidrolizált papírpép	2,3	YAMASHITA <i>et al.</i> , 2008
<i>Z. mobilis</i> TISTR0548 <i>C. shehatae</i> TISTR5843	élelmiszer hulladék	10	BUTTOWSKI <i>et al.</i> , 2014

Továbbá az erjesztés folyamata gyorsabban játszódik le, mint az monokultúrával (egy mikroorganizmus) elérhető lenne (ISMAIL *et al.*, 2012). A *Kluyveromyces marxianus* - a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőhöz hasonlóan - szintén kedvező alkoholtermelő tulajdonságokkal rendelkezik (BOLLÓK *et al.*, 2000). Továbbá hőtűrő (termotoleráns) szervezetként magas hőmérsékleten is elvégezhető az etanol termelés, ezáltal az erjesztési idő lerövidül, a fermentlé szennyeződésének veszélye, valamint az enzimes hidrolízist követően a hűtési költség is csökkenthető. A *Saccharomyces cerevisiae* erjesztési hőmérséklete 30-35 °C, ezzel szemben a *Kluyveromyces marxianus* 40 °C-on és a felett is termel etanolt. A kutatások bizonyították, hogy a maximális növekedési hőmérséklete 47 °C, 49 °C vagy akár 52 °C is lehet (ANDERSON *et al.*, 1988; BANAT *et al.*, 1992; FONSECA *et al.*, 2008). Az erjesztési kísérletek során azt a következtetést vonták le, hogy az erjeszhető cukrok etanollá alakítása ezen élesztőnél azonban lassabban játszódik le, viszont csekély mértékben, de néhány törzsnél a cellobióz és a xilóz hasznosítása is kimutatható (RODRUSSAMEE *et al.*, 2011; DE SOUZA *et al.*, 2012). A két élesztő, a *Saccharomyces cerevisiae* és a *Kluyveromyces marxianus* előnyeinek ötvözésével növelt erjesztési hatékonyság érhető el (GUO *et al.*, 2010; EIADPUM *et al.*, 2012). Az élesztő-baktérium kultúráknál is ígéretes etanol termelőképeséget közöltek (GOSHIMA *et al.*, 2013).

A közelmúltban továbbfejlesztett erjesztési technikák között a szimultán cukrosítás és ko-fermentáció (SSCF) - hasonlóan az szimultán cukrosítás és erjesztés technikához (SSF) - esetén az enzimes hidrolízissel párhuzamosan az erjeszhető cukrok etanollá konvertálása is elindul, azonban az erjesztésnél olyan mikroorganizmust vagy vegyes kultúrát alkalmaznak, amely lehetővé teszi a glükóz és a xilóz szimultán etanollá alakítását. A közvetett mikrobiális konverzió (CBP) a szénhidrátok cukrosítását és erjesztését egyetlen mikroorganizmus végzi el, aminek a tenyésztése is az etanol gyártástechnológiához kapcsolva történik (OLOFSSON *et al.*, 2008).

A lignocellulóz tartalmú biomassza etanol célú hasznosítása terén további kutatások a szakaszos, a rátáplálásos, a folytonos erjesztések technikák hatékonyságának növelésére, a rögzített sejtes/enzimes rendszerek, valamint a géntechnikai eszközökkel módosított élesztők és baktériumok alkalmazására irányulnak (LAWFORD és ROUSSEAU, 1991; AMUTHA és GUNASEKARAN, 2001). A törzsfeljesztéseknek köszönhetően az etanollal, a szénhidrát tartalommal vagy a hőmérséklettel szembeni tolerancia kialakítható és növelhető, valamint a hexóz (glükóz) és a pentóz (xilóz, arabinóz) cukrok szimultán etanollá történő konvertálása, sőt akár a szimultán cellulóz és hemicellulóz hidrolízis és erjesztés egyazon mikroorganizmus alkalmazásával is megvalósíthatóvá válhat (MOYSÉS *et al.*, 2016). Ezidáig nagy áttörést nem értek el, aminek valószínűsíthető oka, hogy a donor és a recipiens szervezet (élesztőgomba, baktérium) biokémiai rendszere között lényegi eltérések mutatkoznak, ami miatt a génátvitelt követően a gén megnyilvánulása, a fehérje termelése és annak érése nem vagy nem tökéletesen megy végbe. E terület még további biotechnológiai kutatásokat igényel (NISHIMURA *et al.*, 2015).

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Felhasznált anyagok

A kutatómunkám során az alkalmazott anyagok és vegyszerek - amennyiben azok eredetét nem említettem az egyes fejezeteknél - beszerzése a Merck Kft.-től, VWR International Kft.-től, valamint a REANAL Gyógyszer- és Finomvegyszergyár Zrt.-től történt.

3.1.1 Lignocellulóz tartalmú alapanyagok

A modellezési kísérleteim során 2 különböző, növényi eredetű ipari (mellék)terméket, a finoman őrölt búzakorpát (Alnatura GmbH, Ausztria), valamint kommunális papír hulladékot - irodai papírokat, valamint sík-és lézernyomatott újságpapírok keverékeit - alkalmaztam. Az előkezelést megelőzően a mintákat 70 °C-on, 6 órán át szárítottam. A szárított mintákat víz vagy egyéb oldat hozzáadása nélkül autoklávozással steriliztem, 121 °C-on, 20 percen át.

3.1.2 Mikroorganizmusok

A búzakorpa mikrobiális előkezelésénél, valamint az alkoholos erjesztéseknél alkalmazott mikroorganizmusokat – az *Aspergillus niger* IMI 303386 törzs kivételével- a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM, Budapest) biztosította. A szárított *Saccharomyces cerevisiae* (Levuline Fb) fajélesztő a svájci Danstar Ferment A.G. Kft.-től származott. A **7. és 8. táblázat** a kutatómunkámba bevont törzseket összesíti.

7. táblázat: A biológiai előkezelés során alkalmazott törzsek

FONALAS GOMBÁK		ÉLESZTŐGOMBÁK	
Faj	Törzs	Faj	Törzs
<i>Aspergillus niger</i>	F.00071	<i>Candida shehatae</i>	F.01400 ^T
<i>Aspergillus niger</i>	F.00617	<i>Candida tenuis</i>	F.00953 ^T
<i>Aspergillus niger</i>	F.00632	<i>Candida tenuis</i>	F.01079 ^T
<i>Aspergillus niger</i>	F.00714	<i>Pichia stipitis</i>	F.00810
<i>Aspergillus niger</i>	F.00721	<i>Pichia stipitis</i>	F.00888
<i>Aspergillus niger</i>	F.00735	<i>Pichia stipitis</i>	F.00901
<i>Aspergillus niger</i>	F.00770		
<i>Aspergillus niger</i>	IMI 303386		

FONALAS GOMBÁK	
Faj	Törzs
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	F.00892
<i>Aspergillus wentii</i>	F.00167
<i>Aspergillus awamori</i>	F.00720
<i>Mucor sp.</i>	F.00784
<i>Penicillium chrysogenum</i>	F.00814
<i>Penicillium chrysogenum</i>	F.00834
<i>Penicillium chrysogenum</i>	F.00837
<i>Penicillium chrysogenum</i>	F.00853
<i>Penicillium chrysogenum</i>	F.00680 ^T
<i>Penicillium granulatum</i>	F.00913
<i>Penicillium expansum</i>	F.00811
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	F.00740
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	F.00771
<i>Rhizopus oryzae</i>	F.00617
<i>Rhizopus oryzae</i>	F.00861
<i>Rhizopus stolonifer</i>	F.00654
<i>Trichoderma reesei</i>	F.00651
<i>Trichoderma viride</i>	F.00795
<i>Trichoderma viride</i>	F.00965
<i>Trichoderma koningi</i>	F.00791
<i>Trichoderma koningi</i>	F.00961

IMI- International Mycological Institute, Surrey, Nagy-Britannia; T – Típustörzs

8. táblázat: A hidrolizátumok alkoholos erjesztése során alkalmazott törzsek

ÉLESZTŐGOMBA		BAKTÉRIUM	
Mezofil			
Faj	Törzs	Faj	Törzs
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levuline Fb	<i>Zymomonas mobilis</i> <i>subsp. mobilis</i>	B.01327 ^T
Termofil			
Faj	Törzs		
<i>Lancanea thermotolerans</i>	Y.00702		
<i>Lancanea thermotolerans</i>	Y.00715		
<i>Lancanea thermotolerans</i>	Y.00775		
<i>Lancanea thermotolerans</i>	Y.00798		
<i>Lancanea thermotolerans</i>	Y.00873		
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Y.00959		

T - Típustörzs

3.1.3 Ipari enzimek készítmények

Az előkezelt növényi biomassza hidrolíziséhez ipari enzimek készítményeket és azok keverékeit alkalmaztam.

Celluláz - *Trichoderma reesei* ATCC 26921 által termelt, celluláz (CLA) (Cellulast 1.5L, Novozymes A/S, Denmark; 700 U/g) aktivitású enzimsűrítmény.

Cellobiáz (β -glükózidáz) - *Aspergillus niger* által termelt, cellobiáz (CLB) (Novozym 188, Novozymes A/S, Denmark; 250 U/g) aktivitású enzimsűrítmény.

Glükoamiláz - *Aspergillus niger* által termelt, exo-1-4- α -glükózidáz (AMG 300 L, Novozymes A/S, Denmark; 260 U/g) aktivitású enzimsűrítmény.

Xilanáz - *Thermomyces lanuginosus* által termelt, endo-1-4- β -xialnáz (Novozymes A/S, Denmark; ≥ 2500 U/g) aktivitású enzimpredarátum.

3.1.4 Tápközegek

Törzsfenntartáshoz alkalmazott tápagarak

Burgonyakivonat-glükóz agar (PDA, Potato-dextrose-agar)

Burgonya kivonat	0,4 g
Glükóz	2 g
Bakteriális agar	2 g
Desztillált víz	100 ml-re kiegészítve

Malátás agar

Glükóz	1 g
Élesztőkivonat	0,3 g
Pepton (húsból emésztett)	0,5 g
Maláta kivonat	0,3 g
Bakteriális agar	1,5 g
Desztillált víz	100 ml-re kiegészítve

Tenyésztéshez alkalmazott táplevesek

Glükóz-pepton-élesztőkivonat tápleves (GPY, Glucose-peptone-yeast extract)

Glükóz	40 g
Élesztőkivonat	50 g
Pepton (húsból emésztett)	50 g
Desztillált víz	1000 ml-re kiegészítve

Glükóz - pepton tápleves (GP, Glucose-peptone)

Glükóz	100 g
Pepton	10 g
Desztillált víz	1000 ml-re kiegészítve

Az elkészített tápagarokat, tápleveseket, valamint oldatokat használat előtt autoklávozással sterilizáltam, 121°C-on 20 percen keresztül.

3.1.5 Oldatok és pufferek***A búzakorpa biológiai előkezelésénél és hidrolízisénel***Citrát-foszfát puffer (pH=3-7) (MCILVAINE, 1921)

A oldat: 0,1 M citromsav-monohidrát oldat

B oldat: 0,2 M dinátrium-hidrogén-foszfát oldat

A két oldat különböző arányú elegyítésével készíthető el a megfelelő pH értékű puffer.

TritonX 100 oldat

TritonX	100 µl
Desztillált víz	1000 ml-re kiegészítve.

A papír hulladékok fizikai és fiziko-kémiai előkezelésénél és hidrolízisénelModell tinta oldat

Fekete tintapor (Hp)	100 mg
Etil-alkohol (96 %, v/v)	25 ml
Desztillált víz	75 ml

Na-acetát puffer (pH=5,5)

A oldat: 0,1 M ecetsav oldat

B oldat: 0,1 M nátrium-acetát oldat

100 ml puffer 14,5 ml A és 85,6 ml B oldat elegyítésével készíthető.

Savak, lúgok és oldószerek

10 % (m/v)-os ecetsav

10 és 20 % (m/v)-os nátrium-hidroxid

10, 15, 25, 35, 40, 50 % (v/v)-os etanol, 50 % (v/v)-os aceton

A redukáló cukortartalom mérésénél (SOMOGYI, 1945, 1951; NELSON, 1944)Somogyi I. oldat

vízmentes nátrium-szulfát	288 g
kálium-nátrium-tartarát 4-hidrát	24 g
nátrium-hidrogén-karbonát	32 g
vízmentes nátrium-karbonát	48 g

A komponenseket 1600 ml előzőleg felforralt, majd szobahőmérsékletűre lehűtött desztillált vízben oldottam kevertetés mellett.

Somogyi II. oldat

vízmentes nátrium-szulfát	72 g
réz-szulfát 5-hidrát	8 g

A komponenseket 400 ml előzőleg felforralt, majd szobahőmérsékletűre lehűtött desztillált vízben oldottam kevertetés mellett.

Használat előtt, mind a két oldatot, 27 °C-on, 24-48 órán át tároltam.

Nelson reagens

ammónium-molibdenát 4-hidrát	100 g
nátrium-hidrogén-arsenát	12 g
kénsav (cc.)	84 ml

A komponenseket 2000 ml desztillált vízben óvatosan elegyítettem, mágneses kevertetés mellett. Használata előtt sötét üvegben, fénytől elzárt helyen 37 °C-on, 24-48 órán át tároltam.

3.1.6 Adsorbensek

A modell festék oldat és a papír rostok előkezeléséhez, festékmentesítéséhez természetes biopolimereket, kitinből előállított kitozánt és annak módosított változatait, a glutáraldehiddel keresztkötött kitozánt és a Ca-alginát gélgyöngyökön rögzített kitozánt, is alkalmaztam.

3.2 Alkalmazott módszerek

3.2.1 Törzsfenntartás

A liofilizált preparátumokat fiziológiás sóoldatban rehidratáltam, majd ezt követően a tenyésztés burgonyakivonat-glükóz agaron történt. A korhasztó- és élesztőgomba törzseket aerob, a baktérium törzset anaerob körülmények között, 30 °C-on, 1 héten át inkubáltam. A fakultatív anaerob baktérium törzsnél az anaerob környezetet anaerob jar használatával biztosítottam. A törzstenyészetek hosszabb távon történő fenntartása malátás agaron történt. A tenyészeteket 4°C-on hűtőszekrényben tároltam.

3.2.2 Inokulum tenyészet előállítása

A búzakorpa mikrobiális előkezelésénél valamint az etanolfermentációnál alkalmazott élesztő törzsek szubmerz tenyészetek előállítása 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban, 100 ml töltöttség mellett, glükóz-pepton-élesztőkivonat táplevesekben történt. Ehhez, a szilárd agaron kinőtt egy-egy élesztő telepet steril oltókacs alkalmazásával oltottam át. A tenyésztést rázóinkubátorban, aerob körülmények között, 30 °C-on, 160 rpm rázatási sebességen, 24-48 órán át végeztem.

A baktérium törzsnél léptéknövelt szubmerz, rázatás nélküli tenyésztést alkalmaztam glükóz-pepton táplevesben. Az átoltásokat elsőként kémcsövekben, majd 250 ml-es és 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban, 50 ml és 250 ml táplevesben, 72-96 órás időtartammal végeztem. A baktérium tenyésztése 30 °C-on, anaerob jarban történt.

A szárított *Saccharomyces cerevisiae* élesztőt a gyártó által ajánlott beoltási dózis (0,25-0,3 g/L) szerint alkalmaztam. Az élesztő rehidratálása tápsóval (Uvavital, 0,25-0,3 g/L) kiegészített 10 % (m/v)-os szobahőmérsékletű glükóz oldatban, mágneses kevertetés mellett, 15-20 percen keresztül történt.

3.2.3 A búzakorpa biológiai előkezelése

A biológiai előkezelés laboratóriumi méretekben, 250 ml-es és 1000 ml-es Erlenmeyer lombikban, 10 és 40 g steril, száraz, finoman őrölt búzakorpán történt. A búzakorpa nedvesítési arányának, valamint az előkezelés kezdeti pH értékének beállításához 0,15 M citrát-foszfát puffert alkalmaztam. A korhadást okozó gombák törzstenyészetekkel történő beoltáshoz a szilárd agaron kinőtt konídiumokat 5 ml 0,01 %-os TritonX-100 felületaktív anyag oldatával, steril üveggyöngyök és vortex használatával távolítottam el. Az élesztő törzsek esetén az előzőekben ismertetett szubmerz, rázatott lombikos tenyészeteket alkalmaztam.

A beoltási konídium szám (10^7 konídium/g) és az élesztő sejtszám (10^7 sejt/g) meghatározása Bürker-kamra alkalmazásával, valamint az élesztő törzsek esetén spektrofotometriás úton is, 600 nm hullámhosszon (Unicam, Helios Alpha) az optikai denzitás (sejtsűrűség, OD600 érték) mérésével történt.

A mikrobiális előkezelést törzsenként két párhuzamossal indítottam. Az elkészített egységeket vattadúgóval és gézlappal zártam le és 30 °C-on, 7, esetenként 9 napon át inkubáltam. A mintavételt 24 óránként, steril körülmények között végeztem.

3.2.4 Előkészítési és tisztítási technikák a papír festékmentesítéséhez

3.2.4.1 Mosás és áztatás

Az aprított, 1 g irodai és nyomtatott papír mintákat (2x2cm) 250 ml-es mérőpoharakban, kemikáliák (savak, lúgok, oldószerek) 100 ml vizes oldataiban 4 órán át, 30°C-on, áztattam. Kontrollként kemikália nélküli, vizes áztatás is történt. Az áztatást követően a papír mintákat vízzel többször átmostam, a mosások között a mintákat átszűrtem. A szilárd frakciókat 70°C-on 6 órán át szárítottam.

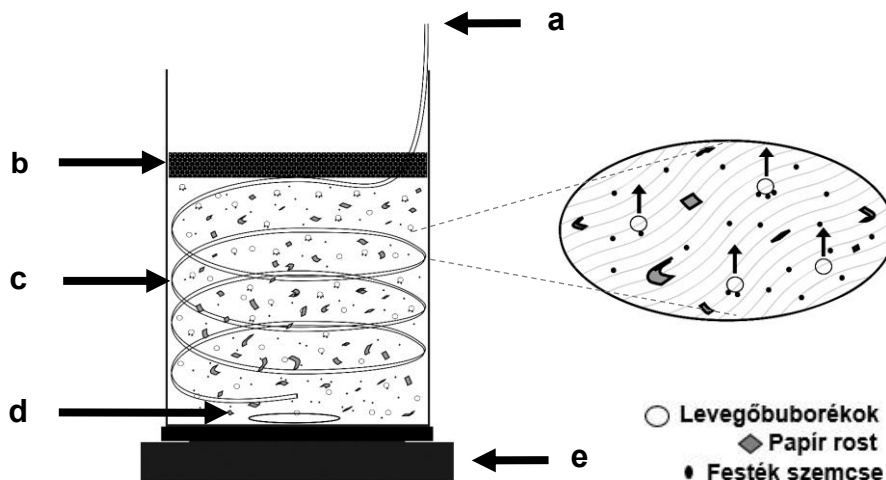
3.2.4.2 Mikrohullámú és ultrahangos kezelések

A mikrohullámú és az ultrahangos kezeléshez az aprított, 2 g nyomtatott papír mintákat 100 ml desztillált vízben pépesítettem, szűrtem és szerves oldószer (etanol) 15 % (v/v)-os vizes oldatával 30 ml 1 % (m/v)-os mintákat készítettem. A mintákat 50 ml-es hóálló kupakkal ellátott, üvegedényekbe mértem. A mikrohullámú kezelés 5, 15 és 30 percen át tartott háztartási mikrohullámú készülékben, 750 W teljesítmény mellett. Az ultrahangos kezelések időtartama 15, 30 illetve 60 perc volt, amely laboratóriumi, kisméretű ultrahangos készülékkel (CliftonTM, Thermo Fisher Scientific Corporation), 50-60 Hz frekvencián történt. Kontrollként etanol nélküli, vizes kezelés is történt. A kezeléseket követően a papírmintákat átszűrtem, desztillált vízzel többször átmostam és 70 °C-on 6 órán át szárítottam.

3.2.4.3 Flotáció

A három, eltérő méretű papír minta (durva minta: 0,5x0,5 cm, és 2x2 cm; finom minta: rostsuszpenzió) flotálását, 1 % (m/v) konzisztencia mellett, szerves oldószerként etanolt tartalmazó vizes oldatokban (10-50 %, v/v), 1000 ml-es üvegedényekben, 500 ml töltöttség mellett végeztem. A levegő áramoltatása az üvegedény falához rögzített, 0,5 mm és 1 mm közötti átmérőjű perforációkkal ellátott, kompresszorral összekötött szilikoncsövek alkalmazásával történt. A levegőbuborékok egyenletes eloszlását és azok papír mintákkal való érintkezését fűthető mágneses keverő biztosította. A kísérleteket jellemzően 30 °C-on és 50 °C-on végeztem, melyek időtartama 5, 15 és 30 perc volt. A kezelt papír mintákat a szűrést követően desztillált vízzel többször átmostam és a szilárd frakciókat 70 °C-on 6 órán át szárítottam.

Az általam kialakított laboratóriumi méretű oldottlevegős flotációs berendezés sematikus ábrázolása az alábbi **6. ábrán** látható.



6. ábra: Laboratóriumi méretű oldottlevegős flotáló (DAF) berendezés
 a. levegő bevezetés (kompresszorral), b. festék és egyéb szennyezőanyagok,
 c. perforált szilikoncső (0,5-1 mm), d. mágnes, e. fűthető mágneses keverő

3.2.4.4 *Kitozán adszorbensek előállítása és alkalmazása*

Az kitozánt rák páncélból származó kitin lúgos deacetilezésével állítottam elő, ami YOUNES és RINAUDO (2015) leírása szerint történt. A kitozánnal és annak módosított változataival a kísérleteket minden esetben két párhuzamosban indítottam el.

Glutáraldehiddel keresztkötött kitozán

A keresztkötött kitozán készítéséhez 2 g kitozánt 100 ml, 0,1 M-os Na-acetát pufferben (pH=5,5) oldottam, melyhez 2,5 ml, 25 % (v/v)-os glutáraldehidet adtam. Az oldatot 15 percen át kevertetem, majd szűrőpapíron átszűrtem és ezalatt desztillált vízzel többször átmostam. Az elkészített módosított kitozánt használat előtt 70 °C-on 6 órán át szárítottam.

Ca-alginát gélgyöngyökön rögzített deacetilezett kitozán

A Ca-alginát gélgyöngyök készítéséhez hagyományos csepegtetési módszert alkalmaztam. Az 1 % (m/v)-os Na-alginát oldatot cseppenként adtam a 2 % (m/v)-os CaCl oldathoz, mágneses kevertetés mellett. Az elkészült Ca-alginát gyöngyöket (2-2,5 mm átmérő) desztillált vízzel mostam. A rögzítési technika során a kitozánt eltérő mennyiségekben (0,3-2 g) kevertetem 10 g Ca-alginát gyönggyel 200 ml, 0,1 M Na-acetát pufferben (pH=5,5), 3 órán át. A módosított adszorbent használat előtt desztillált vízzel többször átmostam.

A 3 különböző kitozán adszorbenst a 100 ppm tinta modell oldatnál, valamint a Ca-alginát gélyöngyökön rögzített kitozánt az ugyanezen tintát tartalmazó, nyomtatott papír keverékből készített 1 % (m/v)-os, illetve az erjesztési kísérleteknél léptéknövelt, 10 % (m/v)-os pépeknél is használtam. A modell oldatoknál a tinta megkötésének hatékonyságát eltérő adszorbens mennyiség (2,5-20 m/v %), kezelési idő (5, 15 és 30 perc), hőmérséklet (30, 35, 40, 45, 50 és 55°C) és kémhatás (Na-acetát puffer, pH=3,5-5,5 és citrát-foszfát puffer, pH=6,5) mellett néztem állandó 220 rpm fordulatszámú rázatási sebességen. Optimált környezeti paraméterek mellett történt a papír minták előkezelése, ahol a Ca-alginát gélyöngyökön rögzített kitozánt 1-10 % (m/v)-ban alkalmaztam. A kezelést követően a gyöngyöket eltávolítottam és a papír mintákat desztillált vízzel átmostam. Az előzőekkel hasonlóan, a szilárd frakciókat 70 °C-on 6 órán át szárítottam.

3.2.5 Lignocellulózok hidrolízise

3.2.5.1 Savas hidrolízis

A búzakarpa és a papír minták oldható szénhidrát tartalmának meghatározásához híg kénsavas kezelést alkalmaztam. Mindkét esetben 10 g szubsztátumot híg kénsav oldatban (2 %, v/v) 60 °C-on, 24 órán át 220 rpm fordulatszámon rázattam. A kezelést követően a mintákat 0,1 N NaOH oldattal, közel semleges pH tartományba állítottam. Az oldatba vitt szénhidrátok mennyiségét HPLC technikával határoztam meg.

3.2.5.2 Enzimes hidrolízis

A mikrobiálisan előkezelt búzakarpa, valamint a fizikai és fiziko-kémiai módon kezelt papír minták enzimes hidrolíziséhez ipari enzimek készítményeket eltérő dózisokban, valamint enzim keverékeként alkalmaztam. A mikrobiálisan előkezelt búzakarpa enzimes bontásához celluláz (350, 1050, 2100 U/g), cellobiáz (260, 520, 780 U/g) és xilanáz (2500, 5000, 7000 U/g), az előkezelt papír mintáknál a celluláz (2100 U/g) és a cellobiáz (780 U/g) mellett amiloglükozidáz (320 U/g) aktivitású enzimek készítményét alkalmaztam. Az enzimek készítmények működési optimumai közel hasonló tartományokban voltak, ezért egy lépéses enzimes hidrolízist alkalmaztam, ami minden esetben két párhuzamos mintával pH=5,5 értéken, 50°C-on, 220 rpm fordulatszámú ráztatás mellett, 24, esetenként 48 órán át tartott. A redukáló cukortartalom és az oldott szénhidrát tartalom méréséhez az enzimes reakciókat forralással állítottam le.

3.2.6 Etanol fermentációs kísérletek

Az oldatba vitt cukrok etanollá konvertálása két különböző erjesztési technikával, szeparált (SHF), valamint szimultán (SSF) cukrosítással és erjesztéssel történt. Az alkoholos erjesztési kísérleteket 500 ml-es, vízzárral ellátott kotyogóval lezárt Erlenmeyer lombikokban, 250 ml előkezelt és enzimesen hidrolizált mintákkal, tápanyag kiegészítés nélkül végeztem. A minták pH értékét 21 % (v/v)-os foszforsavval SHF esetén pH=3,2-es értékre, az SSF esetén az enzimek aktivitásának is kedvezőbb pH=4,5-es értékre állítottam.

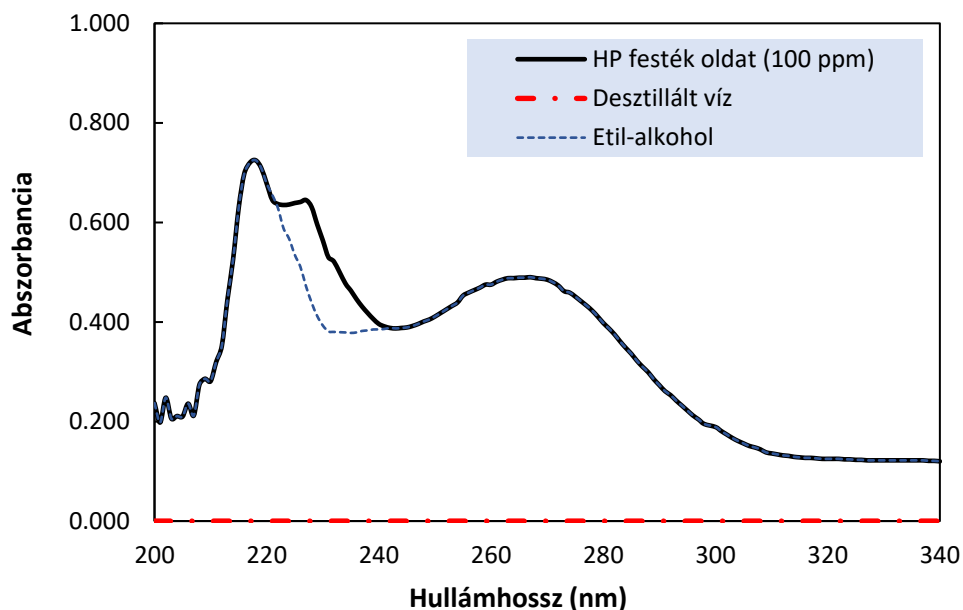
Az elérhető etanol koncentráció és a szénhidrát konverzió hatékonyságának növeléséhez különböző beoltási technikákat, mono- és vegyes kultúrákkal történő erjesztéseket alkalmaztam. A búzakorpa etanol célú hasznosításánál időben eltolt inokulum rátáplálás hatását is néztem, ahol az élesztő-élesztő kultúra mellett a baktérium kultúrát a 4. és az 5. napon adtam az erjedő cefrékhez. Minden esetben a három párhuzamosan indított cefre beoltása 10 % (v/v) inokulummal történt. A vegyes kultúrákban a sejtszám 1:1 arányú beállítását spektrofotometriás úton, 600 nm hullámhosszon (Unicam, Helios Alpha), optikai denzitás (sejtsűrűség, OD600 érték) mérésével határoztam. Az erjesztési kísérleteknél a lombikokat 30°C-on, 7 napon át inkubáltam. A mintavétel naponta történt.

3.3 Analitikai módszerek

3.3.1 Festékanyag megkötésének meghatározása

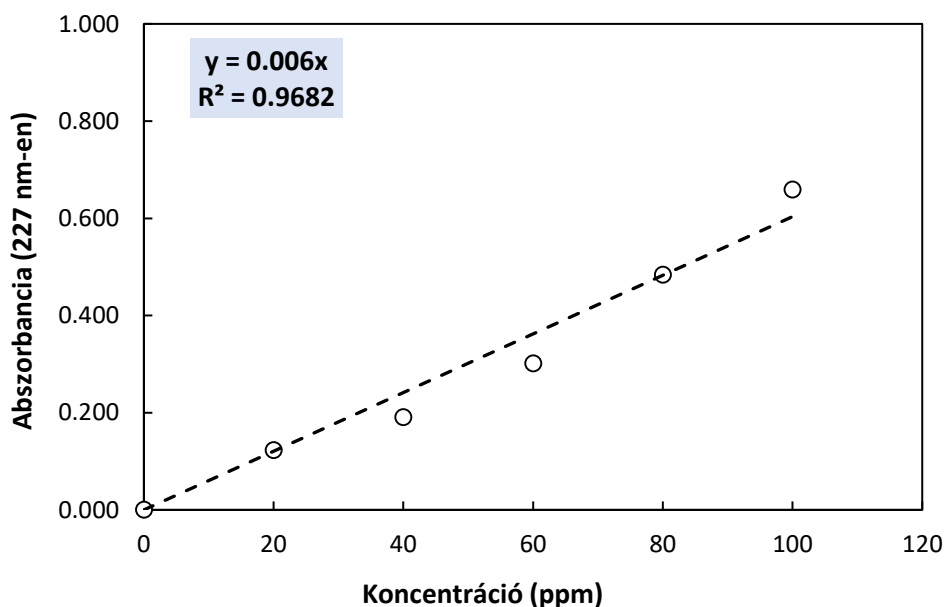
A tinta részecskék maximális fényelnyelési értékének meghatározásához hullámhosszpásztázást végeztem spektrofotométer (Unicam, Alpha Helios) alkalmazásával, ultraibolya (UV, $200 \text{ nm} \leq \lambda \leq 400 \text{ nm}$) tartományban.

A **7. ábrán** a modell tinta oldat mellett a szerves oldószer (etanol) valamint a desztillált víz abszorpciós spektruma látható. E szerint a Carbon Black festék pigment maximális fényelnyelési értéke 227 nm-en található.



7. ábra: HP festék oldat (100 ppm, etil-alkohol és HP festék 4:1 arányú elegye), etil-alkohol és desztillált víz abszorpciós spektruma (200 nm - 400 nm között)

A kalibrációhoz oldatsorozatot (100 ppm, 80 ppm, 60 ppm, 40 ppm, 20 ppm, 0 ppm) készítettem, melynek segítségével meghatároztam az abszorbanca koncentráció függését 227 nm hullámhosszon (**8. ábra**). Az egyenes egyenletének alkalmazásával meghatározható a kitozánnal kezelt modell oldatok és papír minták esetén a festék pigmentek megkötésének hatékonysága.



8. ábra: A különböző kitozán származékok tinta rögzítési hatékonyságának meghatározásához készített kalibráció (0-100 ppm HP tinta oldat)

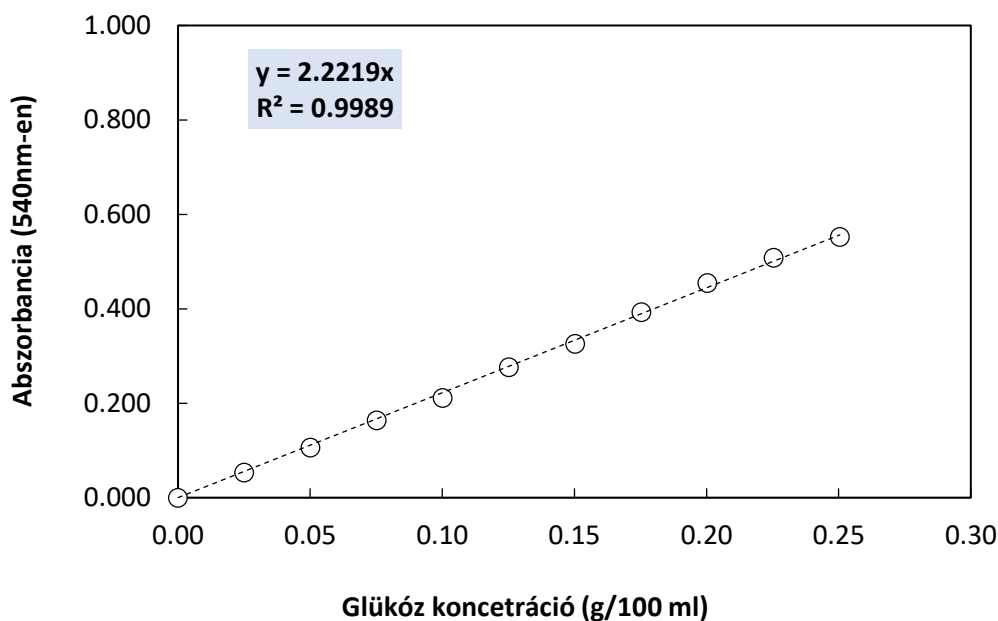
A determinációs koefficiens (R^2) értéke 96,82 %, amely bizonyítja a regressziós modell megfelelő illeszkedését.

3.3.2 Az oldható szénhidrát tartalom meghatározása

A búzaborpa biológiai előkezelésénél, valamint az enzimes hidrolíziseknél és etanolfermentációknál az oldatba vitt szénhidrátok minőségi és mennyiségi változásának nyomon követéséhez HPLC technikát, a redukáló cukortartalom méréshez Somogyi-Nelson módszert alkalmaztam.

Redukáló cukortartalom mérés

A módszer lényege, hogy lúgos közegben a redukáló cukrok a Cu(II)-ionokat Cu(I)-oxid téglavörös csapadékká redukálják, miközben a szabad glikozidos hidroxilcsoportok oxidálódnak. A Cu(I)-oxidot az arzenomolibdenát komplex tovább redukálja, amit a reakcióelegy kék színű elváltozása mutat. E színváltozás spektrofotometriás úton, 540 nm hullámhosszon (Unicam, Helios Alpha) mérhető (SOMOGYI, 1945, 1951; NELSON, 1944).



9. ábra: A redukáló cukortartalom méréséhez készített kalibrációs egyenese és az egyenes egyenlete, glükóz standard esetében

Az egyes minták redukáló cukortartalmának meghatározásához kalibrációs egyenest készítettem, glükóz standard alkalmazása mellett. A 0,5 % (m/v)-os glükóz törzsoldattal 10 tagú, tagonként 2 ml, hígítási sorozatot állítottam elő. A mintákhoz 2 ml Somogyi I. és II. oldat 4:1 arányú elegyét pipettáztam, amit követően azokat 15 percen át forrásban lévő vízben tartottam. A szobahőmérsékletűre lehűtött mintákat 2 ml Nelson reagenssel és 4 ml

deszillált vízzel egészítettem ki. A keletkező szén-dioxidot Pasteur-pipettával távolítottam el. A spektrofotométert 540 nm hullámhosszon a vak mintára (glükózt nem tartalmaz) nulláztam. A mért abszorbancia értékeket a redukáló cukor koncentrációk függvényében ábrázoltam. A kapott pontokra lineáris, regressziós egyenest illeszttem. A **9. ábrán** is látható, hogy a determinációs koefficiens (R^2) értéke 98,53 %, amely bizonyítja a regressziós modell jóságát és illeszkedését.

A továbbiakban a kísérleteim során vett minták előkészítését követően, azok ismeretlen redukáló cukor tartalmát az kalibrációs egyenes egyenletének alkalmazásával meghatároztam. A biológiailag feltárt búzakorpa mintákat 25 ml, 0,01 %-os TritonX-100 oldatában 1 órán át extraháltam 220 rpm rázatási sebességen. A kapott folyadék frakciókat, valamint a többi előkezelési műveleteknél, az enzimes hidrolíziseknél, valamint az alkoholos erjesztéseknél vett mintákat 1,5 ml-es Eppendorf csövekben 14000 rpm fordulatszámon, 10 percen keresztül centrifugáltam. A redukáló cukortartalom meghatározásához a felülúszót használtam, és minden esetben két párhuzamossal indítottam a méréseket.

3.3.3 HPLC technika

A nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás analízist (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) megelőzően a mintákat a redukáló cukortartalom módszerénél leírtakkal azonosan készítettem elő. A minták egyes szénhidrát komponenseinek minőségi meghatározása a retenciós idő szerint, ismert koncentrációjú standard szénhidrát oldatok (D-glükóz, D-xilóz, D-maltóz, D-cellobióz és D-maltotrióz) alkalmazásával történt. Az előkészített minták analízisét a Thermo Fisher Scientific Corporation által gyártott Surveyor típusú HPLC készülékkel végeztem, melynek beállításait az alábbi **9. táblázat** tartalmazza.

9. táblázat: Az egyes szénhidrátok minőségi és mennyiségi meghatározásához használt HPLC készülék technikai paraméterei

Oszlop	Aminex-87H (Bio-Rad, USA)
Eluens	0,005 n H ₂ SO ₄
Integráló szoftver	ChromQuest 5.0
Detektor	RI
Oszlop hőmérséklet	45 °C
Detektor hőmérséklet	40 °C
Áramlási sebesség	0,6 ml/perc
Eluálási mód	Izokromatikus

3.3.4 Alkohol tartalom meghatározása

Az erjedő cefrék alkohol tartalmának időbeni változását etil-alkohol standard oldat segítségével, HPLC analízissel követtem nyomon.

Az erjesztési kísérletek végén mintánként 100 ml mennyiséget Büchi Distillation Unit K-350-es típusú készülékkel desztilláltam. A 100 cm³ térfogatú mérőlombikokban összegyűjtött desztillátumokat szobahőmérsékletűre hűtöttem le és desztillált vízzel jelig töltöttem. A kapott minták alkohol tartalmát Anton Paar DMA 35N típusú kézi alkoholmérő készülék használatával mértem.

4 KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A kutatómunkámban két növényi eredetű biomassza, a búzakorpa és a papír hulladék, etanol célú hasznosításának lehetőségét, ezen belül a kritikus technológiai műveleteket - az előkezelést, az enzimes hidrolízist és az etanolfermentációt - laboratóriumi léptékben vizsgáltam.

4.1 A búzakorpa etanol célú hasznosításának modellezése

4.1.1 A búzakorpa biológiai előkezelése

A biodegradációs modellkísérletek során 29 korhadást okozó gomba, valamint 6 élesztőgomba törzs lignocellulóz bontó természetét vizsgáltam kontrollált, szabad nedvességtartalom mellett, búzakorpa szubsztrátumon. A szelektálás az oldatba vihető szénhidrát mennyiség és az előkezelés időtartama alapján történt.

4.1.1.1 Fonalasgomba törzsek szelektálása

A szilárd szubsztrátumon történő előkezelés során a korhadást okozó gombák a micéliumaikkal átszőtték a búzakorpát, ami már az előkezelés első szakaszában, a 24. órát követően szemmel is láthatóvá vált. A törzsek nagyrésze viszonylag gyors ütemű növekedést mutatott a micéliumaik számára elérhető támadási felületen. Az *Aspergillus niger* F.00770 törzs, valamint a *Mucor*, a *Rhizopus* és a *Phanerochaete* törzsek azonban lassabban növekedtek az adott szelektálási körülmények mellett.

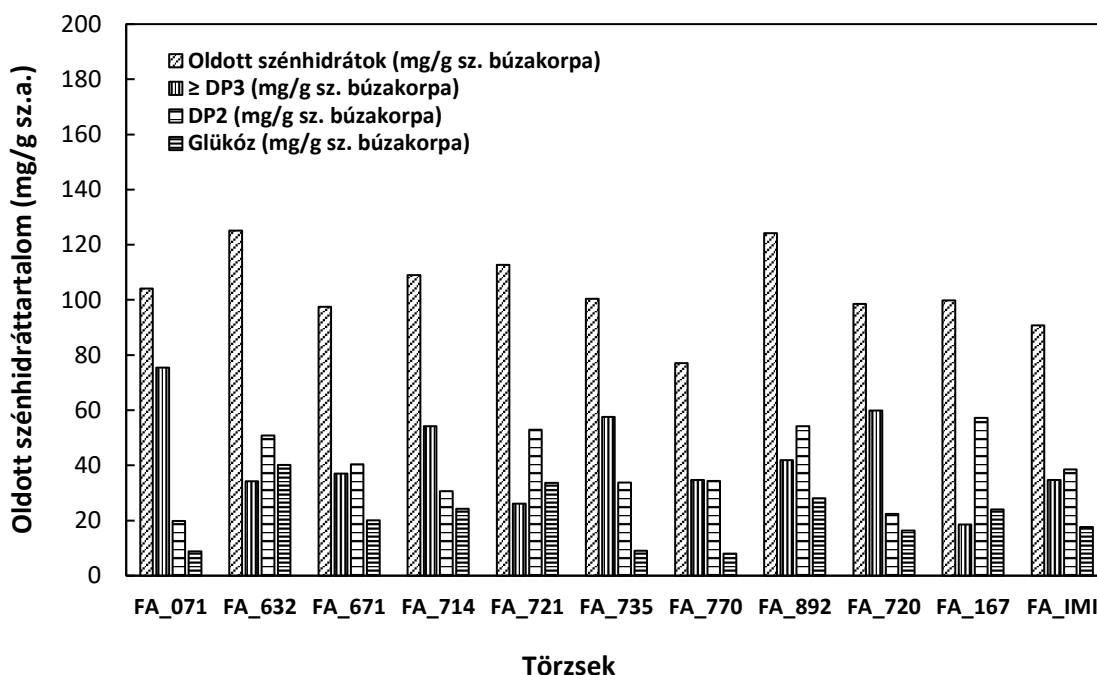
Megállapítható, hogy a búzakorpa megfelelő táptalajnak bizonyult a korhasztó gombák növekedéséhez, szaporodásához és az enzimek szintéziséhez. CHANDRA és munkatársai (2007) az *Aspergillus niger* izolátum cellulózbontó enzimaktivitását a búzakorpa mellett földimogyoró héjon, rizs pelyván és fűrészporon is vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy a búzakorpán nagyobb enzimtermelés érhető el. SUN és munkatársai (2008) az *Aspergillus fumigatus* SKH2 törzsnél, JENA és munkatársai (2016) a *Penicillium decumbens* 114-2 törzsnél tettek hasonló megállapításokat, e növényi szubsztrátum alkalmazása szintén kedvezően indukálta a celluláz és egyéb hidrolitikus (és az oxidatív) enzimek szintézisét.

A búzakorpa biológiai kezelése során megfigyeltem, hogy az oldatba vihető szénhidráttartalom a törzsek nagyrésznél a 3. és 5. nap között érte el a maximumot, és azt követően csökkent az egyszerű, könnyen hasznosítható cukrok (elsősorban a glükóz) mennyisége. Ennek az a magyarázata, hogy a korhadást okozó gombák az egyszerű cukrok

iránt nagyobb affinitást mutatnak, ezáltal gyorsabb is azok hasznosítása, mint az összetett szerkezetű szénhidrát polimerek bontása (WANG *et al.*, 2013; SINDHU *et al.*, 2016).

Aspergillus nemzetség

Kísérleteimben elsőként 11 *Aspergillus* nemzetséghez tartozó törzset vizsgáltam. Az elért eredményeket a **10. ábra** szemléleti.



10. ábra: Az oldott szénhidrátartalom alakulása az *Aspergillus* törzsekkel történő búzakorpa előkezelése során

Jelmagyarázat: **FA_071:** *A. niger* F.00071, **FA_632:** *A. niger* F.00632, **FA_671:** *A. niger* F.00671, **FA_714:** *A. niger* F.00714, **FA_721:** *A. niger* F.00721, **FA_735:** *A. niger* F.00735, **FA_770:** *A. niger* F.00770, **FA_892:** *A. brasiliensis* F.00892, **FA_720:** *A. awamori* F.00720, **FA_167:** *A. wentii* F.00167, **FA_IMI:** *A. niger* IMI 303386

Az előkezelések 30 °C-on, pH=5 értéken, 7 napon át tartottak. A nedvesítési arány 7:1, a bevitt konídium szám 10^7 konídium/g sz. búzakorpa volt.

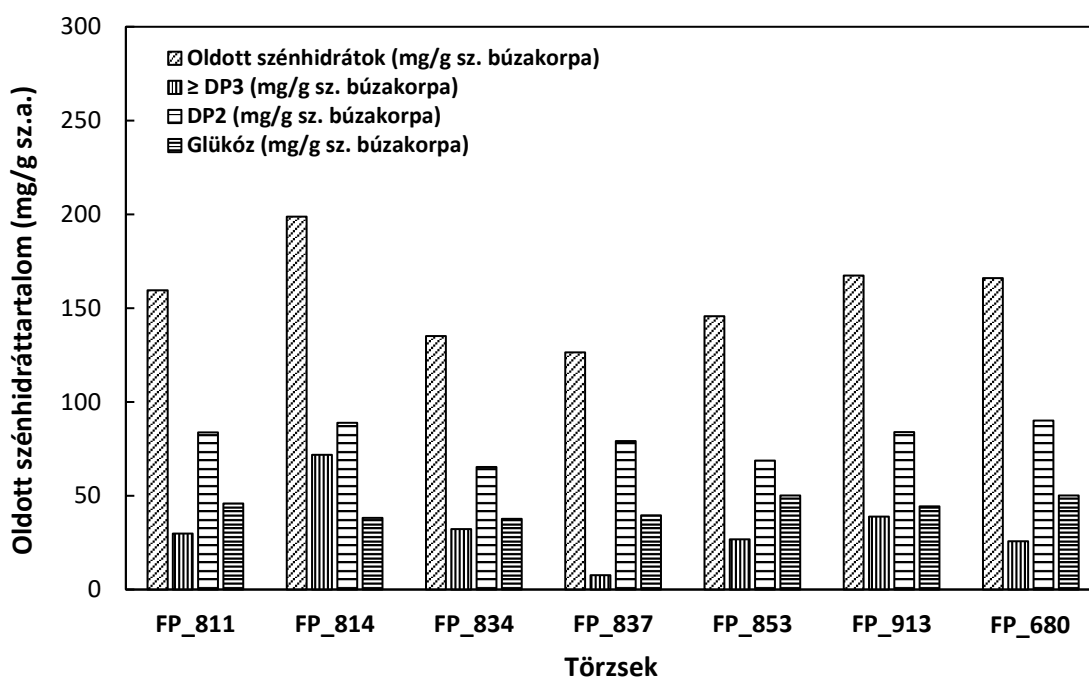
Az előkezelés során két törzs, az *A. niger* F.00770 (FA_770) és az *A. niger* IMI 303386 (FA_IMI) törzs kivételével, az oldott szénhidrát koncentráció 98 mg/g és 125 mg/g között alakult, ami az elméleti szénhidrát hozamnak 11-15 %-át teszi ki.

A törzseknél minden esetben tapasztaltam a részbeni szénhidrát hidrolízist is, azonban az adott környezeti viszonyok mellett a törzsek teljesítménye eltéréseket mutatott. Három törzs, az *A. brasiliensis* F.00892 (FA_892), az *A. niger* F.00632 (FA_632) valamint az *A. niger* F.00721 (FA_721) törzs eredményezett nagyobb diszacharid (50-54 mg/g) és glükóz (28-40 mg/g) kihozatalt. Továbbá, az *A. wentii* F.00167 (FA_167) törzs is kedvező

lignocellulóz bontást mutatott, a diszacharidok mennyisége meghaladta az 55 mg/g értéket, azonban az előző három törzssel szemben, a glükóz mennyisége (24 mg/g) már kisebb volt.

Penicillium nemzetség

A továbbiakban 7 *Penicillium* nemzetséghez tartozó törzs lignocellulóz szerkezetet bontó tulajdonságát vizsgáltam. Az elért eredményeket a **11. ábra** szemlélteti.



11. ábra: Az oldott szénhidráttartalom alakulása a *Penicillium* törzsekkel történő búzakorpa előkezelése során

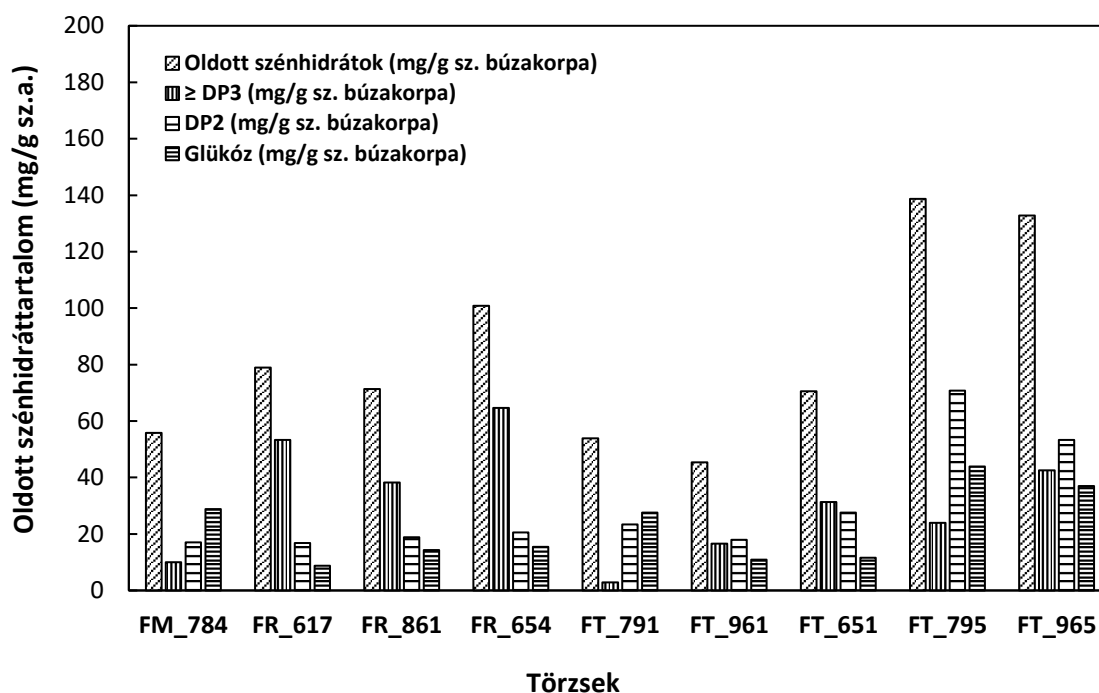
Jelmagyarázat: **FP_811:** *P. expansum* F.00811, **FP_814:** *P. chrysogenum* F.00814, **FP_834:** *P. chrysogenum* F.00834, **FP_837:** *P. chrysogenum* F.00837, **FP_853:** *P. chrysogenum* F.00853, **FP_680:** *P. chrysogenum* F.00680^T, **FP_913:** *P. granulatum* F.00913, Az előkezelések 30 °C-on, pH=5 értéken, 7 napon át tartottak. A nedvesítési arány 7:1, a bevitt konídium szám 10⁷ konídium/g sz. búzakorpa volt.

A *Penicillium* törzsek alkalmazásával láthatóan nagyobb a kioldott, valamint a részben hidrolizált szénhidrátok mennyisége, ami az *Aspergillus* törzseknél is hatásosabb lignocellulóz bontó aktivitásra utal. A vizsgált törzsek között a *P. chrysogenum* F.00834 (FP_834) és az F.00837 (FP_837) törzsnél az extrakciót követően a maximális szénhidrát koncentráció meghaladta a 125 mg/g értéket (135 mg/g és 126 mg/g), ezáltal az elméleti szénhidrát hozamnak 16-17 %-át sikerült oldatba vinni. Ennél kedvezőbb szerkezet bontást mutatott a *P. chrysogenum* F.00680^T (FP_680), a *P. expansum* F.00811 (FP_811) és a *P. granulatum* F.00913 (FP_913), ahol az oldott szénhidrát koncentráció 160-167 mg/g között volt. A biokonverzió hatékonysága ekkor elérte a 20 %-ot. A *P. chrysogenum* F.00814 (FP_814) törzssel történő előkezeléssel a kioldott szénhidrátok mennyisége már közel 200

mg/g (elméleti hozam 24 %-a) volt. E törzs esetén a diszacharid koncentráció (89 mg/g) a *P. chrysogenum* F.00680^T (FP_680) törzsnél mért értékekkel közel azonos volt, azonban a glükózé (38 mg/g) már annál kisebb értéket mutatott.

Trichoderma, *Mucor* és *Rhizopus* nemzetség

A lágykorhadást okozó gombák között 5 *Trichoderma*, valamint 1 *Mucor* és 3 *Rhizopus* nemzetséghez tartozó törzs biodegradációs képességét vizsgáltam az előzőekkel azonos környezeti paraméterek mellett. A *Trichoderma* törzsek esetén az 5. napon, a többi lágykorhadást okozó gombánál pedig a 7. napon állítottam le az előkezelést. Az elért eredményeket a **12. ábra** szemlélteti.



12. ábra: Az oldott szénhidrátartalom alakulása a *Mucor*, *Rhizopus* és *Trichoderma* törzsekkel történő előkezelés során

Jelmagyarázat: **FM_784:** *Mucor* sp. F.00784, **FR_617:** *R. oryzae* F.00617, **FR_861:** *R. oryzae* F.00861, **FR_654:** *R. stolonifer* F.00654, **FT_791:** *T. koningii* F.00791, **FT_961:** *T. koningii* F.00961, **FT_651:** *T. reesei* F.00651, **FT_795:** *T. viride* F.00795, **FT_965:** *T. viride* F.00965

Az előkezelések 30 °C-on, pH=5 értéken, 7 napon át tartottak. A nedvesítési arány 7:1, a bevitt konídium szám 10^7 konídium/g sz. búzakorpa volt.

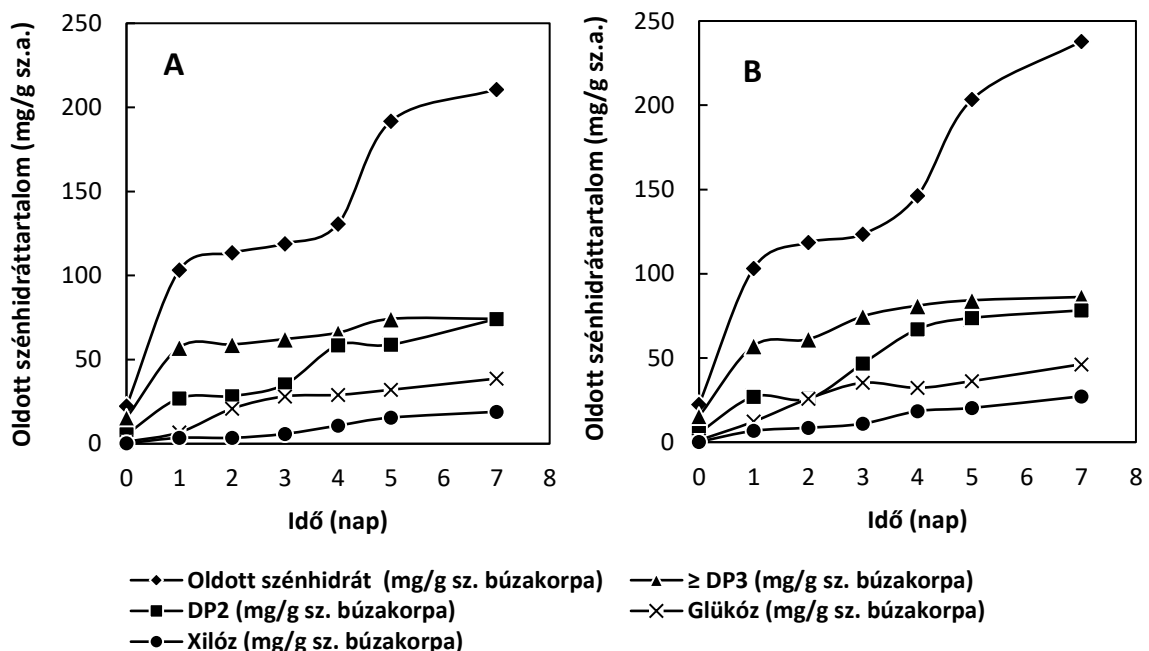
A *Trichoderma* nemzetség képviselőinek cellulóz bontó képessége ipari szinten kiemelt, mivel e biopolimer bontásához nélkülözhetetlen enzimekkel rendelkeznek. A nemzetségben belül a *T. reesei* mellett a *T. viride*, és a *T. koningii* faj általam vizsgált törzsei a búzakorpa mikrobiális bontása során, mind az oldatba vitt szénhidrátok mennyiségét, mind az egyes szénhidrát frakciók eloszlását illetően, eltéréseket mutatottak. Megállapítható, hogy a *T. reesei* F.00651 (FT_651) törzs teljesítménye az adott szelektálási körülmények között

az ipari méretekben alkalmazott celluláz-termelő törzsekénél kisebb lett. Az oldott szénhidráttartalom ekkor 70 mg/g volt, amelyen belül a diszacharidok mennyisége 28 mg/g, a glükózé pedig csupán 11 mg/g volt. Ezzel szemben, a másik ipari szinten kiemelt *T. viride* faj két törzse, az F.00795 (FT_795) és az F_00965 (FT_965) esetén a szerkezet feltárás hatékonysága a *P. chrysogenum* F.00834 (FP_834) és az F.00837 (FP_837) törzsénél leírtakkal hasonlóan alakult. E két törzzsel a szénhidrát hozam elérte a 138 mg/g és 133 mg/g értékeket, amelyeken belül a diszacharidok mennyisége 53 mg/g és 71 mg/g, a glükózé pedig 37 mg/g és 44 mg/g volt. A *T. koningii* F.00791 (FT_791) és F.00961 (FT_961) törzseknél a vártnál kisebb biodegradációs hatékonyságot tapasztaltam, hiszen az előző *T. viride* törzsekével szemben a szénhidrát hozam csupán felét (45 mg/g és 55 mg/g) érte el.

A *Rhizopus* törzseknél és a *Mucor* törzsnél a búzakorpa feltárása lényegesen lassabban történt, ugyanis az adott kísérleti körülmények mellett az oldott szénhidrátok mennyisége csak a 7. napon érte el a maximális értéket. A legjobb szénhidrát kihozataalt (101 mg/g) az *R. stolonifer* F.00654 (FR_654) törzzsel értem el. A szénhidrátok mintegy 64 %-át az oligomerek tették ki, a diszacharidok és a glükóz mennyisége 20 mg/g alatti szinten maradt.

Phanerochaete nemzetség

A fehérkorhadást okozó *Phanerochaete chrysosporium* gombafaj két törzsének alkalmazásával az elért szénhidrát koncentrációkat a **13. ábra** szemlélteti.



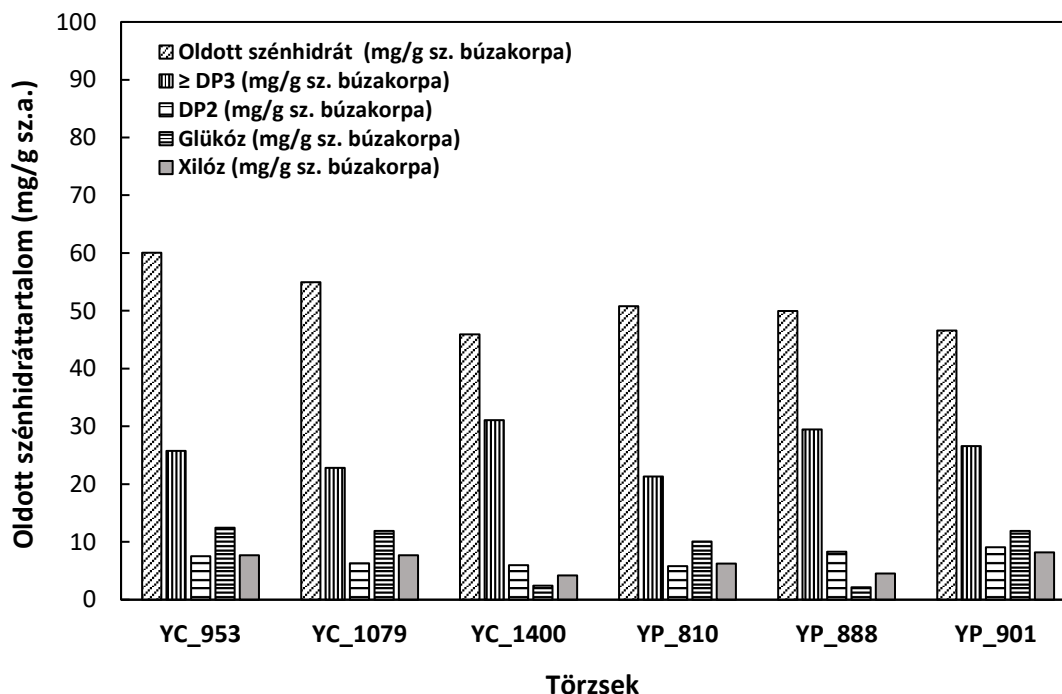
13. ábra: Az oldott szénhidráttartalom alakulása a *Phanerochaete chrysosporium* F.00740 (A) és az F.00771 (B) törzsekkel történő búzakorpa előkezelése során

Az előkezelések 30 °C-on, pH=5 értéken, 7 napon át tartottak. A nedvesítési arány 7:1, a bevitt konídium szám 10^7 konídium/g sz. búzakorpa volt.

Megfigyelhető, hogy e gombafaj két törzsénél a búzakorpa előkezelésének szénhidrát profiljai hasonlóan alakultak. Mindkét esetben a felszabadított szénhidrátok mennyisége a 4. naptól mutatott nagyobb növekedést. A maximális szénhidrát koncentráció a 7. napon elérte a 211 mg/g (13A. ábra) és a 238 mg/g (13B. ábra) értéket, ami az elméleti hozam 25 %-ának és 28 %-ának felel meg. SARI és munkatársai (2011) is részbeni szénhidrát hidrolízist írtak le e gombafaj törzseinél. Kutatásaikban a szénhidráttartalom gyorsabb növekedését azzal magyarázták, hogy az aromás lignin oxidatív úton történő kellő elemészése a cellulóz bontó oxidatív enzimek aktivitását is fokozta. A szénhidrátok összetételét nézve, megállapítható, hogy az oxidatív enzimek aktivitása gyengébb volt az előző törzsek hidrolitikus aktivitásánál. A diszacharidok mennyisége 74-78 mg/g, a glükóz mennyisége pedig 39-46 mg/g között alakult. A xilóz mennyisége 29-27 mg/g volt, ami azonban mintegy háromszor nagyobb, mint amit az előzőekben vizsgált törzsek (10 mg/g alatti xilóz koncentráció) esetében mértem.

Élesztőgomba törzsek

A továbbiakban 3 *Candida* és 3 *Pichia* törzs lignocellulóz bontó tulajdonságát vizsgáltam. Az elért eredményeket a **14. ábra** szemlélteti.



14. ábra: Az oldott szénhidráttartalom alakulása a *Candida* és *Pichia* törzsekkel történő búzakorpa előkezelése során

Jelmagyarázat: YC_953: *C. tenuis* Y.00953^T, YC_1079: *C. tenuis* Y.01079^T,

YC_1400: *C. shehatae* var. *shehatae* Y.01400^T, YP_810: *P. stipitis* Y.00810,

YP_888: *P. stipitis* Y.00888, YP_901: *P. stipitis* Y.00901

Az előkezelések 30 °C-on, pH=5 értéken, 7 napon át tartottak. A nedvesítési arány 7:1, a bevitt konídium szám 10⁷ konídium/g sz. búzakorpa volt.

A növényi maradványok mikrobiális úton történő lebontása terén csekély mennyiségű információ található az élesztőgombák tevékenységeiről. A *Candida* és *Pichia* nemzetség képviselői általában a komposztálás első, mezofil szakaszában izolálhatóak, ahol a könnyen lebomló szerves anyagok feltáródása veszi kezdetét. VILLAS-BÔAS és munkatársai (2002) almahéjon mutatták ki a *Candida utilis* CCT 3469 élesztő celluláz, valamint xilanáz aktivitását 80 %-os nedvességtartalom mellett, 6 napon át vezetett enzimfermentációt követően. A kísérletükben a cellulóz tartalom 7,8 %-át sikerült kioldani. Az általam vizsgált törzsek esetén megállapítható, hogy azok mindegyike megtámadta a búzakorpa szerkezetét, azonban bontási aktivitásuk igen alacsony volt. A *C. tenuis* Y.00953 (YC_953) és a Y.01079 (YC_1079) törzs alkalmazásával az oldatba vitt szénhidrátok mennyisége 55-60 mg/g között alakult, a *C. shehatae* var. *shehatae* Y.01400 (YC_1400) törzsnél azonban ez az érték nem érte el az 50 mg/g-ot. Az elméleti szénhidrát hozam csupán 6-7 % volt. A diszacharidok mennyisége közel 6-8 mg/g volt, míg a glükóz koncentráció, a *C. shehatae* var. *shehatae* Y.01400 (YC_1400) kivételével (2-3 mg/g), elérte a 12 mg/g körüli értéket.

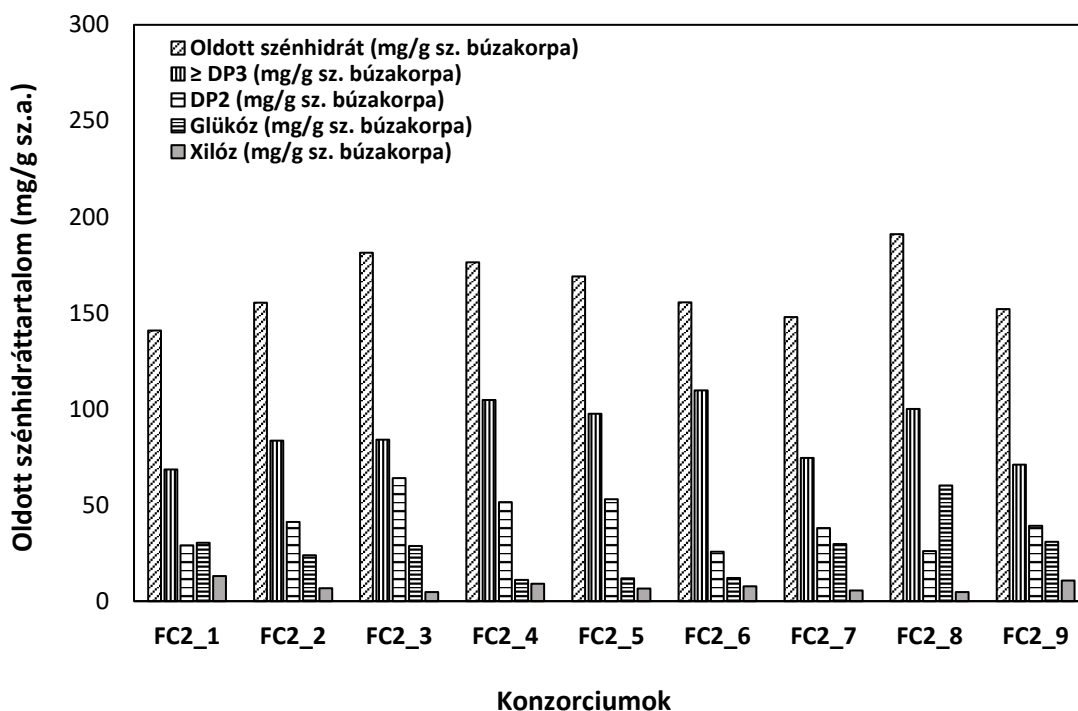
A *Candida* törzsekkel szemben a *Pichia* törzseknél kisebb biodegradációs teljesítményt tapasztaltam. Az előkezelést követően a kioldott szénhidrát tartalom 50 mg/g alatt volt. A *P. stipitis* Y.00901 (YP_901) törzsnél a felszabadított diszacharidok, valamint a glükóz mennyisége azonban közelítette a *C. tenuis* törzseknél leírtakat. Ez talán a törzs β -glükokozidáz aktivitásának köszönhető, hiszen e feltételezést SPAGNA és munkatársai (2002) a szicíliai mustokból és borokból izolált *P. anomala* törzs, valamint TURAN és munkatársai (2005) a *P. pastoris* X-33 törzs vizsgálatával is megerősítették. Emellett, mindkét törzsnél az enzim meglepően nagy glükóz toleranciát mutatott. A *P. stipitis* Y.00901 (YP_901) törzs az összetett szénhidrátokat lassan bontotta, azonban a glükóz, valamint a xilóz koncentráció láthatóan a *C. tenuis* törzsekénél mért értékkel azonosan alakultak.

Ezen élesztőtörzsek a korhadást okozó gombáknál lényegesen alacsonyabb szénhidrát konverziót (elméleti hozam 5-7 %-a) eredményeztek, az összetett növényi váz lebontásához nem alkalmasak, így a további kísérleteimben ezeket nem alkalmaztam.

4.1.1.2 Biológiai konzorciumok kialakítása és tesztelése

Az előzőekben ismertett szelektálási kísérleteknél 6 korhadást okozó gomba törzs, az *A. brasiliensis* F.00892, az *A. niger* F.00632, az *A. wentii* F.00167, a *P. chysogenum* F.00814, a *P. granulatum* F.00913 és a *T. viride* F.00795 törzs alkalmazásával értem el biztató szénhidrát felszabadítást, így a továbbiakban e törzsek biológiai hatását kettő és három törzs társításával kialakított konzorciumokban vizsgáltam. A **15. ábra** a gomba

törzsek által alkotott, 9 különböző, kéttagú konzorciummal történő előkezelés eredményeit szemlélteti.



15. ábra: A 9 különböző, kéttagú fonalas gomba konzorcium által oldatba vitt maximális szénhidrát mennyiségek az előkezelés során

Jelmagyarázat: **FC2_1:** *A. niger* F.00632 és *P. granulatum* F.00913, **FC2_2:** *A. niger* F.00632 és *P. chrysogenum* F.00814, **FC2_3:** *A. niger* F.00632 és *T. viride* F.00795, **FC2_4:** *A. wentii* F.00167 és *P. granulatum* F.00913, **FC2_5:** *A. wentii* F.00167 és *P. chrysogenum* F.00814, **FC2_6:** *A. wentii* F.00167 és *T. viride* F.00795, **FC2_7:** *A. brasiliensis* F.00892 és *P. granulatum* F.00913, **FC2_8:** *A. brasiliensis* F.00892 és *P. chrysogenum* F.00814, **FC2_9:** *A. brasiliensis* F.00892 és *T. viride* F.00795

Az előkezelések 30 °C-on, pH=5 értéken, 7 napon át tartottak. A nedvesítési arány 7:1, a bevitt konídium szám 10^7 - 10^7 konídium/g sz. búzakorpa volt.

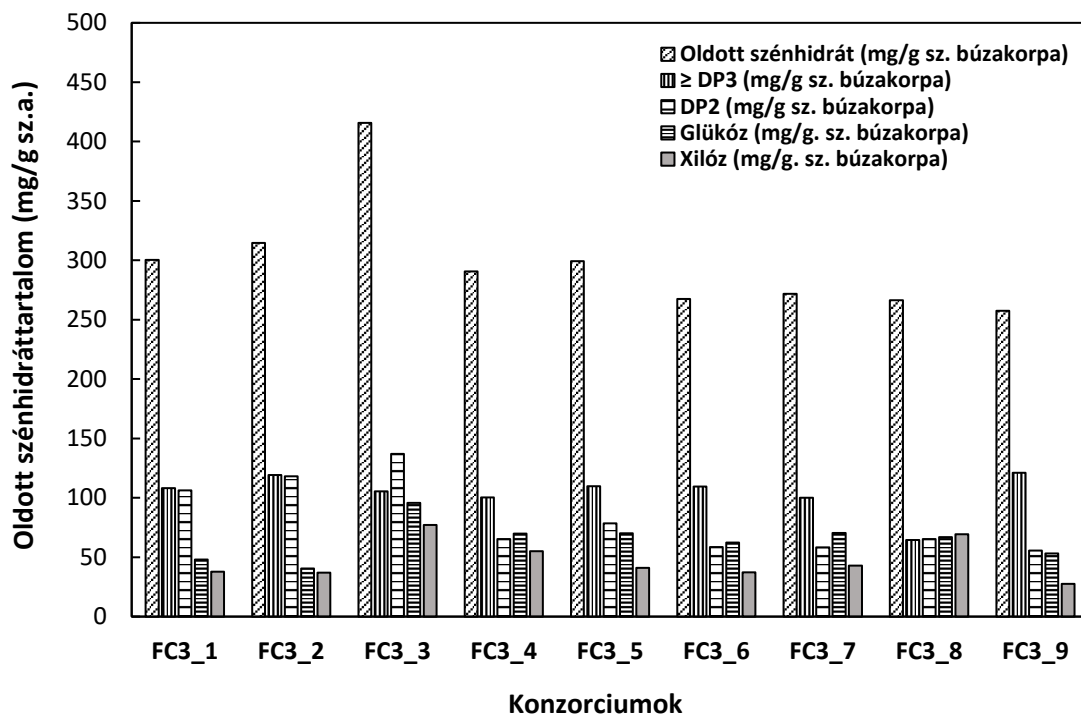
Ezekkel a társításokkal végzett konverziós kísérletek során az egyes szénhidrát frakciók eltérő eloszlást mutattak, ami a törzsek enzimekészléteiben, valamint a közöttük lévő kölcsönhatások különbözőségéből ered. MAHESHWARI és munkatársai (1994) ehhez hasonló megállapításokat tettek, amikor az *A. niger* és a *T. reesei* társításával hatékonyabb cellulóz bontást értek el, mint az egyedi törzsek alkalmazása mellett. Kutatásaikban az *A. niger* nagyobb β -glükozidáz aktivitása lényegesen növelte a *T. reesei* által oldatba vitt, részben hidrolizált cukrok monomerekké történő bontását és annak sebességét. Ezt az előkezelési kísérleteim során elért szénhidrát konverzió értékek részben igazolták, ugyanis a kéttagú társítások között az *A. niger* F.00632 és a *T. viride* F.00795 (FC2_3) törzs szinergens kölcsönhatásának köszönhetően az előkezelés időtartama csökkent. Az oldott szénhidrátok maximális mennyiségét (181 mg/g) a 3. napon mértem. A redukáló cukortartalom pedig mintegy 95 mg/g volt. Hasonló eredményt értem el az *A. wentii* F.00167 és a *P. granulatum*

F.00913 (FC2_4) törzs társításával (177 mg/g), azonban a diszacharidok (52 mg/g) és a glükóz (11 mg/g) mennyisége határozottan kisebb volt. A többi társításnál az oldott szénhidrát tartalom egyaránt elérte, és néhány esetben meghaladta a 145 mg/g értéket.

Az előkezelések során kedvezőbb szerkezet bontást az *A. brasiliensis* F.00892 és a *P. chrysogenum* F.00814 (FC2_8) törzs kombinálásával tapasztaltam, ugyanis az oldott szénhidrát koncentráció elérte a 191 mg/g értéket. E társításnál a diszacharidok mennyisége (26 mg/g) kétszer kevesebb, a glükóz mennyisége (60,2 mg/g) pedig közel kétszer több volt az előző esetben kapott eredménynél, ami kiemelkedően nagy volt a többi társításnál mért értékekhez képest. Ennek az lehet a magyarázata, hogy e két törzs enzimei nagyobb aktivitást mutattak vagy jobb toleranciát mutattak a szénhidrát hidrolízis termékeivel (cellobióz, glükóz) szemben, ami a dimerek ilyen mértékű csökkenését eredményezte. HU és munkatársai (2011) rázatott lombikos fermentációval vizsgálták az *Aspergillus*, a *Penicillium*, a *Trichoderma* és más korhadást okozó gombák törzseinek, valamint azok társításainak az enzimtermelését. Az enzimfermentációt 1 % (m/v) búzakorpát tartalmazó minimál tápközegben, 30 °C-on, közel semleges pH értéken vezették. Kísérleteikben az *A. niger* N402 és a *P. chrysosporium* RP78 törzs társításával, a monokultúráikkal szemben, mind a β -glükozidáz és a cellobiohidroláz, valamint a β -xilozidáz aktivitást is sikerült fokozni. A kísérleteimnél az is megfigyelhető továbbá, hogy az oldatba vitt xilóz mennyisége sem a 3. napon, sem az előkezelések végén (14. nap) nem mutatott jelentős növekedést, ami az *A. niger* F.00632 és *P. granulatum* F.00913 (FC2_1) törzs társításánál mért érték kivételével (13 mg/g) 10 mg/g alatt volt.

A konzorciumok további bővítésével az értékes szénhidrátok kinyerése biztatóan alakult (**16. ábra**). A kialakított 9 különböző, háromtagú konzorcium közül az *A. wentii* F.00167, a *P. chrysogenum* F.00814 és a *T. viride* F.00795 törzs (FC3_6), az *A. brasiliensis* F.00892, a *P. granulatum* F.00913 és a *P. chrysogenum* F.00814 törzs (FC3_7), az *A. brasiliensis* F.00892, a *P. granulatum* F.00913 és a *T. viride* F.00795 (FC3_8), valamint az *A. brasiliensis* F.00892, a *P. chrysogenum* F.00814 és a *T. viride* F.00795 törzs (FC3_9) társításával az oldott szénhidrátok mennyisége, a monokultúrákkal végzett előkezelésekhez képest, 60-70 mg/g növekedést mutatott. Az elméleti szénhidrát hozam már 31-33 % között alakult. Ennél is kedvezőbb szénhidrát oldatba vitel biztosítható az *A. niger* F.00632, a *P. granulatum* F.00913 és a *P. chrysogenum* F.00814 (FC3_1), az *A. niger* F.00632, a *P. granulatum* F.00913 és a *T. viride* F.00795 (FC3_2), az *A. wentii* F.00167, *P. granulatum* F.00913 és *P. chrysogenum* F.00814 (FC3_4) illetve az *A. wentii* F.00167, *P. granulatum* F.00913 és *T. viride* F.00795 törzs (FC3_5) alkotta konzorciumok alkalmazásával. Ezekben

az esetekben az oldott szénhidrát koncentráció maximális értéke 100-117 mg/g növekedést mutatott, a biokonverzió hatékonysága pedig elérte a 35-38 %-ot.



16. ábra: A háromtagú fonalas gomba konzorciumok által oldatba vitt maximális szénhidrát mennyiség az előkezelés során

Jelmagyarázat: **FC3_1:** *A. niger* F.00632, *P. granulatum* F.00913 és *P. chrysogenum* F.00814; **FC3_2:** *A. niger* F.00632, *P. granulatum* F.00913 és *T. viride* F.00795; **FC3_3:** *A. niger* F.00632, *P. chrysogenum* F.00814 és *T. viride* F.00795; **FC3_4:** *A. wentii* F.00167, *P. granulatum* F.00913 és *P. chrysogenum* F.00814; **FC3_5:** *A. wentii* F.00167, *P. granulatum* F.00913 és *T. viride* F.00795; **FC3_6:** *A. wentii* F.00167, *P. chrysogenum* F.00814 és *T. viride* F.00795; **FC3_7:** *A. brasiliensis* F.00892, *P. granulatum* F.00913 és *P. chrysogenum* F.00814; **FC3_8:** *A. brasiliensis* F.00892, *P. granulatum* F.00913 és *T. viride* F.00795; **FC3_9:** *A. brasiliensis* F.00892, *P. chrysogenum* F.00814 és *T. viride* F.00795
Az előkezelések 30°C-on, pH=5 értéken, 7 napon át tartottak. A nedvesítési arány 7:1, a bevitt konídium szám 10^7 - 10^7 - 10^7 konídium/g sz. búzakorpa volt.

A konzorciumok között kiemelkedően nagy oldott szénhidrátartalmat (416 mg/g) mértem a 3. napon az *A. niger* F.00632, a *P. chrysogenum* F.00814 és a *T. viride* F.00795 törzs társításával (FC3_3). A konzorciumot azon törzsek alkották, amelyek az előző kísérletekben, mind tisztán, egy gomba törzssel, mind a kéttagú konzorciumokkal történő előkezeléseknél is kedvező szerkezet lebontást és szénhidrát konverziót értek el. A mikrobiális előkezelés során a szénhidrát hozam elérte az 50 %-ot. A konzorcium alkalmazása mellett a diszacharidok (137 mg/g) és glükóz (96 mg/g) mennyisége jelentős növekedést mutatott.

Továbbá, azt is tapasztaltam, hogy a *T. viride* F.00795 más β -glükozidáz termelő *Aspergillus* és *Penicillium* törzsekkel történő alkalmazásával a szénhidrátok kioldása és részbeni hidrolízise nem minden esetben mutatott ilyen mértékű növekedést. Ez szintén az

adott törzsek enzimek készletének eltérésére, az enzimek kisebb aktivitására, esetleg hiányára utalhat. A xilóz tartalom is eltérően alakult. Az utóbbi, kiemelt konzorcium esetén a xilóz elérte a 77 mg/g értéket.

A biodegradációs modell kísérleteim hatékonyságának növeléséhez a továbbiakban a szénhidrát konverzió szerint kiválasztott *P. chrysogenum* F.00814, *A. niger* F.00632, valamint *T. viride* F.00795 törzs alkotta konzorciumot (FC3_3) alkalmaztam.

4.1.2 A gomba konzorcium teljesítményének optimalizálása

E kísérlet sorozatban az előkezelés néhány kritikus paraméterének, ezek között a konzorcium százalékos összetételének, a kémhatásnak, a szabad nedvességtartalomnak, valamint a beoltási technikáknak a hatását vizsgáltam.

4.1.2.1 A fonalas gomba törzsek arányainak meghatározása

A búzakorpa szubsztrátum mikrobiális szénhidrát kinyerésének növelése, illetve a konzorciumban (FC3_3) résztvevő törzsek közötti kapcsolatok jobb megismerése miatt elsőként a törzsek konídium eloszlásának hatását néztem. A kísérleteknél az *A. niger* F.00632 törzs bevitt konídium számát, a másik két törzs konídium számának csökkentésével, fokozatosan növeltem. A törzsek konídium eloszlásait, valamint az előkezelés során oldatba vitt szénhidrát frakciók mennyiségeit a **10. táblázat** tartalmazza.

10. táblázat: Az oldott szénhidráttartalom alakulása a törzsek különböző beoltási konídium arányai mellett az előkezelést követően

Minta	Indulási konídium szám (konídium/g sz. búzakorpa)			Oldott szénhidrát tartalom (mg/g sz. búzakorpa)				
	<i>A.niger</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>T. viride</i>	≥ DP3	DP2	Glükóz	Xilóz	Σ
Kk1	4*10 ⁶	3,5*10 ⁶	2,5*10 ⁶	162	52	56	44	314
Kk2	4,5*10 ⁶	3,5*10 ⁶	2*10 ⁶	174	62	54	55	345
Kk3	5*10 ⁶	3*10 ⁶	2*10 ⁶	188	64	53	63	368
Kk4	6*10 ⁶	2,5*10 ⁶	1,5*10 ⁶	232	62	61	64	419
Kk5	7*10 ⁶	1,5*10 ⁶	1,5*10 ⁶	202	47	54	22	325
Kk6	8*10 ⁶	1*10 ⁶	1*10 ⁶	155	41	58	21	275
Kk7	9 *10 ⁶	5*10 ⁵	5*10 ⁵	166	15	50	23	254

Az előkezelések 30 °C-on, pH=5 értéken, 3 napon át tartottak. A nedvesítési arány 7:1 volt. A bevitt konídium 10⁷ konídium/g sz. búzakorpa volt.

Megállapítható, hogy azon esetről, ahol a beoltási konídium szuszpenzióban az *A. niger* F.00632 törzs konídiumainak aránya elérte a 60 %-ot és mellette a *P. chrysogenum* F.00814 törzs 25 %-ban, a *T. viride* F.00795 törzs pedig 15 %-ban volt (Kk4), ott az oldott szénhidráttartalom a 3. napon 419 mg/g értéket mutatott. Ez ahhoz hasonló, mint amit az előző kísérletnél a törzseket azonos arányban tartalmazó konídium szuszpenzióval történő előkezelés eredményezett (16. ábra). Azonban e szénhidrát kinyerést törzsenként kevesebb

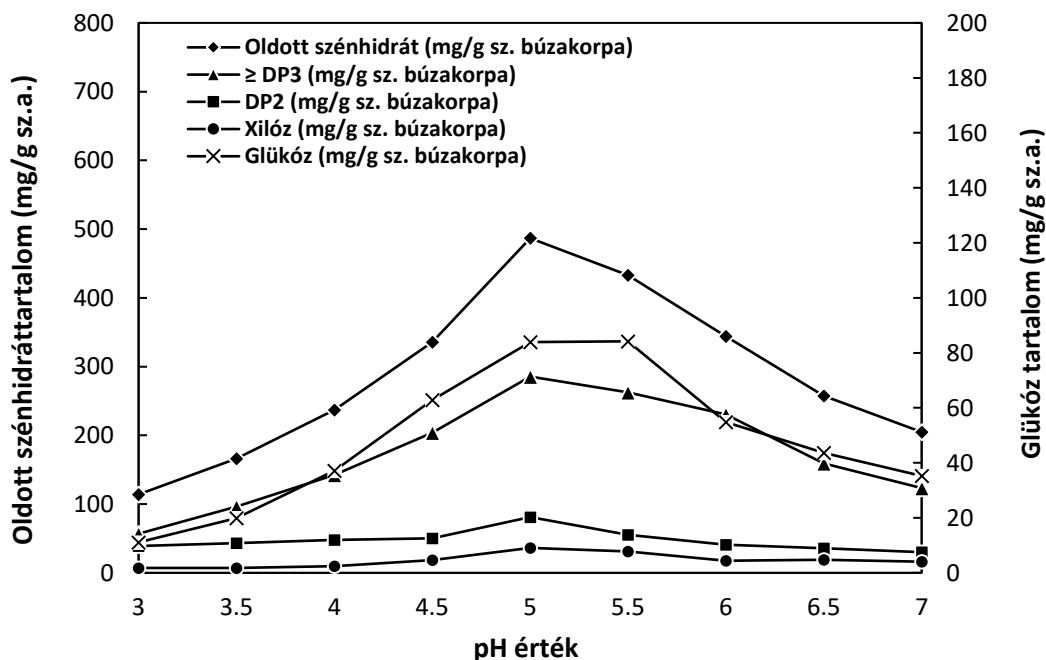
bevitt konídiummal értem el, a konídium szuszpenzió háromszor kevesebb konídiumot (összesen 10^7 konídium/g sz.a) tartalmazott.

Továbbá az is megfigyelhető, hogy az eltérő konídium arányok lényegi hatást fejtettek ki az egyes szénhidrát frakciók minőségi és mennyiségi alakulására. A Kk4 mintánál a diszacharidok és a glükóz közel hasonló, de az előzőeknél kisebb mennyiségben (61-62 mg/g) voltak. Az *A. niger* F.00632 törzs konídium számának további növelésével (Kk5, Kk6, Kk7) a diszacharidok és a glükóz mennyisége 60 mg/g alá csökkent, a Kk7 konzorcium esetén pedig csupán 15 mg/g diszacharidot, valamint 50 mg/g glükózt mértem. E törzs konídium számának csökkentése (Kk3, Kk3, Kk1) szintén kedvezőtlen biokonverziót eredményezett. Az oldott szénhidrát mennyiség közel 315 mg/g értékre csökkent.

A xilóz tartalom is eltéréseket mutatott. A Kk4 esetében a xilóz maximális mennyisége elérte a 64 mg/g értéket, amivel szemben ez 21-23 mg/g értékre csökkent a Kk5, a Kk6 és a Kk7 mintáknál.

4.1.2.2 A pH hatása

A korhadást okozó gombák szaporodásának és növekedésének, valamint az enzimek szintézisének az enyhén savas, valamint a semlegeshez közeli környezet (pH=5,5-7,5) kedvez. A munkámban ezért a konzorciális szénhidrát lebontást pH=3-7 között vizsgáltam. Az elért eredményeket az **17. ábra** szemlélteti.



17. ábra: Az oldatba vitt szénhidrát tartalom alakulása eltérő pH értéken történő előkezelések során

Az előkezelés 30 °C-on, 7:1 arányú nedvesítés mellett, 3 napon át tartott.

A bevitt konídium szám 10^7 konídium/g sz. búzakorpa, ahol az *A. niger* F.00632, a *P. chrysogenum* F.00814 és a *T. viride* F.00795 törzs eloszlása 60:25:15 százalék volt.

Megállapítottam, hogy a búzakorpából kinyerhető szénhidrátok mennyisége pH=5-nél kisebb vagy annál nagyobb értéken további növekedést nem mutatott. A maximális szénhidrát kihozatal pH=5 értéken érhető el. A konzorcium - biológiai rendszer lévén - a környezet savanyításával (\leq pH=4,5), valamint a lúgosításával (\geq pH=5,5) közel 114 mg/g és 205 mg/g értékre csökkent. A diszacharidok mennyisége a két szélsőértéken 30 mg/g és 43 mg/g, a glükózé pedig 11 mg/g és 35 mg/g volt. A xilóz mennyisége csupán 7-16 mg/g volt. HOSSAIN és munkatársai (2018) a mikrobiális konzorciumokkal bizonyították, hogy a pH változtatása hatással van a konzorcium által végzett degradációs folyamatokra. Az eltérő pH érték más anyagcsere útvonalakat aktiválhat, ezáltal az különböző enzimek szintézisét segítheti elő.

4.1.2.3 Búzakorpa nedvesítési aránya

A nedvességtartalom hatását a szerkezet feltáródására nézve a konzorciumnál eltérő búzakorpa/citrát foszfát puffer arányok mellett vizsgáltam. Az előkezelések során oldatba vitt szénhidrát koncentrációkat a **11. táblázat** szemlélteti.

11. táblázat: Az oldatba vitt szénhidrát tartalom alakulása a búzakorpa eltérő szabad nedvességtartalma mellett történő előkezelések során

<i>Minta</i>	<i>Nedvesítési arány</i> puffer (ml): búzakorpa (g)	<i>Oldott szénhidrát tartalom</i> (mg/g sz. búzakorpa)				
		\geq DP3	DP2	Glükóz	Xilóz	Σ
<i>Kn1</i>	7:1	233	62	61	64	420
<i>Kn2</i>	6:1	276	51	56	46	429
<i>Kn3</i>	5:1	288	71	88	72	519
<i>Kn4</i>	4:1	243	57	43	37	380

Az előkezelés 30 °C-on, pH=5 értéken, 3 napon át tartott. A bevitt konídium szám 10^7 konídium/g sz. búzakorpa, ahol az *A. niger* F.00632, a *P. chrysogenum* F.00814 és a *T. viride* F.00795 törzs eloszlása 60:25:15 százalék volt.

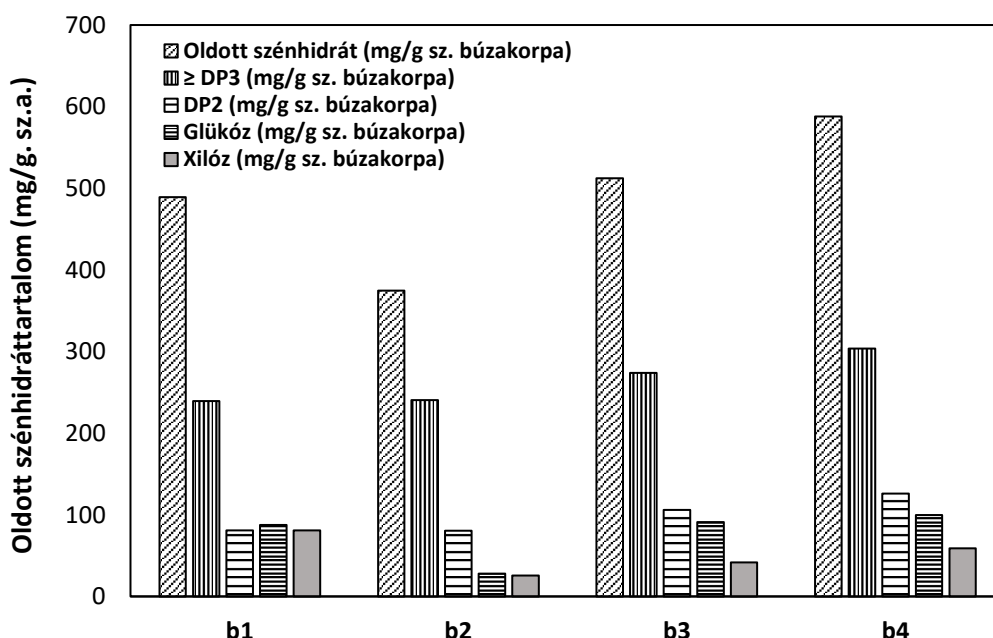
Megállapítottam, hogy az előző kísérleteknél alkalmazott szubsztrátum nedvesítési arány (7:1) bizonyos mértékű csökkentésével a szénhidrát kihozatal növelhető. A 6:1 aránynál a kioldott szénhidrát koncentráció 430 mg/g (Kn2) volt, amivel szemben az 5:1 aránynál már ennél is kedvezőbb, 520 mg/g (Kn3) szénhidrát koncentrációt mértem. Ez utóbbi előkezeléssel az elméleti szénhidrát hozam elérte a 63 %-ot. A diszacharidok és a xilóz maximális értéke 72 mg/g, a glükózé pedig 88 mg/g volt. NCUBE és munkatársai (2015) a sörtörkölyt az *A. niger* FGSC A733 törzssel, SARTORI és munkatársai (2015) a kukoricaszárat izolált *T. viride* törzssel, ERTAN és munkatársai (2014) pedig a búzakorpát levegőből izolált *P. chrysogenum* törzssel kezelték. Egybehangzó megállapítást tettek, hogy

az 5:1, valamint a 6:1 arányú szubsztrátum nedvesítéssel hatásosabbá tehető a szénhidrát konverzió.

A szabad víztartalom további csökkentése (4:1) a konzorcium gyenge növekedését okozta, ami a kisebb szénhidrát hozamokban is tükröződött. Az oldatba vitt szénhidrátok mennyisége 380 mg/g értékre csökkent (Kn4). A monomereknél is kisebb mennyiségeket mértem, a glükóz 42 mg/g, a xilóz pedig 37 mg/g értékre csökkent.

4.1.2.4 Különböző beoltási technikák hatása

A munkámban 4 különböző, időben eltolt és arányaiban is eltérő konídium beoltási technika hatását néztem. Az előkezelést követően mért szénhidrát koncentrációkat a **18. ábra** szemlélteti.



18. ábra: Az oldatba vitt szénhidrát tartalom alakulása különböző beoltási technikák alkalmazása esetén

Jelmagyarázat: a konzorcium az előkezelés indításakor került leoltásra (**b1**); a konídium szuszpenzió 1/2 része az előkezelés kezdetén, a visszamaradó 1/2 rész az előkezelés 24. órájában került leoltásra (**b2**); a konídium szuszpenzió 1/4 része az előkezelés kezdetén, a visszamaradó 3/4 rész az előkezelés 24. órájában került leoltásra (**b3**); a konídium szuszpenzió 3/4 része az előkezelés kezdetén, a visszamaradó 1/4 rész az előkezelés 24. órájában került leoltásra (**b4**)

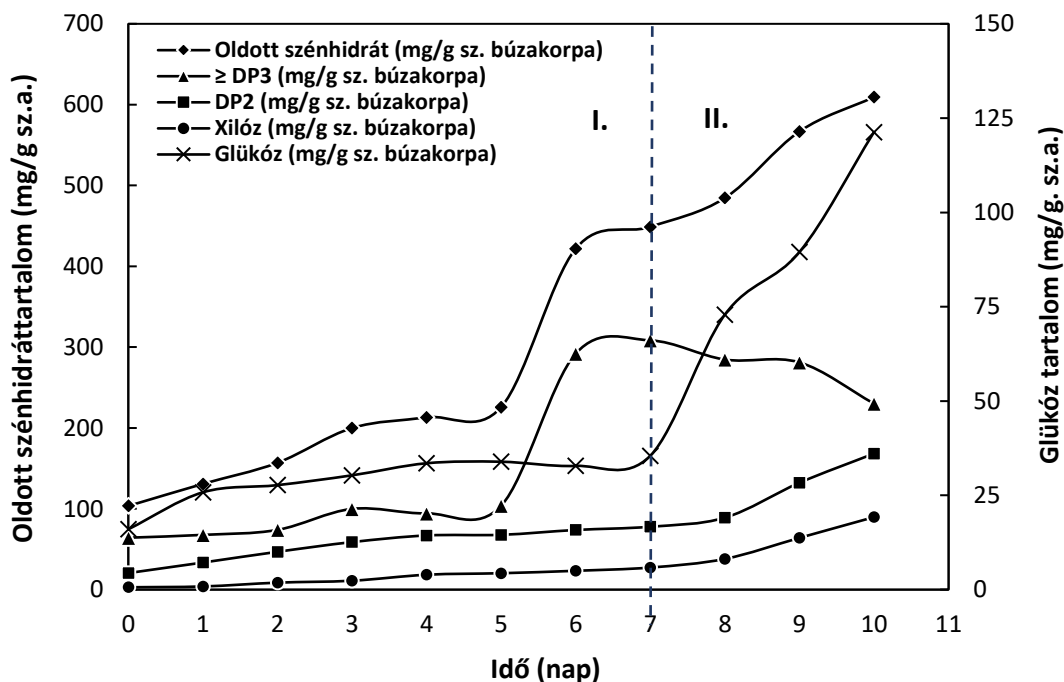
Az előkezelés 30 °C-on, pH=5 értéken, 5:1 nedvesítési arány mellett, 3 napon át tartott. A bevitt konídium szám 10^7 konídium/g sz. búzakorpa, ahol az *A. niger* F.00632, a *P. chrysogenum* F.00814 és a *T. viride* F.00795 törzs eloszlása 60:25:15 százalék volt.

Megállapítható, hogy a vizsgált technikák eltérően hatottak a szénhidrát hozamok alakulására. Az előkezelést követően egy esetben, a b4 technika alkalmazásával tudtam elérni 588 mg/g oldott szénhidrát mennyiséget. A biodegradáció hatékonysága ezáltal az elméleti hozam 67 %-a lett. A diszacharidok mennyisége 126 mg/g, a glükózé pedig 100

mg/g értéken érte el a maximumot. Ez azzal magyarázható, hogy a konídium szuszpenzió első körben történő beoltásával (3/4 rész) az elszaporodó micéliumok a növényi szerkezetet részben bontották, ezáltal (24. órát követően) a szénhidrátok nagyobb része vált elérhetővé. Az ismételt konídium rátáplálás (1/4 rész) hatását a keletkező egyszerű cukrok szintén erősítették. Ezzel szemben, a konídium szuszpenzió azonos arányú beoltását alkalmazva az előkezelés kezdetén, illetve a 24. órában (b2), az elért oldott szénhidrát (115 mg/g) tartalom a kontroll kísérlet (b1) eredményénél is kisebb volt. A glükóz mennyisége csupán 28 mg/g volt, a xilóz mennyisége viszont közel hasonló (59 mg/g) értéken maradt.

4.1.2.5 Kétlépéses biológiai előkezelés

A biodegradációs modell kísérleteimben kombinált, kétlépéses biológiai előkezelést alkalmaztam. Az előkezelés profilját a **19. ábra** szemlélteti.



19. ábra: A kétlépéses biológiai előkezelés során az oldatba vitt szénhidrátok mennyiségi alakulása

Az előkezelés első szakasza a *P. chrysosporium* F.00770 gomba törzsével 30°C-on, pH=5 értéken, 7:1 nedvesítési arány mellett, 7 napon át tartott. A bevitt konídium szám 10^7 konídium/g sz. búzakorpa volt. Az előkezelés második szakasza a mezofil gomba konzorciummal 30 °C-on, pH=5 értéken, 5:1 nedvesítési arány mellett, 3 napon át tartott. A bevitt konídium szám 10^7 konídium/g sz. búzakorpa, az *A. niger* F.00632, a *P. chrysogenum* F.00814 és a *T. viride* F.00795 törzs eloszlása 60:25:15 százalék volt.

E módon történő előkezeléssel a búzakorpa szerkezetét elsőként a *Phanerochaete chrysosporium* F.00770 törzs lazította, amit követően a nagyobb hidrolitikus aktivitású mezofil gomba konzorcium hatásosabb szénhidrát degradációt eredményezett. Az előkezelést követően a maximálisan oldotba vitt szénhidrát koncentráció 609 mg/g volt, ami az elméleti hozam 74 %-ának felel meg. A mezofil gomba konzorciummal szemben, a

diszacharid koncentráció közel 20 mg/g, a glükóz koncentráció közel 42 mg/g értékkel magasabb volt. BAO és munkatársai (1992) a fehérkorhadást okozó gombafaj által termelt cellobióz-oxidázt (CBO) tisztított enzim oldatként az ipari celluláz enzim komplex-szel (*T. viride*) együtt alkalmazták. Az oxidatív enzim az aromás lignin bontásával a celluláz aktivitását is elősegítette, aminek eredményeként a mikrokristályos cellulózon 19 %-os konverziót értek el. Az enzimkeverék a cellobióz mennyiségét 10 %-kal, a glükóz mennyiségét pedig 48 %-kal növelte. LIN és munkatársai (2011) a búzaszalmát a *Trichoderma* sp. T-1 (92%), az *A. oryzae* A-4 (1,3 %) a *P. chrysosporium* izolátum (6,7 %) konzorciumával kezelték. E konzorciummal az oldott szénhidrát koncentráció 805 mg/g volt, ami közel 25 %-kal nagyobb az elért eredményeimnél.

A kétlépéses előkezeléssel azonban a mikrobiális szerkezet bontás időtartama lényegesen megnőtt (3 nap helyett 10 napon át tartott), ami miatt technológiai szempontból kevésbé tekinthető kedvező alternatívának.

4.1.3 Cefrézési technikák optimalása

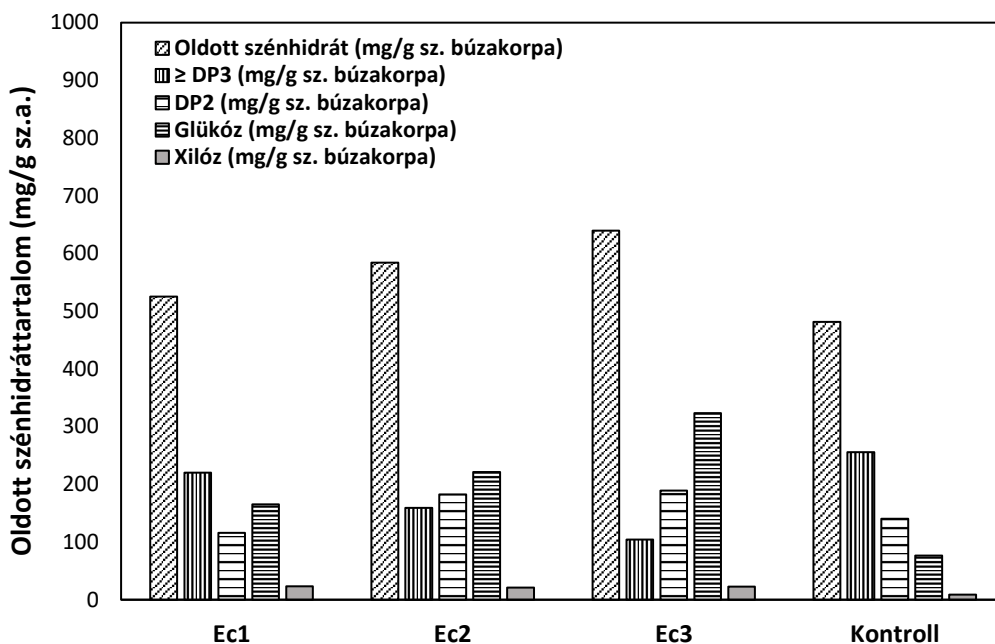
A biológiailag feltárt búzatorpa extrahálását követően igen nagy mennyiségben (közel 300 mg/g) mértem szénhidrát oligomereket, amelyek az oldott szénhidráttartalom több, mint felét (52%) tették ki (**19. ábra**). A munkámban fontosnak tartottam az erjeszhető cukrok, elsősorban a glükóz mennyiségének növelését, ami miatt a továbbiakban ipari enzimek készítmények (celluláz, cellobiáz, xilanáz) és enzimkeverékek hatását vizsgáltam.

4.1.3.1 A cellulóz enzimes hidrolízise

Elsőként a cellulóz, a cellobióz és az egyéb cellulóz oligomerek (cellotrióz, cellotettróz, cellopentóz, celloheptóz) enzimes bonthatóságát a *T. reesei* eredetű (Celluclast® 1.5L) enzimkomplex alkalmazásával követtem nyomon. Az oldott szénhidrát koncentráció alakulását eltérő enzim dózis mellett a **20. ábra** szemlélteti.

A celluláz enzim alkalmazásával a szénhidrát oligomerek mennyiségének növekedését tapasztaltam. Az endo- és exoglukanáz aktivitása nem csupán az oldatban lévő cellulóz oligomerek és diszacharidok bontását eredményezte, hanem a búzatorpa mikrobiális előkezelésével elérhető vált cellulóz rostokat is tovább bontotta. Megfigyelhető, hogy azon esetben, ahol a cellulázt 2100 U/g enzim dózisban alkalmaztam (Ec3), az oldott szénhidrátok mennyisége elérte a 640 mg/g értéket, ami közel 78 %-os hozamot jelent. A diszacharidok mennyisége, szemben az enzimesen nem kezelt mintával, mintegy kétszeresére (190 mg/g) a glükóz mennyisége pedig közel háromszorosára (323 mg/g) nőtt. A xilóz számottevő

csökkenését észleltem. Ez abból eredhet, hogy e kísérleteimnél másik búzakorpa tételt használtam, ami minőségi összetételét tekintve az előzőétől eltérhetett.



20. ábra: Az oldatba vitt szénhidrátok mennyiségi alakulása ipari celluláz enzim komplex alkalmazása mellett

Jelmagyarázat: 350 U/g celluláz (**Ec1**), 1050 U/g celluláz (**Ec2**), 2100 U/g celluláz (**Ec3**), enzimes kezelés nélküli minta (**Kontroll**)

Az enzimes hidrolízis 55 °C-on, pH=5 értéken, 220 rpm rázatási sebességen, 24 órán át tartott.

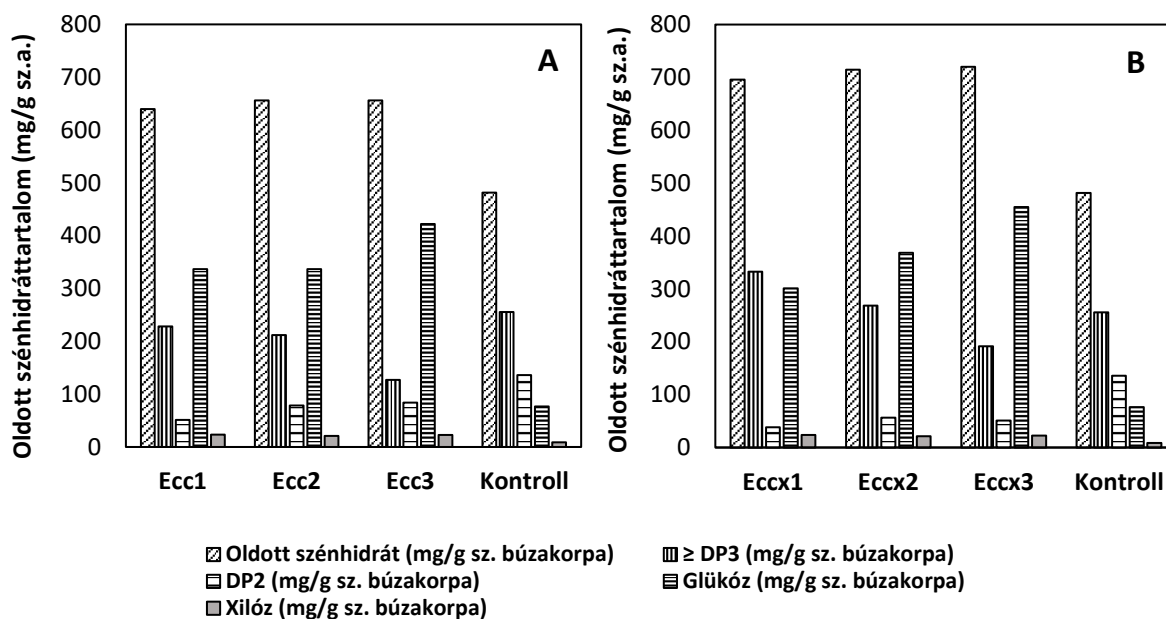
ROZENFELDE és munkatársai (2017) a kénsavval katalizált, gőzrobbantott búzaszalma enzimes hidrolíziséhez két különböző, *T. reesei* eredetű cellulolitikus aktivitású enzimek-szítményt (Accellerase 1500 és Accellerase XC) alkalmaztak hasonló körülmények között. A növelt enzim dózis hatásaként a hidrolizátum glükóz tartalma az elméleti szénhidrát hozam 73 %-át érte el. Az enzimes hidrolízis esetében kisebb glükóz hozamat (közel 40 %) eredményezett, azonban annak tekintetében, hogy a biokonverzió rövidebb időn (24. óra) át tartott, az elért cukor hozamot ígéretesnek tekintem.

4.1.3.2 Enzim keverékek alkalmazása

E kísérleteimnél a 6 különböző enzimkeverék a celluláz mellett eltérő dózisokban β -glükozidáz (cellobiáz) aktivitású enzimszítményt és xilanáz aktivitású enzimpreparátumot is tartalmazott. Az elért szénhidrát hozamokat a **21. ábra** szemlélteti.

A celluláz-cellobiáz enzimkeverékkel a hidrolizátumok diszacharid tartalma több, mint 50 %-kal (55-57 %) csökkent, ami közben a glükóz koncentráció nőtt (**21A. ábra**). A cellobiáz dózisének növelésével a glükóz az oldott szénhidrátoknak mintegy 51 %-át (336 mg/g) és 64 %-át (422 mg/g) tette ki (Ecc2 és Ecc3). VINTILA és munkatársai (2009) a lúggal

kezelt búzaszalma és kukoricaszár enzimes hidrolíziséhez szintén e két enzim keverékét alkalmazták. Esetükben mind a két hidrolizátumnál az elméleti szénhidrát konverzióknak a 25-35 %-át sikerült elérni. A glükóz koncentráció 133 mg/g és 144 mg/g között alakult, ami határozottan kisebb az eredményeimnél. Ennek valószínűsíthető magyarázata az, hogy az enzimes hidrolízisnél a két enzimet alacsonyabb koncentrációban (15 U/g celluláz és 90 U/g cellobiáz) alkalmazták, valamint az előkezeléssel keletkezett inhibitorok csökkentették az enzimek aktivitását.



21. ábra: Az oldatba vitt szénhidrátok mennyiségi alakulása az ipari enzimek készítmények különböző összetételű és arányú keverékeinek alkalmazása esetén

Jelmagyarázat: **A:** 2100 U/g celluláz és 260 U/g cellobiáz (**Ecc1**), 2100 U/g celluláz és 520 U/g cellobiáz (**Ecc2**), 2100 U/g celluláz és 780 U/g cellobiáz (**Ecc3**); enzimes kezelés nélküli minta (**Kontroll**) **B:** 2100 U/g celluláz, 780 U/g cellobiáz és 2500 U/g xilanáz (**Eccx1**), 2100 U/g celluláz, 780 U/g cellobiáz és 5000 U/g xilanáz (**Eccx3**), 2100 U/g celluláz, 780 U/g cellobiáz és 7000 U/g xilanáz; enzimes kezelés nélküli minta (**Kontroll**)

Az enzimes hidrolízis 55 °C-on, pH=5 értéken, 220 rpm rázatás sebességén, 24 órán át tartott.

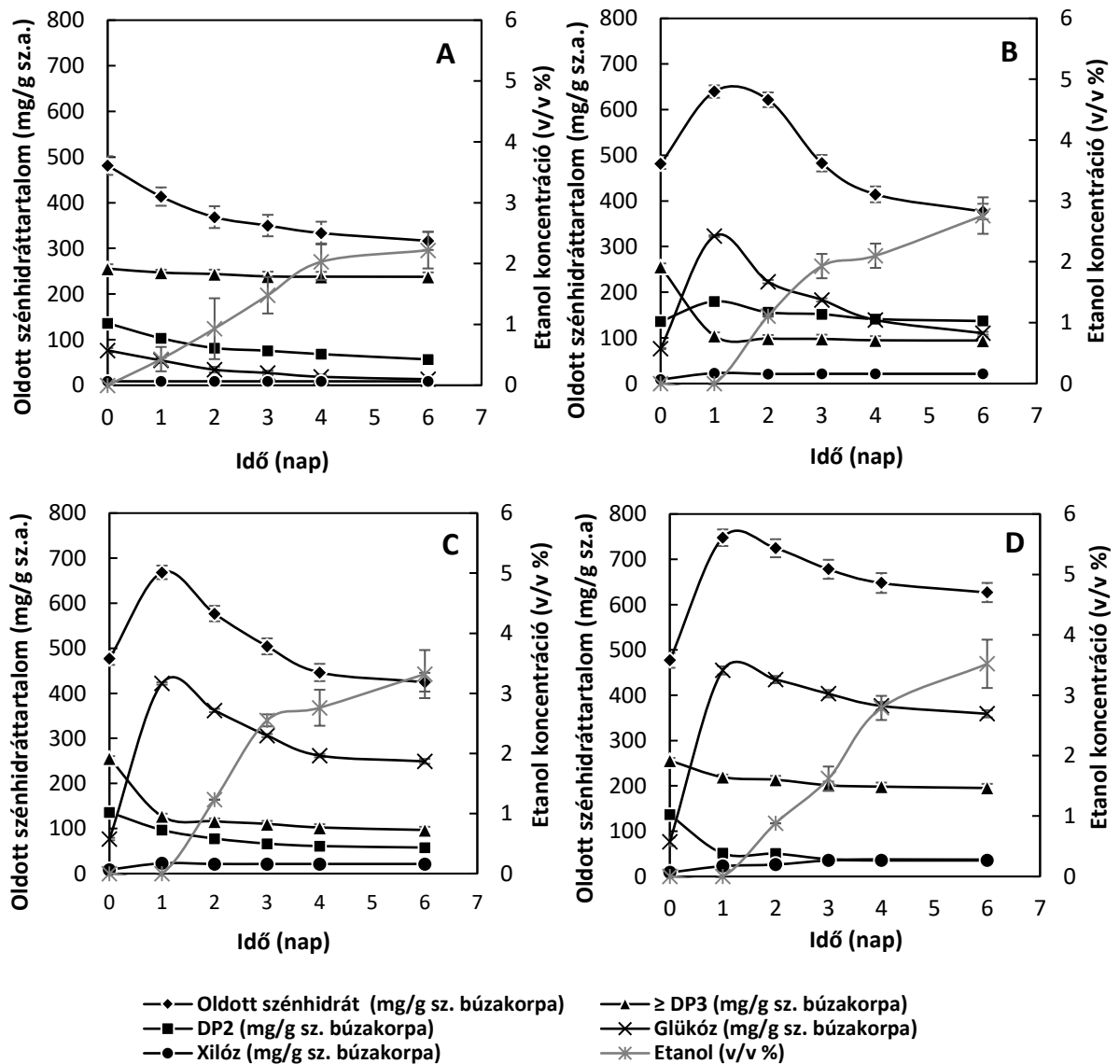
A xilanáz által katalizált bontási reakció xilooligomereket eredményezett, amik az oldott szénhidrát tartalmat tovább növelték (**Eccx1**, **Eccx2** és **Eccx3**) (**21B. ábra**). A hidrolizátum oldott szénhidrát tartalma 720 mg/g (**Eccx3**) volt 2100 U/g celluláz, 780 U/g cellobiáz, valamint 7000 U/g xilanáz enzimkeverék alkalmazását követően. A felszabadított glükóz (454 mg/g) az elméleti szénhidrát hozam 55 %-át érte el. GARCÍA-APARICIO és munkatársai (2007) az előkezelt árpaszalma enzimes hidrolízisének szintén az enzimkeverék xilanáz aktivitásának kedvező hatását emelte ki. Az oldatba vitt xilóz ennél az esetenél sem mutatott növekedést.

4.1.4 Alkoholos erjesztési műveletek búzakorpa hidrolizátumon

A munkámban a biológiailag előkezelt búzakorpa hidrolizátumok alkoholos erjesztését mono- és vegyes kultúrák alkalmazásával valósítottam meg.

4.1.4.1 Erjesztési kísérletek élesztő monokultúrákkal

Kísérleteimben elsőként az alkoholos fermentációban elterjedten alkalmazott Levuline Fb *Saccharomyces cerevisiae* fajélesztőt használtam. Az erjesztési profilokat a **22. ábra** szemlélteti.



22. ábra: A búzakorpa hidrolizátumok erjesztési profiljai *Saccharomyces cerevisiae* élesztő monokultúra esetén

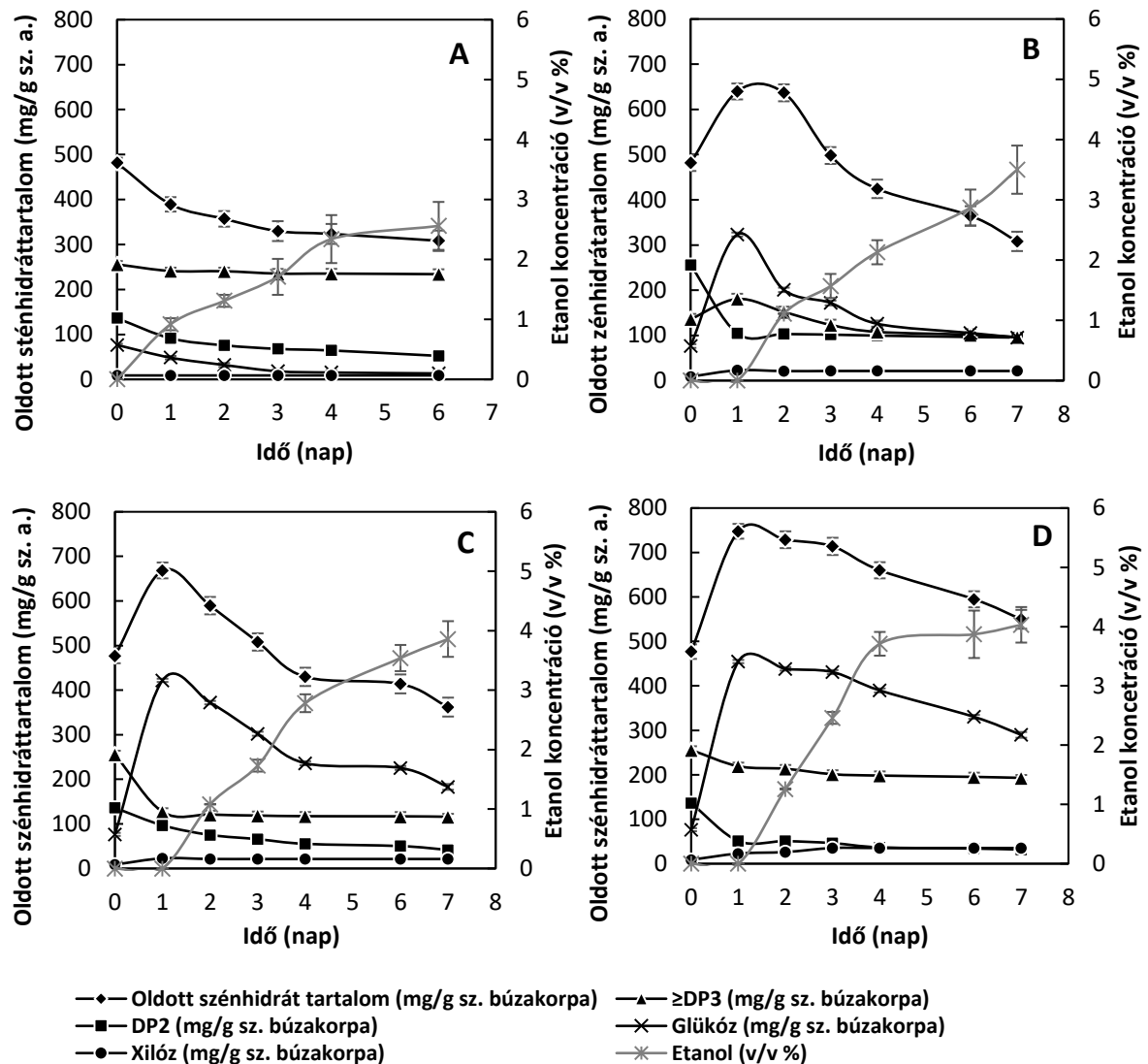
Jelmagyarázat: **A:** gomba konzorciummal 3 napon át kezelt, enzimesen nem hidrolizált (kontroll) minta; **B:** előkezelt, és 24 órán át 2100 U/g cellulázzal hidrolizált minta; **C:** előkezelt és 24 órán át enzimkeverékkel (2100 U/g celluláz és 780 U/g cellobiáz) kezelt minta; **D:** előkezelt és 24 órán át enzimkeverékkel (2100 U/g celluláz, 780 U/g cellobiáz, 7000 U/g xilanáz) kezelt minta alkoholos erjesztése 30 °C-on.

Az enzimesen nem kezelt, natív búzakorpa minta (**22A. ábra**) redukáló cukortartalmának (210-220 mg/g) mintegy 27 %-át az élesztő az erjesztés során hasznosította. A cefrében mért maximális etanol koncentráció ekkor 2,2 % (v/v) volt, ami az elméleti etanol hozam 26 %-ának tekinthető. Láthatóan, az élesztő sejtek erjesztési tevékenysége a 4. naptól lelassult, ezt követően az etanol koncentráció már nem mutatott számottevő növekedést. QUEVEDO-HIDALGO és munkatársai (2013) mikrobiális úton, a fehérkorhadást okozó *Pleurotus ostreatus* HPB/P3 törzs által termelt, micéliumoktól eltávolított, nyers enzim extraktummal kezelte a krizanténium maradványokat. A *S. cerevisiae* SOL/M5 törzs az oldatba vitt erjeszthető cukroknak 88%-át konvertálta etanollá. Azonban az etanol koncentráció csupán 1,1 % (v/v) volt.

A redukáló cukortartalom növelésével (500-520 mg/g) azt tapasztaltam, hogy az részben kedvezően hatott, növelte az etanol koncentrációt, azonban a mért értékek a vártnál kisebbek voltak. A maximális etanoltartalom 3 % (v/v) és 3,5 % (v/v) között alakult (**22B., 22C., 22D. ábra**). Az élesztő a redukáló cukortartalomnak 16-17 %-át konvertálta etanollá. HAWKINS és DORAN-PETERSON (2011) a rekombináns *S. cerevisiae* AJP50 törzs erjesztési profilját vizsgálta 17,5 % (m/v)-os, kénsavval katalizált, gőzrobbantott fenyőfa hidrolizátum esetén. A nagyobb szubsztrátum koncentrációnál az elért etanoltartalom (3,3 %, v/v) az általam is mért értékekhez hasonlóan alakult. Ennek valószínűsíthető oka, hogy a növényi hidrolizátum nagy glükóz tartalma (termékgátlás) valamint a sav hatásaként keletkező inhibitorok az élesztő erjesztési teljesítményét gátolták. CHU és munkatársai (2012) a hagyományos, elkülönített cukrosítás és erjesztés helyett a két részfolyamatot szimultán alkalmazták 30 % (m/v)-os, savasan előkezelt kukoricaszáron. A rekombináns *S. cerevisiae* DQ1 törzs a hidrolizátum erjeszthető cukortartalmának mintegy 66 %-át alakítottá át etanollá, ezáltal 4,8 % (v/v)-os etanoltartalmat értek el.

A következő kísérleteimnél a *Kluyveromyces marxianus* Y.00959 élesztő törzs szénhidrát hasznosítását és etanol termelését vizsgáltam azonos paraméterek mellett. A cellulóz alapú etanoltermelési kísérleteknél ezen élesztőre vonatkozóan, igen kevés kutatási eredmény található. NONKLANG és munkatársai (2008) a *S. cerevisiae* NCYC3233 és RAK359, valamint a *K. marxianus* DMKU3-1042, ATCC 36907, ATCC 12424 és CBS712 törzs erjesztési profiljainak analízisének a következtetést vonták le, hogy e két élesztőfaj törzsei hasonló etanol termelést mutatnak, 30 °C-on, glükóz szubsztrátumon. A natív, enzimesen nem kezelt cefre erjesztésénél 2,6 % (v/v)-os etanol koncentrációt értem el (**23A. ábra**). Az élesztő etanol termelését, a *S. cerevisiae* élesztőhöz hasonlóan, a nagyobb redukáló cukortartalom (500-520 mg/g) csökkentette, azonban ennek mértéke kisebb volt. A maximális etanol koncentráció 3,5 % (v/v) és 4 % (v/v) között alakult (**23B., 23C.** és

23D. ábra). ZHANG és munkatársai (2010) a 15 (m/v) %-os savasan kezelt kukoricacsutka hidrolizátum alkoholos erjesztéséhez *K. marxianus* 6556 törzset alkalmaztak. A hidrolizátum cukortartalma az élesztő erjesztő képességét kisebb mértékben csökkentette, ezáltal 7,2 % (v/v)-os etanoltartalmat értek el.



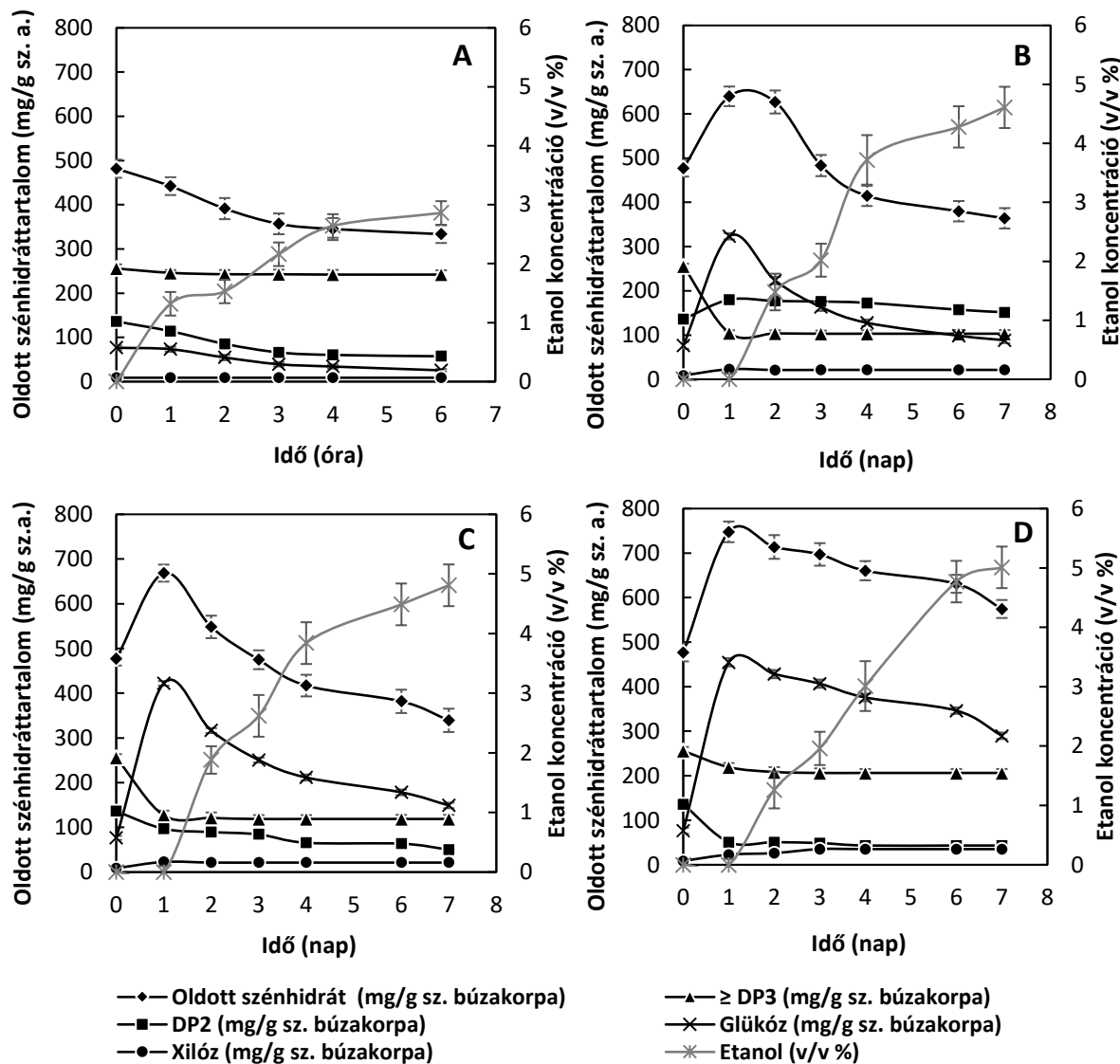
23. ábra: A búzakerpa hidrolizátumok erjesztési profiljai *Kluyveromyces marxianus* élesztő monokultúra esetén

Jelmagyarázat: **A:** gomba konzorciummal 3 napon át kezelt, enzimesen nem hidrolizált (kontroll) minta; **B:** előkezelt, és 24 órán át 2100 U/g cellulázzal hidrolizált minta; **C:** előkezelt és 24 órán át enzimkeverékkel (2100 U/g celluláz és 780 U/g cellobiáz) kezelt minta; **D:** előkezelt és 24 órán át enzimkeverékkel (2100 U/g celluláz, 780 U/g cellobiáz, 7000 U/g xilanáz) kezelt minta alkoholos erjesztése 30 °C-on.

GOSHIMA és munkatársai (2013) a *K. marxianus* DMB1 törzs vizsgálatánál azt tapasztalták, hogy a cellobiózon, a xilózon, sőt az arabinózon is növekedett. Az erjesztési kísérleteimnél az élesztő elsőként a glükózt hasznosította, és azután következtek a diszacharidok (cellobióz, maltóz). A kiejert cefrében mért glükóz és diszacharidok mennyisége továbbra is viszonylag magas értékeket (az elméleti hozam 27-40 %-a) mutatott.

4.1.4.2 Erjesztési kísérletek baktérium monokultúrával

Az etanol termelő rekombináns *Zymomonas mobilis* törzsek ipari méretekben is hasznosítottak, amelyek az élesztőkkel szemben számos előnyös tulajdonságot hordozhatnak.



24. ábra: A búzakorpa hidrolizátumok erjesztési profiljai *Zymomonas mobilis* baktérium monokultúra esetén

Jelmagyarázat: **A:** gomba konzorciummal 3 napon át kezelt, enzimesen nem hidrolizált (kontroll) minta; **B:** előkezelt, és 24 órán át 2100 U/g cellulázzal hidrolizált minta; **C:** előkezelt és 24 órán át enzimkeverékkel (2100 U/g celluláz és 780 U/g cellobiáz) kezelt minta; **D:** előkezelt és 24 órán át enzimkeverékkel (2100 U/g celluláz, 780 U/g cellobiáz, 7000 U/g xilanáz) kezelt minta alkoholos erjesztése 30 °C-on.

MOHAGHEGHI és munkatársai (2002) a *Z. mobilis* AX101 törzs etanol termelését követték nyomon monoszacharidok (4 %, m/v glükóz; 4 %, m/v xilóz; 2 %, m/v arabinóz) keverékén. Megállapították, hogy a rekombináns törzs elsőként a glükózt, és azt követően a xilózt erjesztette etanollá. Az etanoltartalom rövid időn belül (48 óra alatt) 4,2 % (v/v)-ra nőtt.

Ezen ismeretek birtokában vizsgáltam a *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* B.01327^T törzs alkoholos erjesztési képességét a biológiailag előkezelt búzakorpa hidrolizátumon.

Az erjesztési profilok alapján (**24. ábra**) a baktérium a natív, enzimesen nem kezelt és az enzimesen kezelt búzakorpa cefrék erjesztésénél is az élesztő monokultúráknál (*S. cerevisiae* és *K. marxianus*) nagyobb etanol hozamokat eredményezett. A maximális etanol koncentráció 2,8 % (v/v) és 5,1 % (v/v) között alakult. Látható, hogy a búzakorpa hidrolizátumokban a baktérium sejtek a glükózt hasznosították nagyobb mértékben. A diszacharidok mennyisége részben csökkent.

Az erjesztés során a natív cefre redukáló cukortartalma közel 64 %-kal csökkent, aminek 55 %-a az etanol termeléshez hasznosult (**24A. ábra**). Az erjesztés első szakaszát követően (első 4 nap) az etanol termelés lelassult, amit az enzimekkel kezelt cefrék esetén is tapasztaltam. A nagyobb redukálócukortartalom (500-520 mg/g) szintén kedvezőtlen hatott a baktérium erjesztési kapacitására. Ebben az esetben a redukálócukortartalomnak csupán 35-50 %-a alakult át etanollá (**24B., 24C. és 24D. ábra**).

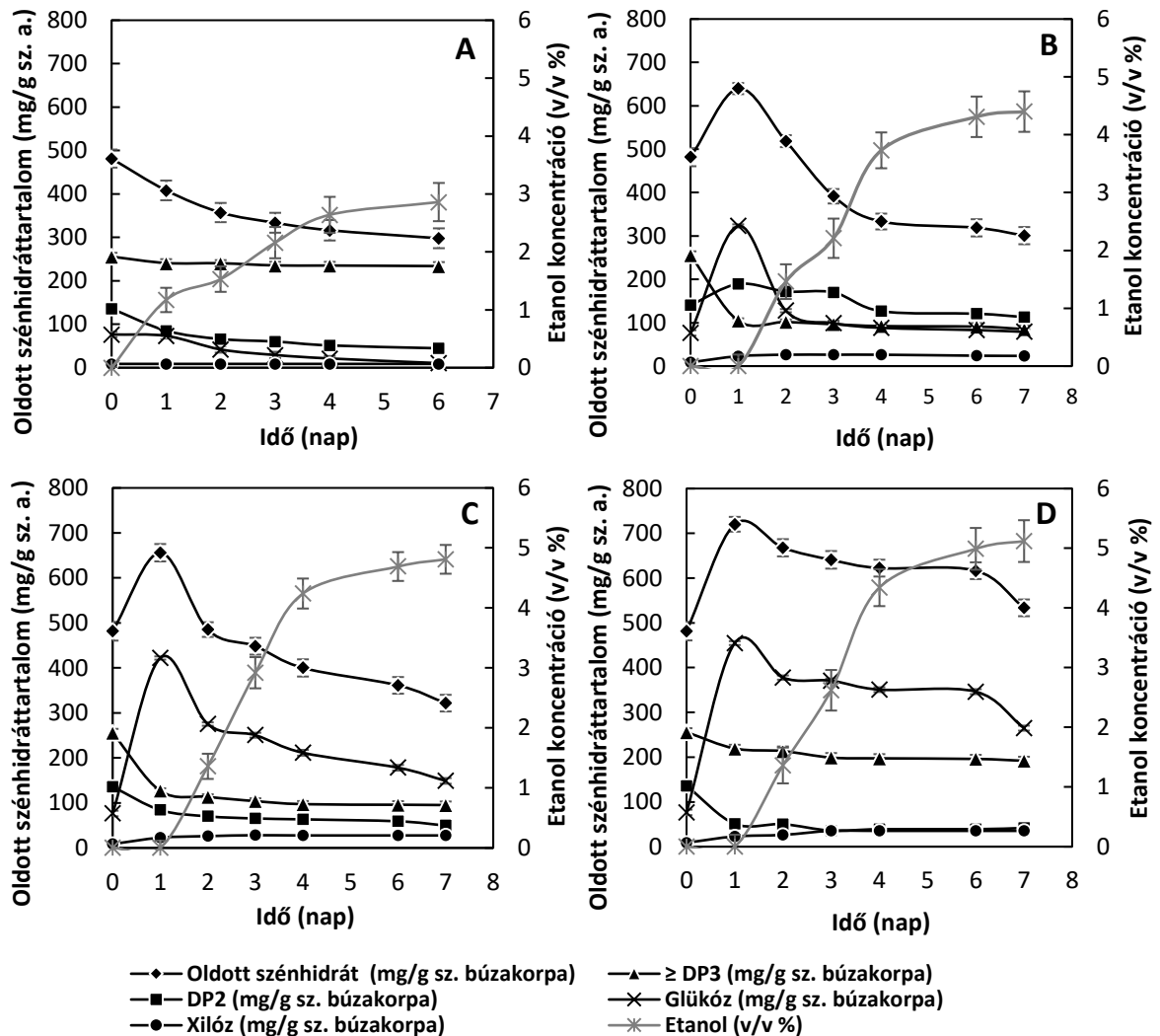
DOS SANTOS és munkatársai (2010) a savasan előkezelt cukornád bagasz cukrosítását és erjesztését szimultán végezték el. Az általuk alkalmazott *Z. mobilis* CP4 törzs már 24 óra alatt leerjesztette a cefre 8 % (m/v) glükóz tartalmát, ezzel 5,5 % (v/v) etanol koncentrációt eredményezve. SCHELL és munkatársai (2016) ennél nagyobb szubsztrátum koncentráció mellett, 17,5 % (m/v) és a 20 % (m/v) savasan előkezelt kukoricaszár hidrolizátum erjesztéséhez a *Z. mobilis* 8b törzset alkalmazták, amely az erjeszthető cukrok 78-80 %-át konvertálta etanollá. A maximális etanol koncentráció elérte a 8-8,7 % (v/v) értéket.

4.1.4.3 Ko-fermentációs erjesztési kísérletek

A monokultúrákkal történő kísérleteknél igen magas maradt a nem hasznosított, erjeszthető cukrok mennyisége. A korábbi kutatások eredményei bizonyították, hogy a vegyes kultúrák alkalmazásával fokozható a cukrok hasznosítása, ezáltal az etanolhozam növelhető. SAHU és munkatársai (2015) gőzrobbantott gyapotszál, YADAV és munkatársai pedig (2011) savasan kezelt rizsszalma etanol célú hasznosításához vegyes élesztő kultúrákat alkalmaztak, ahol az élesztők egymást kiegészítő, szinergens kölcsönhatásának köszönhetően, az etanolhozam, a monokultúrákkal szemben, közel 2-3 % (v/v)-kal is növekedett.

A *S. cerevisiae* és a *K. marxianus* szimultán alkalmazását hagyományos, elsőgenerációs etanolfermentációknál (tejsavó, inulin stb) említették (GUO *et al.*, 2010; DÉNES *et al.*, 2013; ROSENBERG *et al.*, 2014), míg a másodgenerációs etanol előállításnál erre vonatkozó ismeretek még hiányosak. Ezért a következő kísérleteimnél megvizsgáltam a két élesztő

szénhidrát hasznosítását és az etanol koncentráció alakulását biológiailag előkezelt búzakorpa hidrolizátumon.



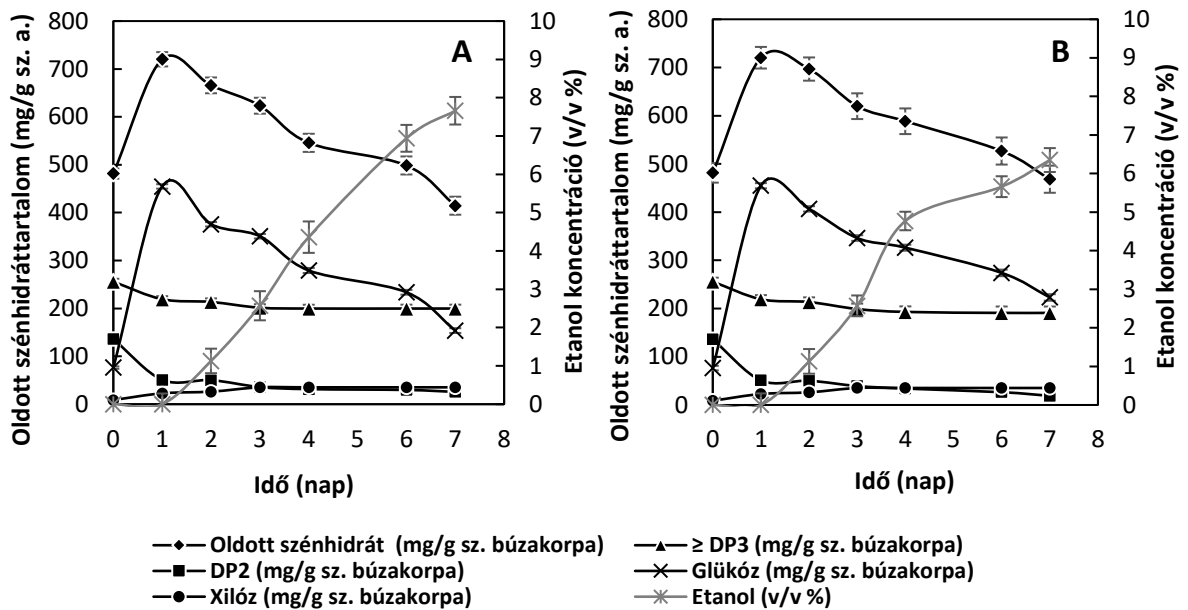
25. ábra: A búzakorpa hidrolizátumok erjesztési profiljai *Saccharomyces cerevisiae* és *Kluyveromyces marxianus* (1:1 arány) vegyes kultúra alkalmazása esetén

Jelmagyarázat: **A:** gomba konzorciummal 72 órán át előkezelt, enzimesen nem hidrolizált (kontroll) minta; **B:** előkezelt, és 24 órán át 2100 U/g cellulázzal hidrolizált minta; **C:** előkezelt és 24 órán át enzim keverékkel (2100 U/g celluláz és 780 U/g cellobiáz) kezelt minta; **D:** előkezelt és 24 órán át enzim keverékkel (2100 U/g celluláz, 780 U/g cellobiáz, 7000 U/g xilanáz) kezelt minta

A natív, enzimesen nem kezelt búzakorpa cefre erjesztésénél azt tapasztaltam, hogy az az etanol tartalom már a 4. napon elérte a 2,6 % (v/v)-ot. Ezt követően az élesztők etanoltermelésének dinamikája lelassult. Az erjesztés végén a cefrében mért etanol koncentráció 2,8 % (v/v) volt, ezáltal az élesztők a redukáló cukroknak mintegy 24 %-át alakították át etanollá (**25A. ábra**). A nagyobb redukáló cukortartalomú cefrékben mért etanol koncentráció 4,4 % (v/v) és 5,2 % (v/v) között alakult (**25B.**, **25C.** és **25D. ábra**),

amely hasonló a baktérium kultúra által kimutatott teljesítményekhez. A vegyes élesztőkultúra erjesztési teljesítménye a 4. napon szintén lelassult.

A kapott eredmények megerősítették a korábbi feltételezést, amely szerint a vegyes élesztő kultúra alkalmazása részben növeli az elérhető etanolhozamot. Ennek alapján váltottam a stratégiát az etanolhozam növelésének érdekében. Megvizsgáltam az időben eltolt beoltási technika hatását. A baktérium kultúrát az élesztőkkel történő etanolfermentáció 3. és 4. napján oltottam be.



Azt tapasztaltam, hogy a baktérium kultúra igen rövid idő alatt alkalmazkodott a környezethez, a beoltást követő első 24-48 órában már viszonylag hatékonyan erjesztette a cefre glükóz tartalmát etanollá. Az erjesztés végén az etanol koncentráció 6,4 % (v/v) és 7,6 % (v/v) között alakult, amely másfélszer nagyobb a csak élesztőkkel elért eredményeknél. Az etanol konverzió határfoka elérte a 38 %-ot. Ennek az a magyarázata, hogy a baktérium gyorsabban szaporodott, valamint az elhalt, autolizált élesztő sejtek olyan értékes tápanyagokat - szerves nitrogént és ásványi anyagokat – biztosítottak, amelyek kvázi fokozzák az alkoholos erjesztési hatékonyságot. Az erjesztési profilokat (26A. és 26B. ábra) összevetve megállapítható, hogy amennyiben a cefre etanoltartalma a baktérium leoltásnál elérte az 5 % (v/v)-ot, az etanoltermelés már kisebb mértékben nőtt.

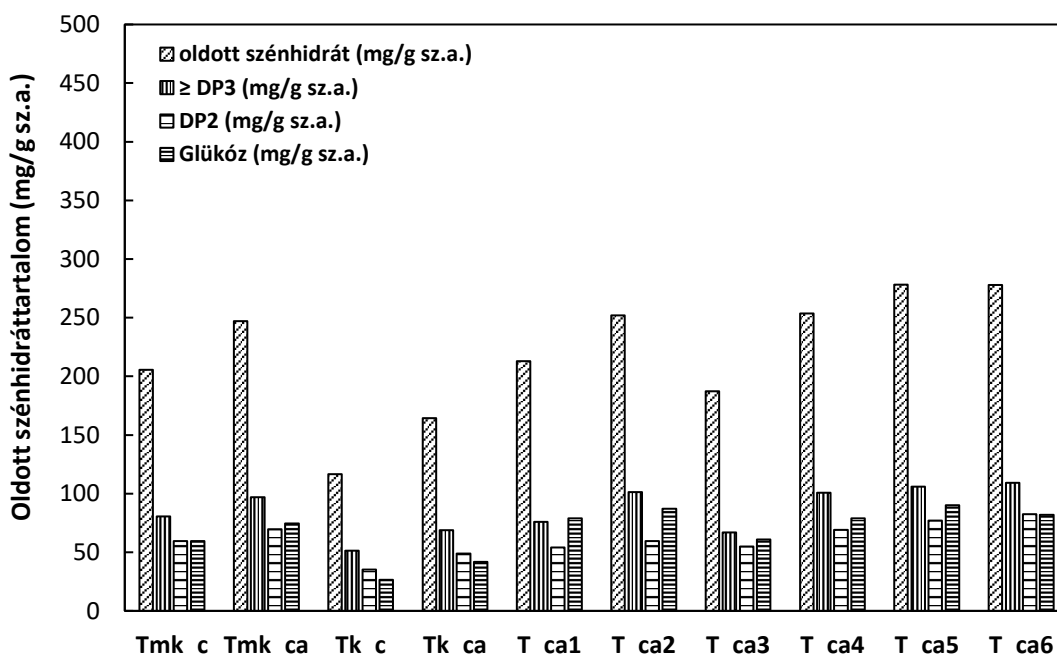
4.2 Papír hulladékok etanol célú hasznosításának modellezése

A kutatómunkám másik fő célkitűzése a papírhulladékok értéknövelő hasznosítása volt. E biomassa szintén nagy mennyiségben tartalmaz szénhidrátot (elsősorban cellulózt), azonban a keletkezési útvonala miatt a mezőgazdasági, valamint az erdészeti melléktermékek és hulladékok hasznosításától eltérő előkezelési módszereket igényelhet.

4.2.1 Előkészítő és tisztítási műveletek

4.2.1.1 Mosási és áztatási technikák

Az előkészítési módszerek között a mosási technikákat, kemikáliák nélkül és kemikáliák alkalmazásával is vizsgáltam irodai és újságpapír keverék mintákon.



27. ábra: Az oldatba vitt szénhidrátok mennyiségének alakulása a különböző módon előkészített papír minták esetén

Jelmagyarázat: irodai papír (**Tmk_c**) és újságpapír keverék (**Tk_c**) enzimés bontása (2100 U/g celluláz) vizes áztatást követően; irodai papír (**Tmk_ca**) és újságpapír keverék (**Tk_ca**) enzimés bontása (2100 U/g celluláz és 320 U/g amiloglükózidáz) vizes áztatást követően; újságpapír keverék enzimés bontása (2100 U/g celluláz és 320 U/g amiloglükózidáz) 10 %-os NaOH (**T_ca1**), 20 %-os NaOH (**T_ca2**), 10%-os ecetsav (**T_ca3**), 25%-os etil-alkohol (**T_ca4**), 50 %-os etil-alkohol (**T_ca5**) és 50 %-os aceton (**T_ca6**) oldatában történő áztatást követően.

Az áztatás 30 °C-on, 6 órán át tartott, 1 % (m/v)-os aprított papír minta esetén. Az enzimés hidrolízis során a mintákat 24 órán át, pH=5,5 értéken, 55 °C-on és 220 rpm mellett rázattam.

Megállapítottam, hogy kemikáliák alkalmazása nélkül végzett vizes áztatást követően a cellulóz rostok hidrolízisével (2100 U/g celluláz) elérhető maximális szénhidrát koncentráció irodai papír minta (Tmk_c) esetén 200 mg/g, az újságpapír keverék (Tk_c)

esetén pedig 116 mg/g volt (**27. ábra**). A szénhidrát konverzió hatékonysága az elméleti szénhidrát hozamnak csupán 16-24 %-át érte el. Az irodai papír hidrolizátum cukor-dimereket, valamint glükózt hasonló koncentrációban (59 mg/g) tartalmazott. Ezzel szemben, az újságpapír hidrolizátumban e cukrok mennyisége több, mint felére csökkent.

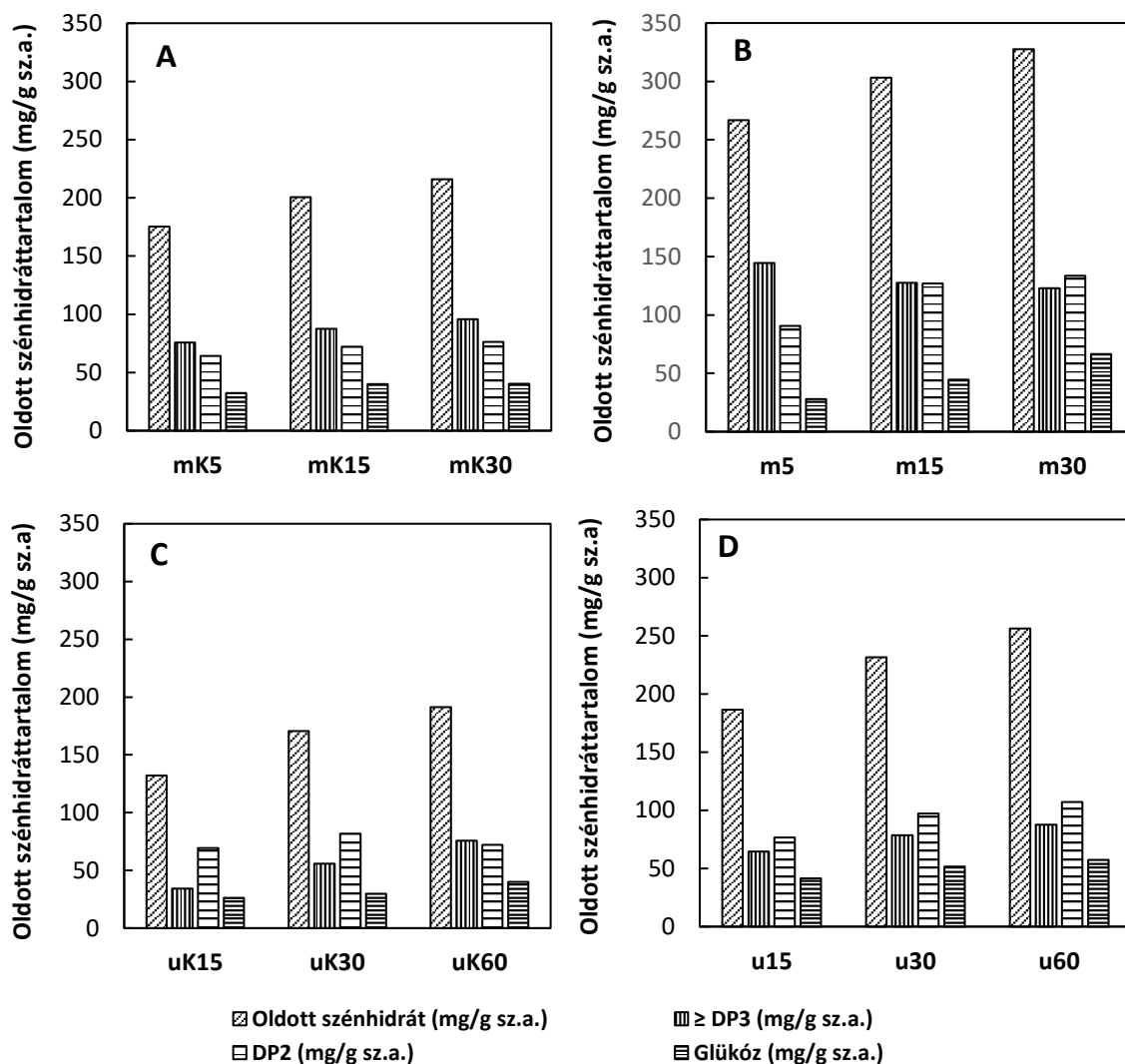
A celluláz (2100 U/g celluláz) és az amiloglükozidáz (320 U/g) enzimkeverék alkalmazásával az oldott szénhidrát koncentráció 45 mg/g (Tmk_ca) és 55 mg/g (Tk_ca) értékkel nőtt. Az enzimkeverék amilolitikus aktivitása a papír felületen lévő keményítő szemcséket bontotta, glükózt, maltózt és határdextrineket eredményezve. Ez a bontási mechanizmus közvetve a celluláz aktivitását is erősítette, hiszen a keményítő eltávolításával a cellulóz rostok nagyobb mértékben váltak elérhetővé. Az elméleti szénhidrát hozamnak azonban így is csak 22-29 %-át sikerült elérni. A kemikáliák nélküli mosás és áztatás önmagában nem tekinthető hatékony előkészítési műveletnek.

A továbbiakban megvizsgáltam eltérő koncentrációkban, különböző kemikáliák vizes oldatainak hatását újságpapír keverékeken. A 20 %-os NaOH oldattal, illetve a 25 %-os etil-alkohol oldattal kezelt papír minták enzimes hidrolízisének az oldott szénhidráttartalom elérte a 252 mg/g (T_ca2), valamint a 254 mg/g (T_ca4) értéket. Az 50 %-os etil-alkohol oldat, valamint az 50 %-os aceton oldattal történő mosás ennél nagyobb mértékben növelte az enzimkeverék teljesítményét. A két utóbbi esetben a szénhidrátok közel 37 %-át (278 mg/g) sikerült oldatba vinni (T_ca5 és T_ca6). A cukor-dimerek mennyisége 77-83 mg/g, a glükózé pedig 82-90 mg/g volt. A vizsgált kemikáliák között az ecetsav 10 %-os koncentrációban kevésbé bizonyult hatásosnak, ugyanis e körülmények mellett a hidrolizátumban a mért szénhidrát koncentráció csupán 188 mg/g volt (T_ca3).

Az elért eredmények tekintetében, a festékpigmentek és egyéb nemkívánatos szennyező anyagok eltávolításának vizsgálatát az etanol alkalmazásával folytattam a következő előkezelési és tisztítási kísérleteim során. Az etanol előnyeként említeném annak neutrális kémhatását, a cellulóz rostokat nem roncsolja - a papír hulladékok tisztításához alkalmazott hidrogén-peroxiddal és más maró hatású kemikáliával szemben -, továbbá az alkalmazását követően a rendszerből könnyen visszanyerhető és újrahasznosítható.

4.2.1.2 Mikrohullámú és ultrahangos kezelések hatása

Két különböző besugárzásos technika időtartamának hatását vizsgáltam újságpapír keverék mintákon. Az előkezelések tisztító hatását az előzőekhez hasonlóan, a minták enzimes hidrolízisével ellenőriztem. Az eredményeit a **28. ábra** szemlélteti.



28. ábra: Mikrohullámmal és ultrahanggal előkezelt újságpapír keverék minták (1 %, m/v) esetén az oldatba vitt szénhidrátok mennyiségének időbeni alakulása

Jelmagyarázat: A: mikrohullámú kezelés vizes közegben, 5 perc (mK5); mikrohullámú kezelés vizes közegben, 15 perc (mK15); mikrohullámú kezelés vizes közegben, 30 perc (mK30);

B: mikrohullámú kezelés 50%-os etil-alkohol oldatban, 5 perc (m5); mikrohullámú kezelés 50%-os etil-alkohol oldatban, 15 perc (m15); mikrohullámú kezelés 50%-os etil-alkohol oldatban, 30 perc (m30);

C: ultrahangos kezelés vizes közegben, 15 perc (uK5); ultrahangos kezelés vizes közegben, 30 perc (uK30); ultrahangos kezelés vizes közegben, 60 perc (uK60); **D:** ultrahangos kezelés 50%-os etil-alkohol oldatban, 15 perc (u15); ultrahangos kezelés 50%-os etil-alkohol oldatban, 30 perc (u30); ultrahangos kezelés 50%-os etil-alkohol oldatban, 60 perc (u60)

Az enzimes hidrolízishez celluláz (2100 U/g) és amiloglükózidáz (320 U/g) aktivitású ipari enzimek keverékét alkalmaztam. Az enzimes hidrolízis során a mintákat 24 órán át, pH=5 értéken, 55 °C-on és 220 rpm mellett rázattam.

A mikrohullámú kezeléseknél (750 W, 5-30 perc) megállapítottam, hogy a hosszabb kezelési idő az enzimes szénhidrát konverzió hatékonyságát növelte (28A. és 28B. ábra). Az 5 percen át kezelt mintáknál mért maximális szénhidrát koncentráció 176 mg/g (mK5), valamint 267 mg/g (m5) volt. A 30 percen át kezelt mintáknál az oldott szénhidrát tartalom további 39 mg/g (mK30) és 50 mg/g (m30) értékkel nőtt. A szerves oldószer alkalmazásával az enzimes szénhidrát konverzió elérte a 44 %-ot, ami ezáltal hatásosabb kezelésnek

bizonyult a mosási technikáknál. Emellett, a kezelés időtartama is lényegesen lerövidült. A diszacharidok mennyisége ekkor 134 mg/g, a glükóze pedig 67 mg/g volt. A szénhidrát oligomereknél időben előre haladva kis mértékben, de csökkenést tapasztaltam, amit viszont kontroll, vizes minták nem mutattak.

A besugárzásos technikák alkalmazásáról igen kevés publikált kutatás áll rendelkezésre. A közelmúltban ASOKAN és munkatársai (2018) biztató eredményeket értek el. A papírkeverék festékmentesítését két lépésben végezték el, a savas kezelést mikrohullámú vagy ultrahangos besugárzás követte. A mikrohullámmal kezelt (600 W, 10 perc) minta enzimes hidrolízisével az oldatba vitt redukáló cukrok maximális értéke 689 mg/g volt, amely nagyobb az általam elért eredménynél. A szonifikált papír minták enzimes bontásával a mikrohullámmal kezelt mintáikhoz hasonló szénhidrát kinyerést (721 mg/g) értek el. Kísérleteimnél ettől eltérően, a szonifikált minták hidrolízisével kisebb szénhidrát hozamokat figyeltem meg (**28C.** és **28D. ábra**). A 30 percen át kezelt minták enzimes hidrolízisével az oldott szénhidrát tartalom 171 mg/g (uK30) és 232 mg/g (u30) között alakult. A szénhidrát konverzió hatásfoka 23-31 %-ra csökkent. A kezelés időtartamának növelésével (60 perc) csak kisebb mértékű növekedést (20-25 mg/g) értem el. A folyadék frakciók diszacharid tartalma 72-107 mg/g, a glükóze pedig 30-58 mg/g között alakult.

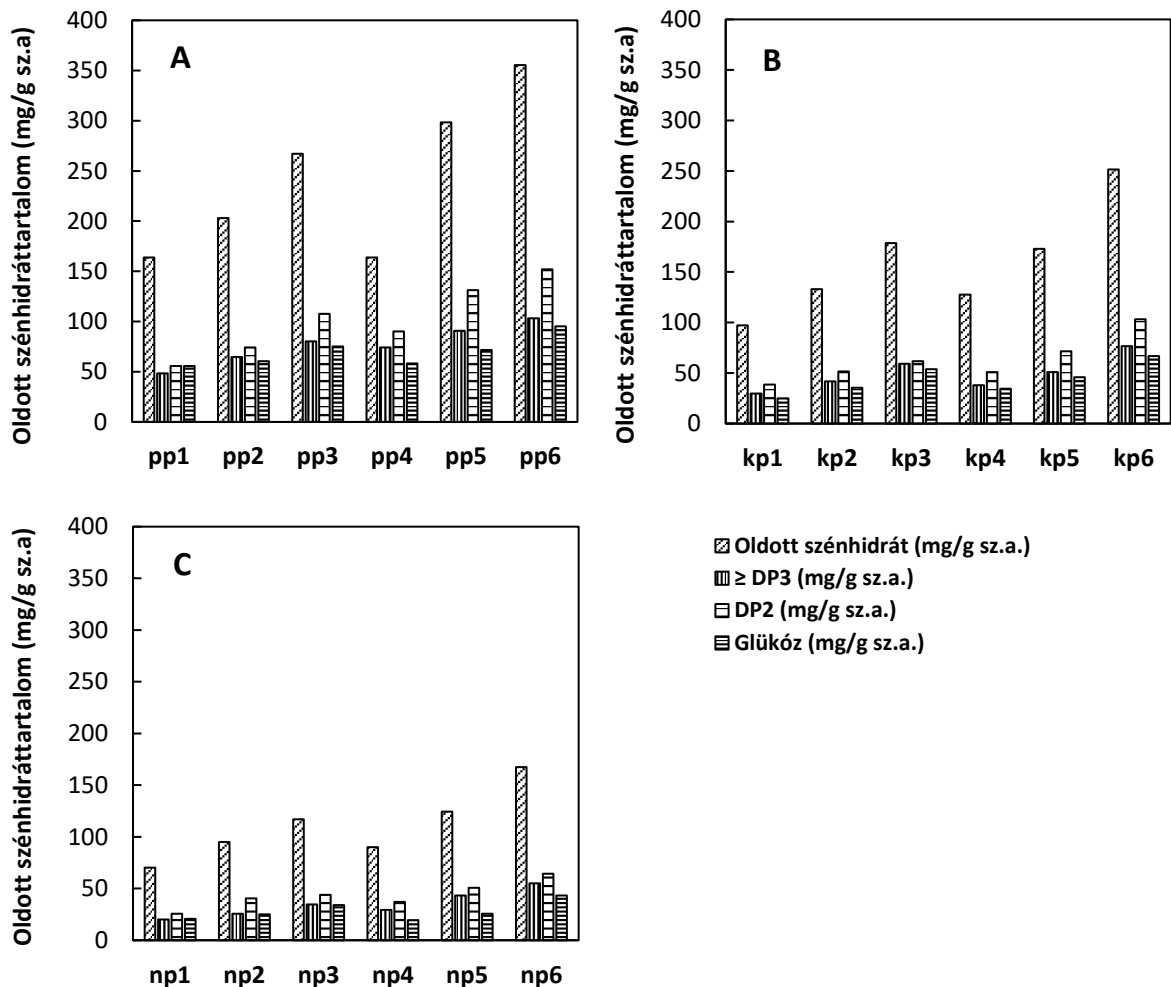
4.2.1.3 Az alkoholos flotálási technikák

A munkámban újságpapír minták és az ebből készített rostsuszpenzió festékmentesítéséhez kevertetett, alkoholos (etanolos) flotációs cellát használtam. A kezelési hőmérséklet, a papír méret (fajlagos felület), valamint az etanol koncentráció hatását szintén az enzimes szénhidrát hidrolízis eredményei szerint értékeltem. Az eredményeket a **29. ábra** szemlélteti.

Azt tapasztaltam, hogy az 50 °C-on végzett flotálás, mind a durva rendszereknél (0,5x0,5mm-es és 2x2mm-es minták), mind pedig a rostsuszpenzióknál az enzimes hidrolízis hatékonyságát jelentősen növelte. E jelenség magyarázata, hogy a hőmérséklet növelése a rostokon lévő nedvesítő filmréteg fizikai jellemzőinek, valamint a tinta szemcsék és a rostok szerkezetének változását idézte elő. A cellulóz rostok megduzzadtak, ami szintén segítette a festékanyagok leválasztását (LI *et al.*, 2012).

A papír méretének csökkentésével a flotációs cellába bevezetett levegőbuborékok, valamint az etanol is, nagyobb felületen tudtak érintkezni a cellulóz rostokkal, ami fokozta a technika tisztító hatását. Az enzimes hidrolízissel a szénhidrátok közel 47 %-át (335 mg/g, 30 perc) sikerült oldatba vinni (**29A. ábra**). A durva rendszereknél (kp és np) a fajlagos

felület csökkenésével a flotációs hajlam romlott. A kezelt minták enzimes bontását követően az oldott szénhidrát koncentráció 25 %-kal (kp) (30 perc), valamint 50 %-kal (np) (30 perc) volt kisebb (**29B.** és **29C. ábra**).



29. ábra: A fajlagos felület és a kezelési idő hatása az alkoholos flotáció hatékonyságára, 25 % (v/v)-os etanol alkalmazása mellett

Jelmagyarázat: **A:** pépesített papír minták, 30°C, 5 perc (pp1), 15 perc (pp2), 30 perc (pp3), valamint 50°C, 5 perc (pp4), 15 perc (pp5), 30 perc (pp6), **B:** 0,5 cm x 0,5 cm méretű papír minták, 30°C, 5 perc (kp1), 15 perc (kp2), 30 perc (kp3), valamint 50°C, 5 perc (kp4), 15 perc (kp5), 30 perc (kp6); **C:** 2 cm x 2 cm méretű papír minták, 30°C, 5 perc (np1), 15 perc (np2), 30 perc (np3), valamint 50°C, 5 perc (np4), 15 perc (np5), 30 perc (np6)

Az enzimes hidrolízishez celluláz (2100 U/g) és amiloglükózidáz (320 U/g) aktivitású ipari enzimek keverékét alkalmaztam. Az enzimes hidrolízis során az 1 % (m/v)-os mintákat 24 órán át, pH=5,5 értéken, 55 °C-on és 220 rpm mellett rázattam.

A flotálási időtartam növelése mind a három rendszer enzimes hidrolízisének kedvezett, amit 30 °C-on és 50 °C-on is tapasztaltam. IMAMOGLU és munkatársai (2006) 0,8 % (m/v) Olinor-RS 4020 gyanta szappan oldatban, 40 °C-on és 1450 rpm kevertetési sebesség mellett végezték el a pépesített papírkeverék flotálását. A kezelés 10. percénél a rostok festéktartalma már 86 %-kal csökkent. Ettől eltérően, TRUMIC és munkatársai (2007) a papír rostokat 0,4 % oleinsav oldatban, 20 °C-on és 1250 rpm kevertetési sebességen

flotálták, ami az alacsony hőmérséklet miatt az előzőnél hosszabb, 20 perces kezelési időtartamot igényelt. A kísérletemnél a 30 percen át tartó kezelést követően értem el hatásosabb enzimes szénhidrát bontást.

BEHIN és VADEN (2007) a szekunder papír rostok alkoholokkal történő tisztításánál azt a következtetést vonták le, hogy az alkil-alkoholok láncának hossza (szénatomok száma) és a festék pigmentek leválasztásának hatékonysága között szoros összefüggés található. Esetemben a kezelés hosszabb időtartama talán azzal indokolható, hogy az etanol a rövidebb láncosság miatt viszonylag kisebb reakcióképességet mutatott.

A továbbiakban az alkoholos flotálást eltérő etanol koncentrációk mellett, pépesített papír mintákon, 30 percen át 50 °C-on vizsgáltam. A **12. táblázat** az így módon kezelt papír mintáknál az elért szénhidrát és glükóz hozamokat tartalmazza.

12. táblázat: Az oldott szénhidrát és glükóz hozam alakulása

<i>Minta</i>	<i>Etanol, v/v%</i>	<i>Hőmérséklet, °C</i>	<i>Y szénhidrát*, %</i>	<i>Y glükóz**, %</i>
Fpe1	10	50	21	16
Fpe2	15	50	24	21
Fpe3	25	50	42	27
Fpe4	35	50	55	28
Fpe5	40	50	56	33

Az enzimes hidrolízishez celluláz (2100 U/g) és amiloglükozidáz (320 U/g) aktivitású ipari enzimek készítmények keverékét alkalmaztam. Az enzimes hidrolízis során 1 % (m/v)-os mintákat 24 órán át, pH=5,5 értéken, 55 °C-on és 220 rpm mellett rázattam.

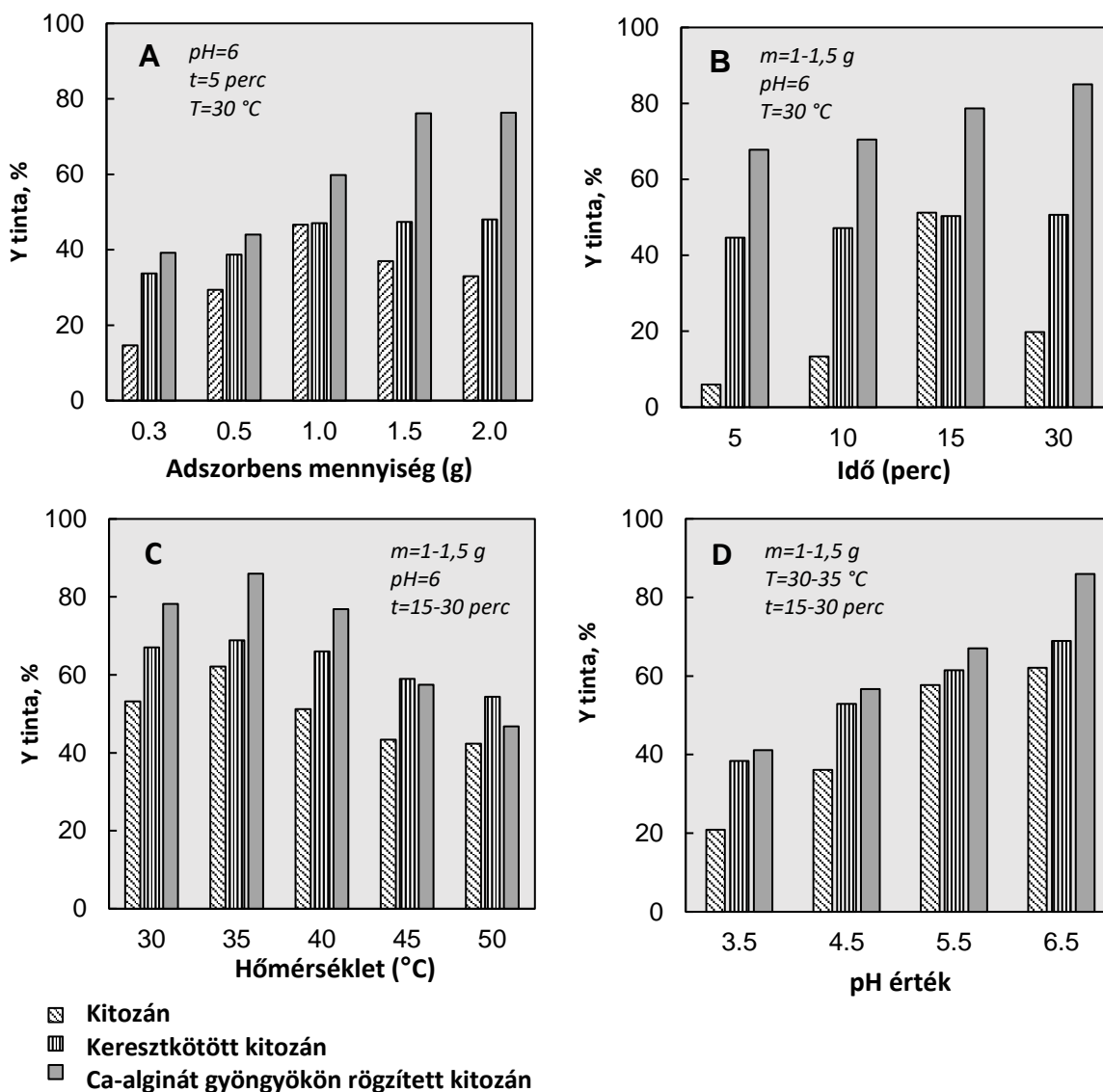
*Y szénhidrát: elméleti szénhidrát hozam szerint számolt százalékos érték

** Y glükóz: az oldott szénhidráttartalom szerint számolt százalékos értéke

A különböző etanol koncentrációkkal történő kezelés hatásaként az enzimes cukrosítással a szénhidrát konverzió hatásfoka 21 % és 56 % között alakult. Azon eseteknél, ahol a szerves oldószert 10-15 % (v/v) között alkalmaztam (Fpe1 és Fpe2), a szénhidrátok oldatba vitele csökkenést mutatott. A hidrolizátumoknál a glükóz hozam 16-21 % volt. A 25 % (v/v)-nál nagyobb etanol koncentráció mellett ez az érték már 27-32 % között alakult (Fpe3, Fpe4, Fpe5). Ezen esetekben az etanol, mivel nagyobb koncentrációban érintkezett a rostokon található tinta szemcsékkel, azokat hatékonyabban tudta leválasztani.

4.2.1.4 Kitozán és módosított kitozán biopolimerek festékanyag megkötése

A kísérleteim első részénél a kitozán mellett, két különböző, módosított kitozán festékanyag megkötő hatását, eltérő adszorbens dózis, kezelési idő, valamint kémhatás és hőmérséklet mellett vizsgáltam modell tinta oldatokban. A **30. ábra** a modell oldatokban található Carbon Black megkötésének százalékos értékeit szemlélteti.



30. ábra: A tintaeltávolítás hatékonysága különböző kitozán adszorbensek alkalmazásával

A modell tinta oldat minden esetben 100 ppm koncentrációban tartalmazott HP típusú fekete festékanyagot (Carbon Black).

Megállapítottam, hogy az adszorbensek dózisának növelésével, 0,3 g és 2 g között, a festék pigmentek megkötésének hatékonysága eltérően alakult az adott kísérleti paraméterek között (**30A. ábra**). Abban az esetben, ha a kitozán dózisát 0,3 g-tól 1 g-ig növeltem, az adszorbeált festék koncentráció mintegy 32 %-kal nőtt. Az ennél nagyobb dózis már kisebb festék megkötést eredményezett, 2 g kitozán esetén az oldat festéktartalmának csupán 33 %-át sikerült eltávolítani. Hasonló tapasztalatokat írtak le MURYETI és munkatársai (2015) is, akik a kitozán adszorpciós tulajdonságát ugyanezen festék pigmenten tanulmányozták. Esetükben az 1,5 g kitozán alkalmazása a festék közel 72 %-át adszorbeálta, viszont 2 g kitozánnal a megkötési hatékonyság szintén csökkent. Ennek valószínűsíthető oka az, hogy a növelt dózis mellett rázatott kitozán biopolimerek egymással gyakrabban ütköztek, ami a

viszonylag gyenge adszorpciós kötések gyorsabb felszakadását (deszorpció) váltotta ki. A glutáraldehiddel keresztkötött kitozánál a maximálisan adszorbeált festék koncentráció a módosított kitozánéval, 1 g dózis esetén, ugyan megegyezett. A térhálósított szerkezetnek köszönhetően a mechanikai hatásokkal szemben nagyobb stabilitást mutatott, ebből adódóan dózisének növelésével az adszorbeált festék koncentráció nem csökkent. (SHI *et al.*, 2017). A Ca-alginát gélyöngyökön rögzített kitozán az oldatban lévő festék pigmenteknek 76 %-át távolította el, 1,5 g dózis esetén.

Az adszorbeált festék koncentrációk alakulására a tartózkodási idő növelése is kihatott (**30B. ábra**). Az 1 g kitozán a 15 perces kezelést követően a festékek 51 %-át adszorbeálta, azonban az ennél hosszabb időn át tartó rázatás szintén a festék pigmentek leválásához vezetett. A 30 perces kezelést követően a megkötési hatékonyság csupán 20 % volt. A kitozánal azonos dózisban használt keresztkötött kitozán a rázatás 5. percében a festék 45 %-át adszorbeálta, ami ezt követően számottevően nem növekedett. KAMARI és munkatársai (2009) az etilén-glikol adalékkal keresztkötött kitozán alkalmazásával intenzíven növelni tudták az Acid Red 37 (AR 37) és Acid Blue 27 (AB 25) festék megkötésének hatékonyságát, azonban a kezelés több, mint 2 órán át tartott. A kísérletekbe bevont adszorbensek közül csak a Ca-alginát gélyöngyök esetén tapasztaltam a 30 perces rázatást követően az adszorpciós határfok további növekedését. A modell oldat festék tartalma pedig 15 ppm alatt volt. XU és munkatársai (2008) amónium-szulfát oldatban kezelt, porózus, kitozán alapú hidrogél gyöngyökkel rendkívüli, 7-14-szer nagyobb adszorpciós kapacitást értek el, a kontrollként használt kitozánal szemben, az Acid Orange 7 (AO 7) és Acid Red 18 (AR 18) festék pigmentek megkötésénél, 22 °C-on és pH=8,2 értéken.

Az előző kezelési hőmérséklet növelésével (30 °C-ról 35 °C-ra) a kitozán esetén 10 %-kal, a Ca-alginát gyöngyökön rögzített kitozán esetén pedig 2 %-kal volt magasabb adszorpciós hatékonyság (**30C. ábra**). A hőmérséklet további növelése az adszorpciós kötőerők stabilitását csökkentette. Mind a három adszorbens pH=6,5 értéken érte el a maximális festék eltávolítást (**30D. ábra**). A környezet savanyításával az eltávolított festék koncentráció csökkenését tapasztaltam. A pH=3,5 értéken a kitozán csak 21 ppm, a két módosított kitozán pedig 39-41 ppm festék pigmentet adszorbeált.

4.2.1.5 *Papír mintákon lévő festék eltávolítása*

Megvizsgáltam a nyomtatott papír minták előkezelését (tinta eltávolítását) Ca-alginát gyöngyökön rögzített kitozán alkalmazásával, valamint a kezelt minták enzimes bontását. Az alábbi **13. táblázat** az eltávolított tinta százalékos értékeit, az enzimes hidrolízis szénhidrát hozamait tartalmazza.

13. táblázat: Különböző adszorbens mennyiségek mellett, a tintaeltávolítás és az enzimes hidrolízis hatékonyságának értékei

Adszorbens, %	Y tinta, %	Y szénhidrát, %	Y glükóz, %
1	42	16	3
2	55	32	12
5	77	46	16
10	86	65	23

Az enzimes hidrolízishez celluláz (2100 U/g) és amiloglükozidáz (320 U/g) aktivitású ipari enzimek készítmények keverékét alkalmaztam. Az enzimes hidrolízis során 10 % (m/v)-os mintákat 24 órán át, pH=5,5 értéken, 55 °C-on és 220 rpm mellett rázattam.

*Y szénhidrát: elméleti szénhidrát hozam szerint számolt százalékos érték

** Y glükóz: az oldott szénhidráttartalom szerint számolt százalékos értéke

Azt tapasztaltam, hogy az adszorbens mennyiségének növelésével a maximálisan adszorbeált festék koncentráció minden esetben meghaladta a 40 %-ot. Az 5 % (m/v) és a 10 % (m/v) adszorbens dózis mellett a megkötési hatékonyság 77-86 % között alakult. A két utóbbi esetről az előkezelt rostok hidrolízisével az oldott szénhidrátok az elméleti hozam 46 %-át és 65 %-át tették ki. A glükóz hozama 16-23 % volt.

Ez azzal magyarázható, hogy a rostokon lévő nem adszorbeált festék pigmentek, valamint az egyéb nemkívánatos komponensek az enzimek aktivitását csökkenthetik. Továbbá, ezen inhibitorokat az enzimek a rostok hidrolízisével is leválasztották, ami időben előrehaladva szintén erősítette az enzimek inaktíválódásának mértékét.

4.2.2 A papír hidrolizátumok alkoholos erjesztése

Munkámban a 10 % (m/v)-os Ca-alginát gyöngyökön rögzített kitozánnal kezelt és enzimesen bontott hidrolizátumok alkoholos erjesztését mono- és vegyes kultúrák alkalmazásával valósítottam meg.

4.2.2.1 Néhány élesztő monokultúra hatása az etanol koncentráció alakulására

E kísérleteimnél az élesztők szelektálása a kezelt rostok hidrolizátumainak erjesztését követően mért etanoltartalom szerint történt. A monokultúrák alkalmazásával a maximális etanol koncentrációkat és az etanol konverziók százalékos értékeit a **14. táblázat** tartalmazza.

14. táblázat: Az élesztő monokultúrákkal elért etanol koncentráció és a konverzió hatékonysága irodai papír* és kítőzánnal kezelt papír minta esetén**

Élesztő törzs	Cefre1*		Cefre 2**	
	Etanol v/v %	Y etanol, %	Etanol v/v %	Y etanol, %
<i>L. thermotolerans</i> Y.00702	1,2	37	0,8	25
<i>L. thermotolerans</i> Y.00715	1,2	37	0,9	28
<i>L. thermotolerans</i> Y.00775	1,8	55	1,2	37
<i>L. thermotolerans</i> Y.00798	0,8	25	0,4	12
<i>L. thermotolerans</i> Y.00873	1,4	43	1,0	31
<i>L. thermotolerans</i> Y.01118	1,3	40	0,8	25
<i>S. cerevisiae</i> Levuline Fb	2,3	71	1,1	49

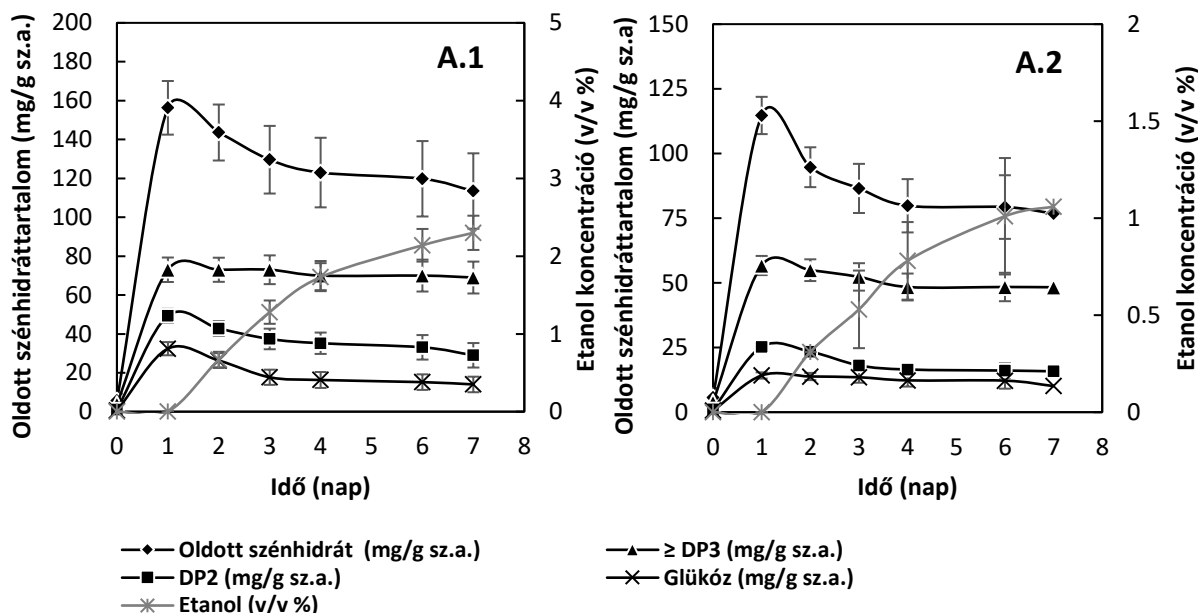
Az enzimes hidrolízis 55 °C-on, pH=5,5 értéken, 220 rpm rázatás mellett 24 órán át, az etanolfementáció 30 °C-on, pH=4 értéken, 6 napon át tartott.

Megállapítható, hogy a vizsgált élesztő törzseket mind a két papír hidrolizátumnál eltérő etanol termelés jellemezte. Továbbá, az etanol konverzió hatásfoka az irodai papír hidrolizátumoknál (25-71 %) mutatott nagyobb értékeket. E kezeletlen, kontroll mintáknál a *Lanchanea* törzsek alkalmazásával elért etanol koncentrációk nagyrészt 1,2 % (v/v) és 1,8 % (v/v) között alakultak. Kivételt képez a *L. thermotolerans* Y.00798 törzs, ahol az etanol koncentráció 1 % (v/v) alatt volt. A kezelt papír cefréknél megfigyelhető, hogy az etanolhozam a *L. thermotolerans* Y.00775 törzs esetén 18 %-kal, míg a *L. thermotolerans* Y.00715 törzsnél csupán 9 %-kal volt kisebb, a kezeletlen mintákéval szemben. A cefrék etanoltartalma ekkor 0,8 % (v/v) és 1,2 % (v/v) között volt. Ennek magyarázata, hogy a rostok előkezelését követően a rostokon maradt festék- és egyéb szennyezőanyagok nem csupán az enzimek aktivitását, de az élesztő sejtek etanol termelését is csökkentették, ami azonban az inhibitorokkal szemben mutatott tolerancia miatt az erjesztő képességben különbségeket okozott.

A *S. cerevisiae* élesztő kultúra a kezeletlen cefre redukáló cukortartalmának 71 %-át konvertálta etanollá, ami már 2 % (v/v)-nál nagyobb etanoltartalmat (2,3 %, v/v) eredményezett. Megfigyelhető, hogy az élesztő a kezelt papír mintáknál ugyan szintén kisebb erjesztő képességet mutatott, azonban az inhibitorokat a *Lanchanea* élesztőknél már jobban tolerálta. A cefre etanol tartalma 1,1 % (v/v) volt, az etanolkonverzió hatékonysága 50 % alá csökkent. LAKSHMI és RAJESWARI (2016) kutatásaik során hasonló erjesztési dinamikáról számolt be ugyanezen élesztő alkalmazásával biológiai úton előkezelt újságpapír keverék hidrolizátumon. A kísérleteiknél az 5 % (m/v) és 7,5 % (m/v) közötti szubsztrátum koncentráció mellett a 6. napon 1 % (v/v)-os és 1,5 % (v/v)-os etanol koncentrációt sikerült elérni.

4.2.2.2 Különböző erjesztési technikák összehasonlítása

A munkámban két fermentációs technikát, a szeparált cukrosítást és fermentációt (SHF) valamint szimultán cukrosítást és fermentációt (SSF) vizsgáltam a *S. cerevisiae* élesztő alkalmazásával.

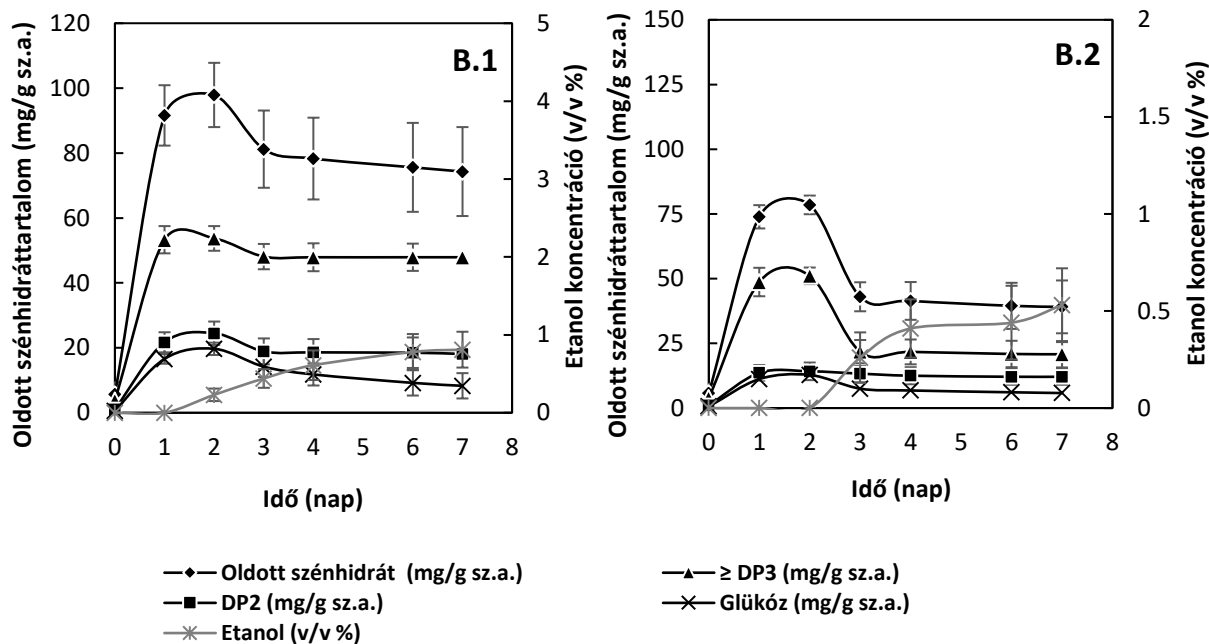


31. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* élesztő erjesztési profiljai szeparált enzimes hidrolízis és alkoholfementáció esetén

Jelmagyarázat: A.1.: irodai papír minta, A.2.: kitozánnal kezelt papír keverék

Az enzimes hidrolízis 55 °C-on, pH=5,5 értéken, 220 rpm rázatás mellett 24 órán át, az etanolfementáció 30 °C-on, pH=4 értéken, 6 napon át tartott.

Az erjesztési profilok analízisével megállapítható, hogy a hagyományos, elkülönített hidrolízis és etanolfermentáció, mind az enzimeknek, mind az élesztőnek kedvező környezeti feltételeket biztosított a szénhidrát konverzióhoz (31. ábra). A kontroll, kezeletlen irodai papír enzimes hidrolízisével a szénhidrátok mintegy 18 %-a került oldatba, aminek több, mint felét a redukáló cukrok (52 %) tették ki. Az élesztő e cukroknak közel 70 %-át hasznosította. Megfigyelhető, hogy az erjesztés során a papír cefrében mért etanol koncentráció azonban lassan nőtt, ami maximális értékét, 2,3 % (v/v)-ot, az erjesztés végén érte el. Ettől eltérően alakult a kezelt papír mintáknál az erjesztés menete. Az enzimes kezelést követően hidrolizátumban közel 48-52 %-kal kevesebb redukáló cukrot mértem. Megfigyelhető, hogy e cukrok erjesztésének dinamikája a 3. napon lassult le, amit követően az etanol koncentráció számottevő növekedést már nem mutatott. Az erjesztés végén az etanol koncentráció csupán 1,6 % (v/v) volt.



32. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* élesztő erjesztési profiljai szimultán enzimes hidrolízis és alkoholférmenciáció esetén

Jelmagyarázat: **B.1.:** irodai papír minta, **B.2.:** kitozánnal kezelt papír keverék
 A szimultán cukrosítás és erjesztés 30 °C-on, pH=4 értéken, 6 napon át tartott.

A szimultán cukrosítási és erjesztési technika alkalmazásával mindkét papír cefre etanol tartalma messze elmaradt a várható elméleti hozamtól, amit az enzimek számára szuboptimális hőmérséklet (30 °C) és pH (pH=4) okozhatott (**32. ábra**). Az élesztő a kezeletlen, kontroll mintánál az 24. órát követően kezdte el az etanol termelését, amit a kezelt cefre esetén csak a 48. órától tapasztaltam. SANGKHARAK (2011) ettől eltérő eredményeket közölt. Az általa vizsgált *S. cerevisiae* TISTR 5040 törzs, 10 % (m/v) szubsztrátum koncentráció mellett, már az erjesztés 36. órájában 21 %-os etanolhozamot ért el. ZHANG és munkatársai (2010) kutatásai során a rekombináns *S. cerevisiae* RWB222 törzs, ugyanezen szubsztrátum koncentrációnál, 100 óra alatt 40 %-os etanolhozamot ért el. E technika alkalmazásával az erjesztési kísérleteim végén mért etanol koncentráció a kontroll cefrénél több, mint kétszeresére (0,8 %, v/v), az enzimesen kezelt cefre esetén több mint háromszorosára (0,5 %, v/v) csökkent. Az etanolhozam ekkor 13 % és 24 % volt.

4.2.2.3 Ko-fermentációs erjesztési kísérletek

Munkám során megvizsgáltam az élesztő-élesztő, valamint élesztő-baktérium kultúrával történő ko-fermentáció erjesztési profiljait. A *S. cerevisiae* élesztő mellett a *L. thermotolerans* Y.00775 élesztő törzset, valamint a *Z. mobilis* baktérium törzset alkalmaztam szeparált enzimes hidrolízis és az etanolfermentáció technikával.

15. táblázat: A vegyes kultúrákkal elért etanol koncentráció és a konverzió hatékonysága irodai papír* és kitozánnal kezelt papír minta esetén**

Erjesztési kísérlet	Cefre 1*		Cefre 2**	
	<i>Etanol v/v %</i>	<i>Y etanol, %</i>	<i>Etanol v/v %</i>	<i>Y etanol, %</i>
élesztő-élesztő	2,7	77	1,2	78
élesztő-baktérium	2,2	63	1,3	83

Az enzimes hidrolízis 55 °C-on, pH=5 értéken, 220 rpm rázatás mellett 24 órán át, az etanolfementáció 30 °C-on, pH=4 értéken, 6 napon át tartott.

Az elért eredményeket tekintve, az élesztő-élesztő kultúra alkalmazásával a redukáló cukrok közel 77 %-a alakult át etanollá, ami 2,7 % (v/v) etanolt eredményezett a kezeletlen, kontroll minta esetén. A kezelt cefre etanol tartalma csupán 1,2 % (v/v) volt, azonban a cukrok etanollá konvertálása közel hasonló mértékben (78 %) történt.

Az élesztő-baktérium kultúra alkalmazásával mindkét cefrében mért etanol koncentráció ennél kisebb volt. A kezeletlen, kontroll minta erjesztésével 2,2 % (v/v) maximális etanol tartamat mértem, ami a kezelt cefréknél 1,3 % (v/v) volt.

4.3 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Új mikrobiális konzorciumot alakítottam ki a komposztból izolálható korhadást okozó, mezofil gombákból az *Aspergillus niger* F.00632, a *Penicillium chrysogenum* F.00814 és a *Trichoderma viride* F.00795 törzs társításával. Megállapítottam, hogy az általam kialakított konzorcium alkalmas a búzakorpa szubsztrátum biológiai előkezeléséhez.
2. Optimáltam az általam kialakított gomba konzorcium működését a búzakorpa szubsztrátumnál a maximális oldatba vihető szénhidrát tartalomra törekedve. Az optimális biológiai előkezelési paraméterei a következők: 30 °C, 5:1 a búzakorpa és a citrát-foszfát puffer aránya, pH=5,0, 10⁷ konídium/g szubsztrátum (megoszlása: 60 % *Aspergillus niger* F.00632 törzs, 25 % *Penicillium chrysogenum* F.00814 törzs és 15 % *Trichoderma viride* F.00795 törzs). Ebben az esetben akár 3 napos időtartam alatt a búzakorpában lévő szénhidrát tartalom 63 % -a átvihető az oldatba.
3. Kísérleti úton bizonyítottam, hogy a biológiailag előkezelt búzakorpánál az egy lépéses enzimes szénhidrát konverzió kereskedelmi celluláz (*T. reesei*, 2100 U/g), cellobiáz (*A. niger*, 780 U/g) és xilanáz (*T. lanuginosus*, 7000 U/g) enzimek készítmények (55 °C, pH=5,5, 220 rpm rázatási sebesség, 24 óra) alkalmazásával a glükóz kihozatal több, mint négyszeresére is növelhető.
4. Bebizonyítottam, hogy a Ca-alginát gélyöngyökön rögzített kitozán alkalmas a nyomtatott papíron lévő festékanyagok adszorpciójára. Carbon Black festék pigmenteket tartalmazó modell oldat (100 ppm) alkalmazásával meghatároztam a maximális adszorpciós kapacitását és az optimális technológiai paramétereket, amelyek a következők: 1,5 g bioszorbens, pH=6-6,5, 30-35 °C, 30 perc tartózkodási idő. E módosított kitozánnal akár 80-85 % rögzítési hatékonyság is elérhető.
5. Új cefrészési technológiát dolgoztam ki a papír hulladékok etanol célú hasznosítására. A Ca-alginát gyöngyökön rögzített kitozánnal történő előkezelést követő enzimes hidrolízisnél a kereskedelmi celluláz (*T. reesei*, 2100 U/g) és amiloglükozidáz (*A. niger*, 320 U/g) enzimek készítmények alkalmazásával (50 °C, pH=5,5, 24 óra) az elméleti szénhidráthozamnak a 65 % -a érhető el.

6. Új ko-fermentációs technológiát dolgoztam ki a biológiailag előkezelt búzakorpa hidrolizátum alkoholos erjesztésére. Az etanolfermentáció a szárított *Saccharomyces cerevisiae* (Levuline Fb) és *Kluyveromyces marxianus* Y.00959 élesztő 1:1 arányával (10 %, m/v) indítandó, majd a 3. napon célszerű a *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* baktérium kultúra (10 %, m/v) inokulálása. E technikával 20 % (m/v) redukáló cukortartalom esetén 7,6 % (v/v) etanol koncentráció érhető el, 30 °C-on, 7 napos erjesztést követően.

5 ÖSSZEFOGLALÁS

Az erdészet, a mezőgazdaság és más ipari ágazatok tevékenységei során évente nagy mennyiségben termelődő növényi maradványok, melléktermékek energetikai célú hasznosítása egy lehetséges megoldást kínál az energiatermelés biztosításához, a primer energiahordozók felhasználásának mérsékléséhez, fenntartható hulladékgazdálkodáshoz, valamint a környezet szennyezés csökkentéséhez. Az elmúlt években végzett kutató-fejlesztő munkák eredményeképpen másodgenerációs bioetanol előállítási technológiát világszerte már néhány kísérleti üzemben alkalmaznak, azonban kereskedelmi szinten igazán nagy áttörést nem sikerült elérni.

Munkám során céloom volt két, összetételében és szerkezetében eltérő növényi eredetű biomassza, a búza malomipari feldolgozása során keletkező búzakorpa, valamint a papírhulladékok etanol célú hasznosításának modellezése, illetve a kritikus technológiai műveletek hatékonyságának fokozásával az elérhető cukor- és etanolhozam növelése.

A búzakorpa alapon történt etanol előállításához elsőként a biológiai előkezelés módszerét kívántam kidolgozni. Összesen 29, korhadást okozó fonalas gomba törzs és 6 élesztőgomba törzs biodegradációs teljesítményét, vizsgáltam csökkentett szabad víztartalom esetén. Az oldatba átvihető szénhidrátok mennyisége és összetétele (mono-, di-, tri- és oligoszacharidok) fajonként eltérő mintázatot mutatott, ami a celluláz és egyéb hidrolitikus, valamint az oxidatív enzimek aktivitásbeni különbözőségére, továbbá azok hiányosságára utal. A vizsgált törzsek közül a leghatékonyabbnak a *Penicillium* törzsek bizonyultak, esetükben az elméleti szénhidrát hozam 20-24 %-nak adódott, azokat sorrendben az *Aspergillus*, a *Trichoderma*, a *Mucor*, a *Rhizopus*, a *Phanerochaete*, valamint a *Candida* és *Pichia* nemzetség törzsei követték. A szelektálási munka eredményeként 6 törzset: az *A. brasiliensis* F.00892, az *A. niger* F.00632, az *A. wentii* F.00167, a *P. chrysogenum* F.00814, a *P. granulatum* F.00913 és a *T. viride* F.00795 törzset emeltem ki, amelyeket a továbbiakban a konzorciális vizsgálatoknál alkalmaztam. A 18 különböző, 2 és 3 tagú konzorcium eredményei bizonyították, hogy a törzsek közötti szinergens kölcsönhatás eredményeként nagyobb oldható szénhidrát hozam érhető el, mint a törzsek egyedi alkalmazásával. Megállapítottam, hogy az *A. niger* F.00632, a *P. chrysogenum* F.00814. és a *T. viride* F.00795 törzsek azonos arányú társítása kiemelkedően nagy szénhidrát konverziót eredményez (418 mg/g), az elméleti hozamnak 50 %-a oldatba került. A továbbiakban a búzakorpából kinyerhető szénhidrát tartalom növeléséhez a konzorcium bontási mechanizmusát meghatározó környezeti tényezők hatását vizsgáltam. A működési paraméterek optimalizálásával 67 %-os (588 mg/g sz. búzakorpa) biokonverziós hatékonyságot

értem el a 3 napos előkezelést követően: 30 °C-on, pH=5,0 értéken, 10⁷/g szubsztrátum bevitt konídium szám (megoszlása: 60 % *A. niger* F.00632, 25 % *P. chrysogenum* F.00814 és 15 % *T. viride* F.00795) valamint citrát-foszfát puffer és búzakorpa 5:1 aránya esetén.

A biológiailag előkezelt búzakorpa enzimes bonthatóságának vizsgálatánál megállapítottam, hogy az általam használt kereskedelmi enzimek dózisének növelése 55 °C-on, pH=5,5 értéken, 220 rpm rázatási sebességen 24 órás reakciót követően kedvezően hatott a szénhidrátok monomerekké történő bontására. Meghatároztam, hogy a celluláz (2100 U/g), a cellobiáz (780 U/g) és a xilanáz (7000 U/g) enzimek keverékeként való alkalmazásával technológiai szempontból ígéretes glükóz hozam, az elméleti 53 %-a (454,5 mg/g búzakorpa) érhető el.

Feltérképeztem néhány etanol termelő mikroorganizmus szénhidrát hasznosítását és erjesztési tevékenységét búzakorpa hidrolizátumokon. Mind a szárított *Saccharomyces cerevisiae* (Levuline Fb) és a *Kluyveromyces marxianus* Y.00959 élesztő törzs, valamint a *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* B.01327^T baktérium törzs az enzimesen nem kezelt, cefrék (5-7 %, m/v redukáló cukortartalom) erjesztésével hasonló mértékű, 2,4 % (v/v) és 2,8 % (v/v) közötti, etanol termelést mutatott 30 °C-on. A vizsgált törzseknél a baktérium nagyobb glükóz toleranciát mutatott az enzimesen kezelt cefrék esetén. E baktériummal a 15-20 % (m/v) cefrékben 4,6 % (v/v) és 5,1 % (v/v) közötti etanol koncentrációkat mértem. A ko-fermentációs kísérletek eredményeként meghatároztam, hogy a két élesztő szimultán alkalmazása és emellett az időben eltolva rátáplált baktérium kultúra intenzívebb erjesztési dinamikát biztosít. E technikával sikerült elérnem 7,6 % (v/v) etanol tartalmat, továbbá a cefrékben visszamaradt erjeszhető cukrok mennyisége is lényegesen csökkent.

A papírhulladékok etanollá történő konvertálásához előkészítési műveleteket végeztem a festékek minél hatásosabb eltávolításának eléréséhez. E célból különböző fiziko-kémiai módszereket kemikáliák alkalmazásával és anélkül is vizsgáltam. A technikák közül hatásosabb rost tisztulást értem el alkoholos flotálással, a mosási és besugárzásos technikákkal szemben, ami az enzimes konverzió hatásfokában is mutatkozott. Eredményeim arra mutattak rá, hogy a szerves oldószerként etanol alkalmazása a festékmentesítés hatékonyságát 25 % (v/v) koncentrációban már jelentősen növelte. Meghatároztam az alkoholos flotációs cella működési paramétereit rostsuszpenzió esetén: 50 °C, 30 perc, 25 % (v/v) etanol koncentráció, amit követően a celluláz (2100 U/g) és amiloglükozidáz (320 U/g) enzimek keverék 65%-os szénhidrát hozamot mutatott 55 °C-on, pH=5,5 értéken, 220 rpm rázatási sebességen 24 órát követően. Az adszorpciós technikák körében a kitozán bioszorbens, valamint utóbbi két módosított változatát, a glutáraldiheddel térhálósított kitozánt és a Ca-alginát gélyöngyökön rögzített kitozán alkalmazhatóságát is

vizsgáltam. Mind a három mutatott adszorpciós kapacitást modell festék oldatokban, azonban a vizsgálati körülmények között eltérő stabilitással voltak a Carbon Black festék pigmentek megkötése iránt. A működési paraméterek optimalizálásával meghatároztam, hogy 100 ppm festék koncentráció a Ca-alginát gélgyöngyökön rögzített kitozán igen hatásos (80-86 %) megkötést eredményez 1,5 g dózisban az alábbi paraméterek között: 30-35 °C, pH=6-6,5, 220 rpm rázatási sebesség és 30 perc tartózkodási időtartam. Ezen adszorpciós technikát adaptálva a papír rostok előkezeléséhez megállapítottam, hogy a rostsuszpenzió 10 %-ával azonos bioszorbens dózis használata mellett ugyanazon festékanyagok 65 % hatékonysággal távolíthatóak el.

Az előkezelt rostsuszpenzió enzimes hidrolízisének a celluláz (2100 U/g) és amiloglükozidáz (320 U/g) enzimkeverékként történő alkalmazásával az elméleti glükóz hozam 23 %-át értem el.

Az erjesztési kísérleteknél az élesztők etanol produktivitását elkülönített, hagyományos alkoholos erjesztéssel vizsgáltam. A vizsgált élesztők esetén a szárított *Saccharomyces cerevisiae* (Levuline Fb) élesztő kismértékben több etanolt termelt újságpapír keverék hidrolizátumon, valamint a kontrollként használt irodai papír hidrolizátumon is, mint a *Lanchancea* élesztő törzsek. Ezen élesztő alkalmazásával összehasonlítottam két erjesztési technikának, az előzőekben említett elkülönített etanolfermentációnak, valamint a szimultán cukrosítási és erjesztési technikának a hatékonyságát is. Az etanoltermelés egyik esetben sem érte el a gazdaságos szintet. A ko-fermentációs erjesztésekkel a cukrok hasznosítását részben sikerült növelnem, azonban az etanol hozam az amúgy is alacsony glükóz koncentráció miatt igen csekély növekedést mutatott. Az etanol koncentráció mind a szárított élesztő és a *Lanchancea thermotolerans* Y.00775 élesztő törzs, mind a szárított élesztő és a *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* B.01327^T törzs azonos arányú (1:1) társításával újságpapír keverék hidrolizátumon 1,2 % (v/v) és 1,3 % (v/v), irodai papír hidrolizátumon pedig 2,2 % (v/v) és 2,7 % (v/v) etanolt termelt.

Összességében elmondható, hogy a kutatómunkám során elért eredmények ígéretesek voltak, azok kellő ismeretet szolgáltatnak a lignocellulózt tartalmazó növényi maradványok etanol célú hasznosításának további mérnöki fejlesztéséhez.

6 SUMMARY

Lignocellulosic materials, i.e crop residues, food processing wastes, forestry residues etc., are currently receiving much more attention as abundant and available renewable energy sources. Plant-based bioenergy has potential to partially replace fossil fuels and secure the energy supply as well as reduce the environmental pollution. As a result of development activities in recent years, a number of pilot-scale technologies are being used in second generation bioethanol production, however industrial application is still limited.

The main objective was to develop new strategies for second generation ethanol production based on waste products – such as wheat bran and municipal paper wastes – as well as make sustainable the crucial process steps of the pretreatment methods more efficient, increasing ethanol and sugar yield.

In the work, the biological-based pretreatment of wheat bran was examined. A total of 29 filamentous fungal strains and 6 yeast strains were tested for their ability to degrade highly resistant and recalcitrant lignocellulosic structure under solid-state conditions. Overall, the quantity and the composition of the water-soluble degradation products (mono-, di- and polysaccharides) were different in each microbial pretreatment setup, and was characteristic to the strains that was used. This could be due to the different cellulase and other hydrolytic enzyme activities and the differences or absence of oxidative enzyme activities. Strains of *Penicillium* proved to be more efficient, 25 % of the theoretical sugar yield was achieved, followed by strains of *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Phanerochaeta*, *Candida* and *Pichia*, respectively. For further experiments, the following strains based on the preliminary screening: *A. brasiliensis* F.00892, *A. niger* F.00632, *A. wentii* F.00167, *P. chrysogenum* F.00814, *P. granulatum* F.00913 and *T. viride* F.00795 were selected. These strains were used for the consortia experiments. A total of 18 fungal consortia comprising of two- and three strains led to an increase in the available carbohydrate content thanks to their synergistic interaction. With the simultaneous use of *A. niger* F.00632, *P. chrysogenum* F.00814 and *T. viride* F.00795 in equal ratios a total amount of 418 mg/g carbohydrates (about 50 % of theoretical yield) were achieved. To improve the conversion efficiency of the fungal consortium, operational parameters were assessed including initial conidium ratio, pH, moisture content and inoculation techniques. The best result in terms of biological pretreatment was observed after 3 days using microbes with an initial concentration of 107 conidium per gram dry substrate (gds) in a ratio of *A. niger* F.00632 (60 %), *P. chrysogenum* F.00814 (25 %) and *T. viride* F.00795 (15 %) at 30 °C, pH 5.5 and a moisture ratio of 5:1.

Enzymatic saccharification profiles of microbially pretreated wheat bran showed a high increase in glucose concentration (454,5 mg/g), which is equal with 53 % of the theoretical glucose yield, while applying the mixture of commercial enzyme preparations: cellulase (2100 U/g), cellobiase (780 U/g) and xylanase (7000 U/g) at 50 °C, pH 5.5, with an agitation speed of 220 rpm for 24 hours.

Finally, ethanol-producing microbes were tested for their ability to convert fermentable sugars to ethanol at various sugar concentration (up to 20 %) in fermentation media containing treated and untreated (as control) wheat bran. When comparing *Saccharomyces cerevisiae* (Levuline Fb type) to *Kluyveromyces marxianus* Y.00959 and *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* B.01327^T, ethanol yield was about 2.4 % (v/v) and 2.8 % (v/v) in untreated fermentation medium at 30 °C. As for the treated samples, the 15-20 % glucose content had a beneficial effect on the ethanol production, and the bacteria strain showed a greater glucose and ethanol tolerance compared to the untreated samples. Fermentation of pretreated media with a starting glucose concentration of 15-20 % (w/v), an ethanol concentration of 4.6 % and 5.1 % (v/v) was observed, and it produced less biomass than with only yeasts. A further increase in ethanol production was found with the mixed culture of two yeast strains in equal ratios. In searching for the best fermentation process, simultaneous application of two yeast strains with an additional inoculation step of the bacteria at 48 hours showed 7.6 % (v/v) of ethanol.

In the second part of my thesis work, my experiments focused on testing various deinking operations to remove ink pigments from municipal paper wastes, which can be used for saccharification and fermentation. According to the results obtained from chemical and physico-chemical treatments, application of ethyl alcohol in a concentration of 25 % (v/v) as an organic solvent in laboratory-scale flotation turned out to be more effective at deinking than washing with a number of other chemicals and irradiation techniques. After the flotation deinking of 1% (w/v) consistency mixed waste papers at 50 °C for 30 minutes, more than 40 % carbohydrate content (up to 56 %) yield was achieved with a combination of commercial enzymes: cellulase (2100 U/g) and glucoamylase (320 U/g) incubated at 50 °C, pH 5.5 and 220 rpm of agitation for 24 hours. As natural biosorbents, chitosan and its two derivatives: cross-linked chitosan with glutaraldehyde and chitosan-coated Ca-alginate beads (ChiALG) showed adsorption properties in the model solution containing 100 ppm of carbon black from HP laserjet ink cartridges. However adsorption capacities and interactions between biosorbents and ink pigments significantly changed during their application. ChiALG was the most effective adsorbent with more than 80 % of ink removal using 1.5 g of adsorbent at 30-35 °C and pH 6-6.5 with constant shaking at 220 rpm for 30 minutes. Adapting these

adsorption techniques for the pretreatment of mixed paper waste treatment with ChiALG at the same operational parameters, except with a dosage equal to 10 %, showed similar ink removal than with the model solutions.

Enzymatic hydrolysis performed with a mixture of commercial cellulase (2100 U/g) and glucoamylase (320 U/g) enzyme preparation led to 23 % of the theoretical glucose content. Besides a slight increase in the saccharification rate, the glucose to ethanol conversion was very low. Nevertheless, more ethanol was produced with *S. cerevisiae* (Levuline Fb type) on treated paper-based materials (mixed paper waste and office paper) than with the other yeast strains. Comparison of two fermentation processes - separated hydrolysis and fermentation (ShF) to simultaneous saccharification and fermentation (SSF) - using *S. cerevisiae* showed that the obtainable ethanol content was not economic. As a result of co-fermentation processes sugar consumption partially increased, but the ethanol yield only slightly increased (1.2-1.3 % v/v) with the combination of *S. cerevisiae* with *Lanchancea thermotolerans* Y.00775 and *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* B.01327^T (in equal ratio) on treated mixed paper waste, and a higher ethanol content (2.2-2.7 % v/v) was observed in treated office papers.

As a conclusion of the results described here, these new methodologies are very promising and can serve as a basis for further experiments to develop more economical lignocellulosic ethanol production from plant-based wastes.

MELLÉKLET

M1. IRODALOMJEGYZÉK

- ABBAS**, M.M., Craven, P.D., Spann, J.F., Witherow, W.K., West, E.A., Gallagher, D.L., Adrian, M.L., Fishman, G.J., Tankosic, D., LeClair, A., Sheldon, R., Thomas, E. (2003): Radiation pressure measurements on micron-size individual dust grains. *Journal of Geophysical Research* 108 (6): 2-10. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1029/2002JA009744>
- ABDEL-SATER** M., El-Said, H.M. (2001): Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 47 (1): 15-21. p. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00113-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00113-X)
- ADITIYA**, H.B., Mahlia, T.M.I., Chong, W.T., Sebayang, A.H. (2016): Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 47: 46-61. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- ALIZADEH**, H., Teymouri, F., Gilbert, T.I., and Dale, B. E. (2005): Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 124 (1): 1133-1141. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1385/ABAB:124:1-3:1133>
- ALVIRA**, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. (2010): Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* 101 (13): 4851-4861. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- AMOURI**, B., Gargouti, A.F. (2006): Characterization of novel β -glucosidase from a *Stachybotrys* strain. *Biochemical Engineering Journal* 32 (3): 191-197. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2006.09.022>
- AMUTHA**, R., Gunasekaran, P. (2001): Production of ethanol from liquefied cassava starch using co-immobilized cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92 (6): 560-564. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80316-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80316-9)
- ANDERSON**, P.J., McNeil, K., Watson, K. (1986): High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40 °C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Applied Environmental Microbiology* 51: 1314–1320. p.
- ANDERSON**, W.F., Akin, D.E. (2008): Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35 (5): 355-366. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-007-0291-8>
- ANDRIC**, P., Meyer, A.S., Jensen, P.A., Dam-Johansen, K. (2010): Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis. I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology Advances* 28 (3): 308-324. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.003>
- ANNADUZAMAN**, M. (2015): Chitosan biopolymer as an adsorbent for drinking water treatment - Investigation on arsenic and uranium. TRITA-LWR LIC-2015-02, 26. p.
- ANWAR**, Z., Gulfraz, M., Irshad, M. (2014): Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7: 163-173. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>
- ARORA**, D.S., Chander, M., Gill, P.K. (2002): Involvement of lignin peroxidase manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation* 50 (2): 115-120. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00064-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00064-1)
- ASHORI**, A., Harun, J., Zin, W., Yusoff, M.N.M. (2006): Enhancing dry-strength properties of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) paper through chitosan. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* 45 (1): 125-129. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03602550500373709>
- ASPINALL**, G. O., Begbie, R., McKay, J. E. (1962) The hemicelluloses of European larch (*Larix decidua*). Part II. The glucomannan component. *Journal of the Chemical Society* 214-219. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/JR962000021>

- ASOKAN**, A.A., Scobhitha, C., Hasini, D., Noronha, M.S. (2018): Microwave & sonification assisted pretreatment for the production of bio-ethanol from waste paper. *Asian Journal of Applied Science and Technology* 2 (2): 1089-1099. p.
- BAI** A. (2004): A bioetanol-előállítás gazdasági kérdései. A Debreceni Egyetem Agrártudományi Közleményei. *Acta Agraria Debreceniensis* 14: 30-38. p.
- BAJPAI**, P.K. (2010): Solving the problems of recycled fiber processing with enzymes. *BioResources* 5 (2): 1311-1325. p.
- BALAT**, M., Balat, H., Öz, C. (2008): Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science* 35 (5): 551-573. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2007.11.001>
- BALDRIN**, P. (2004): Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbial Ecology* 50 (3): 245-253. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsec.2004.07.005>
- BALLASTEROS**, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P. (2004): Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry* 39 (2): 1843-1848. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.011>
- BANAT**, I.M., Nigam, P., Marcant, R. (1992): Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45 °C az 50°C. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8 (3): 259-263. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01201874>
- BAO**, W., Renganathan, V. (1992): Cellobiose oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* enhances crystalline cellulose degradation by cellulases. *FEBS Letters* 302 (1): 77-80. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80289-S](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(92)80289-S)
- BARÓTFI** I (2000): Környezettechnika. Mezőgazda kiadó, Budapest, 982 p.
- BAYER**, E.A., Belaich, J.P., Shoham, Y., Lamed, R. (2004): The celulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology* 58 (1): 521-554. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.091022>
- BEAUGRAND**, J., Cronier, D., Thiebeau, P., Schreiber, L., Debeire, P., Chabbert, B. (2004): Structure, chemical composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (23): 7108-7117. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf049529w>
- BEHIN**, J., Vaden, SS. (2007): Effect of alkyl chain in alcohol deinking of recycled fibers by flotation process. *Colloids and Surfaces a Physicochemical and Engineering Aspects* 297 (1-3): 131-141. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.10.037>
- BENSAH**, E.C., Mensah, M. (2013): Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: Technologies and innovation. *International Journal of Chemical Engineering* 2013 (11): 21 p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/719607>
- BERLIN**, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S., Saddler, J.N. (2006): Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology* 125 (1): 198-209. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.021>
- BOBU**, E., Ciolacu, F., Anghel, N. (2002): Prevention of colloidal material accumulation in short circulation of paper machine. *Wochenblatt fur Papier Fabrikation* 130 (9): 576-583. p.
- BOLLÓK**, M., Réczey, K. (2000): Screening of different *Kluyveromyces* strains for simultaneous saccharification and fermentation. *Acta Alimentaria* 29: 59-70.
- BRACEY**, D., Holyoak, C.D., Nebe-von, G., Coote, P.J. (1998): Determination of the intracellular pH (pHi) of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of reduced-expression of the membrane H⁺-ATPase. *Journal of Microbiological Methods* 31 (3): 113-125. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(97\)00095-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(97)00095-X)
- BRODEUR**, G., Yau, E., Badal, K., Collier J, Ramachandran, K.B., Ramakrishnan, S. (2011): Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Research* 1-17. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/787532>
- BROWN**, R.C. (2003): Biorenewable resources: Engineering new products from agriculture. Iowa State Press, Ames, IA., 286. p.

- BUTTOWSKI, E.,** Tawongsa, W., Abdelmoula, A. (2014): The use of ethanol product from food waste hydrolysate by co-culture of *Zymomonas mobilis* and *Candida shehatae* under non-sterile situation. *Advances in Food Science and Technology* 2 (6): 225-231. p.
- BUZAŁA, K.P.,** Przybysz, P; Kalinowska, H; Derkowska, M. (2016): Effect of cellulases and xylanases on refining process and kraft pulp properties. *PloS one* 11 (8) DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0161575>
- BÜKI G.** (2010): Megújuló energiák hasznosítása. In. Lovasi R. (szerk.): *Köztestületi stratégiai programok*. Magyar Tudományos Akadémia, Budapest 82-85. p.
- CANILHA, L.,** Rodrigues, R.C.L.B., Antunes, F.A.F., Chandel, A.K., Milessi, T.S.D.S., Felipe, M.G.A., da Silva, S.S. (2013): Bioconversion of hemicellulose from sugarcane biomass into sustainable products. In: Chandel, A.K., ed. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass, Techniques, Applications and Commercialization*. Intech Open Access; 15-45. p.
- CARDONA, C.A.,** Sánchez, O.J. (2007): Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* 98 (12): 2415-2457. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.002>
- CARRÉ, B.,** Magnin, L., Galland, G., Vernac, Y. (2000): Deinking difficulties related to ink formulation, printing process, and type of paper. *Tappi Journal* 83 (6): 60.p.
- CEPI** (2011): *Unfold the Future: The Forest Fibre Industry - 250 Roadmap to a Low-carbon Bio-economy*. Confederation of European Paper Industries. Brussels, Belgium. 46 p.
- CEPI** (2016): *Key Statistics 2015 - European Pulp and Paper Industry*, Confederation of European Paper Industries, Brussels, Belgium. 32 p.
- CHANDRA, R.P.,** Bura, R., Mabee, W.E., Berlin, A., Pan, X., Saddler, J.N. (2007): Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 108: 67-93. p. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/10_2007_064
- CHATURVEDI, V.,** Verma, P. (2013): An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. *3 Biotech* 3 (5): 415-431. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-013-0167-8>
- CHENG, K.K.,** Cai, B.Y., Zhang, J.A., Ling, H.Z., Zhou, Y.J., Ge, J.P., Xu, J.M. (2008): Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal* 38 (1): 105-109. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2007.07.012>.
- CHERUBINI, F.** (2010): The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management* 51 (7): 1412-1421. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- CHI, Y.,** Hatakka, A., Majala, P. (2007): Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin degrading enzymes? *International Biodeterioration & Biodegradation* 59 (1): 32-39. p. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.06.025>
- CHU, D.Q.,** Zhang, J., Bao, J. (2012): Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of corn stover at high temperature and high solids loading by a thermotolerant strain *Saccharomyces cerevisiae* DQ1. *BioEnergy Research* 5:1020-1026. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-012-9219-x>
- CHUTANI, P.,** Sharma, K. (2015): Biochemical evaluation of xylanases from various filamentous fungi and their application for the deinking of ozone treated newspaper pulp. *Carbohydrate Polymers*, 127 (1): 54-63. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.053>.
- COUGHLAN, M.P.** (1985): Cellulases with comment on their production and application. In: Russell, G.E. (Szerk.): *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 3: 39-109. Intercept, Ponteland, Newcastle
- CRESPI, B.J.** (2001): The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution* 16 (4): 178-183. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02115-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02115-2)
- CRINI, G.,** Badot, P. (2007): Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Progress in Polymer Science* 33 (4): 399-447. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.11.001>

- CUI, Y., Dong, X., Tong, J., Liu, S. (2016):** Degradation of lignocellulosic components in un-pretreated vinegar residue using an artificially constructed fungal consortium. *Bioresources* 10 (2) DOI: <http://dx.doi.org/10.15376/biores.10.2.3434-3450>
- DAHNUM, D., Tasum, S.O., Triwahyuni, E., Nurdin, M., Abimanyu, H. (2015):** Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. 2nd International Conference on Sustainable Energy Engineering and Application, ICSEEA 2014, *Energy Procedia* 68: 107-116. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2015.03.238>
- DANIEL, G. (2003):** Microview of wood under degradation by bacteria and fungi. *ACS Symposium Series* 845 (4): 34-72.p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2003-0845.ch004>
- DASHTBAN, M., Schraft, H., Qin, W. (2009):** Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences* 5 (6): 578-595. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.5.578>
- DE LA HOZ, A., Díaz-Ortiz, A., Moreno, A. (2005):** Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chemical Society Reviews* 34 (2): 164-168. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/b411438h>
- DE OLIVEIRA, M.F., Saczk, A.A., Okumura, L.L., Stradiotto, N.R.. (2009):** Analytical methods employed at quality control of fuel ethanol. *Energy Fuels* 23 (10): 4852-4859. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ef900493k>
- DE SOUZA, M.M.M., Martins, D.A.B., da Silva, R., Gomes, E. (2012).** Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (3): 1062-1071. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838220120003000032>
- DE VRIES, R.P., Visser, J. (2001):** Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65 (4): 497-522. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001>
- DEMIRBAS, M.F., Balat, M., Balat, H. (2009):** Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. *Energy Conversion and Management* 50 (7): 1746-1760. p., DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2009.03.013>
- DÉNES K., Farkas Cs., Hoschke Á., Rezessy-Szabó J. (2013):** Bioethanol fermentation of Jerusalem artichoke using mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Acta Alimentaria* 42: 10-18. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AAlim.42.2013.Suppl.2>
- DODD, D., Cann, I.K.O. (2009):** Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy* 1: 2-17. p. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x>
- DONGHAI, S., Junshe, S., Ping, L., Yanping, L.Ü. (2006):** Effects of different pretreatment modes on the enzymatic digestibility of corn leaf and corn stalk. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 14 (6): 796- 801. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1004-9541\(07\)60014-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1004-9541(07)60014-7)
- DOS SANTOS, M.M., da Rosa, A.S., Dal'Boit, S., Mitchell, D.A., Krieger, N. (2004):** Thermal denaturation. is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? *Bioresource Technology* 93 (3): 261-268. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2003.11.007>
- DOS SANTOS, D.S., Camelo, A.C., Rodrigues, K.C., Carlos, L.C., Pereira N. (2010):** Ethanol production from sugarcane by *Zymomonas mobilis* using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process. *Applied Biochemical and Bioengineering* 162 (1-8): 93-105. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-009-8810-x>
- EBRINGEROVÁ, A, Hromadkova, Z., Heinze, T. (2005):** Hemicellulose. *Advances in Polymer Science* 186 (1): 1-67. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/b136816>
- EIADPUM, A. Limtong, S., Phisalaphong, M. (2012):** High-temperature ethanol fermentation by immobilized coculture of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114 (3): 325-329. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.04.004>
- ERDEI, B., Barta, Z., Sipos, B., Réczey, K., Galbe, M., Zacchi, G. (2010):** Ethanol production from mixtures of wheat straw and wheat meal. *Biotechnology for Biofuels*, 3: 16. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-3-16>.

- ERTAN, F., Balkan, B., Yarkin, Z. (2014):** Determination of the effects of initial glucose on the production of α -amylase from *Penicillium* sp. under solid-state and submerged fermentation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 28 (1): 96-101. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2014.901670>
- ERYASAR, K., Karasu-Yalcin, S. (2016):** Evaluation of some lignocellulosic byproducts of food industry for microbial xylitol production by *Candida tropicalis*. *3 Biotech* 6: 202. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-016-0521-8>
- FAUST, K., Raes, J. (2012):** Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology* 10 (8): 538-550. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2832>.
- FENG, Y.J., Yu, Y.L., Wang, C.W., Liu, J., Zheng, C. (2008):** Selection of microbial community with high cellulose-degradation ability and its characteristics. Second International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, ICBBE 2008, Shanghai, China, 4218-4221. p.
- FONSECA, G.G., Heinze, E., Wittmann, C., Gombert, A.K. (2008):** The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79 (3): 339-354. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1458-6>
- GALBE, M., Zacchi, G. (2007):** Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 108 (1): 41-65. p. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/10_2007_070
- GARCIA, O., Torres, A.L., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Diaz, P., Vidal, T. (2002):** Effect of cellulase-assisted refining on the properties of dried and never-dried eucalyptus pulp. *Cellulose* 9 (2): 115-125. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020191622764>
- GARCÍA-APARICIO, M.P., Ballesteros, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J. (2007):** Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 137-140 (1-12): 353-365. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-007-9064-0>
- GÁSPÁR, M., Kálmán, G., Réczey, K. (2007):** Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. *Process Biochemistry* 42 (7): 1135-1139. p. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.04.003>
- GOH, C.S., Tan, K.T., Lee, K.T., Bhatia, S. (2010):** Bio-ethanol from lignocelluloses: status, perspective and challenges in Malaysia. *Bioresource Technology* 101 (13): 4834-4841. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.080>
- GOSHIMA, T., Tsuji, M., Inoue, H., Yano, S., Hoshino, T., Matsushika, A. (2013):** Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77 (7): 1505-1510. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.130173>
- GÓGÖS Z. (2005):** Biomassza potenciál és hasznosítása. *Agrárágazat* 6:80-84.p.
- GUEVARA, C., Zambrano, M.M. (2006):** Sugarcane cellulose utilization by a defined microbial consortium, *FEMS Microbiology Letters* 255 (1): 52-58. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00050.x>
- GUNASEKARAN, P., Raj, K.C. (1999):** Ethanol fermentation technology - *Zymomonas mobilis*. *Current Science* 77 (1): 56-58. p.
- GUO, X., Zhou, J., Xiao, D. (2010):** Improves ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation. *Applied Biochemical and Engineering* 160 (2): 532-538. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8412-z>
- GUPTA, V. K., Potumarthi, R., O'Donovan, A., Kubicek, C. P., Sharma, G. D., Tuohy, M. G. (2014):** Chapter 2- Bioenergy research: an overview on technological developments and bioresources. 23-47. p. In: Gupta, V.G., Tuohy, M., Kubicek, C.P., Saddler, J., Xu F.(szerk.) *Bioenergy research: advances and applications*. Elsevier, Oxford, UK
- GUTIERREZ-CORREA, M., Portal, L., Moreno, P., Tengerdy, R.P. (1999):** Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 68 (2): 173-178. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00139-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00139-4)

- HA**, M.A., Apperley, D.C., Evans, B.W., Huxham, M., Jardine, W.G., Vietor, R.J., Reis, D., Vian, B., Jarvis, M.C. (1998): Fine structure in cellulose microfibrils: NMR evidence from onion and quince. *Plant Journal* 16 (2): 183-190. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00291.x>
- HADI**, A. (2013): Dye removal from colored textile wastewater using synthesized chitosan. *International Journal of Science and Technology* 2 (4): 359-364. p.
- HAHN-HÄGERDAL**, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G. (2006): Bioethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*. 24 (12): 549-556. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.10.004>
- HANCSÓK** J. (2004): Korszerű motor- és sugárhajtómű üzemanyagok III. Alternatív motorhajtóanyagok. Veszprém Egyetemi Kiadó, Veszprém
- HANCSÓK** J., Krár M., Kovács S., Boda L., Leveles L., Thernesz A. (2006): Bio-motorhajtóanyagok. Jelen és jövő. IX. Biomassza Konferencia. Sopron
- HAWKINS**, G.M., Doran-Peterson, J. (2011): A strain of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for fermentation of lignocellulosic biomass displays improved growth and fermentative ability in high solids concentrations and in the presence of inhibitory compounds. *Biotechnology and Biofuels* 4 (1): 49. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-4-49>.
- HIMMEL**, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D. (2007): Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuel production. *Science* 315 (5813): 804-807. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1137016>
- HO**, H.L., Hood, J.S. (2014): Optimisation of medium formulation and growth conditions for xylanase production by *Aspergillus brasiliensis* in submerged fermentation (SmF). *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development* 1: 102. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2376-0214.1000102>
- HOU**, Q., Ju, M., Li, Q., Chen, Y., Yang, Q. (2017): Pretreatment of lignocellulosic biomass with ionic liquids and ionic liquid-based solvent systems. *Molecules* 22 (3): 490. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22030490>.
- HOSSAIN**, K., Ismail, M.R., Saud, H.M.M., Habib, S.H. (2018): Use of lignocellulolytic microbial consortium and pH amendent on composting efficacy of rice straw. *Compost science & utilization* 21 (3-4) DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/1065657X.2013.842131>
- HOWELL**, J.A., Stuck, J.D. (1975): Kinetics of solka floc cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulase. *Biotechnology and Bioengineering*. 17 (6): 873-893. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260170608>
- HÖFFNER**, K., Bartin, P.I. (2014): Design of microbial consortia for industrial biotechnology. *Computer Aided Chemical Engineering* 34: 65-74. p. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63433-7.50008-0>
- HÖLKER**, U., Hofer, M., Lenz J. (2004): Biotechnological advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 175-186. p.
- HSU**, T.A. (1996): Pretreatment of biomass. 179-195. p. In: Wyman, C.E. (Szerk.): *Handbook on bioethanol: production and utilization*. Taylor & Francis, Washington, DC
- HU**, H.L., van den Brink, J., Gruben, B.S., Wösten, H.B., Gu, H.D., de Vries, R.P. (2011): Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *International Bioremediation & Biodegradation* 65 (1): 248-252. p. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.008>
- HUBBE**, M., Nazhad, M., Sánchez, C. (2010): Composting as a way to convert cellulosic biomass and organic waste into high-value soil amendments: a review. *BioResources* 5 (4): 2808-2854. p.
- HUBER**, P., Carré, B. (2012): Decolorization of process water in deinking mills and similar applications: a review. *BioResources* 7 (1): 1366-1382. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.15376/biores.7.1.1366-1382>
- IBARRA**, D., Monte, M.C., Blanco, A., Martinez, M.J. (2012): Enzymatic deinking of secondary fibers: cellulases/hemicellulases versus laccase-mediator system. *Journal of Industrial Microbiology* 39 (1): 1-9. p.

- IMAMOGLU, S.** (2006): Deinkability efficiency of waste office paper printed using a duplicating machine. *Journal of Applied Sciences* 6 (9): 2006-2009. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.3923/jas.2006.2006.2009>
- IOELOVICH, M.** (2014): Waste paper as promising feedstock for production of biofuel. *Journal of Scientific Research and Reports* 3 (7): 905-916. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.9734/JSRR/2014/8025>
- IRFAN, M., Syed, Q.** (2012): Partial purification and characterization of xylanase from *Trichoderma viride* produced under SSF. *International Journal of Applied Research in Natural Products* 5 (1): 7-11. p.
- ISIGKOR, F.H., Becer, C.R.** (2015) Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry* 256: 4497-4559. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C5PY00263J>
- ISMAIL, W., Braim, R.R., Ketuly, K.A., Arifin, Z.** (2012): Production of biocellulosic ethanol from wheat straw. *Acta Polytechnica* 52 (3): 28-34. p.
- JAKUCS E.** (1991): A gombák szerepe a cellulóz és lignin lebontásában. *Mikológiai Közlemény* 1-3: 13-28. p.
- JAYANT, M., Rashmi, J., Shailendra, M., Deepesh, Y.** (2011): Production of cellulase by different co-culture of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* from waste paper, cotton waste and bagasse. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 2 (2): 24-27. p.
- JENA, H., Halder, S.K., Soren, J.P., Takó M., Mondal, K.C.** (2016): Valorization of wheat bran for cost-effective production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* SKH2 and utilization of the enzyme cocktail for saccharification of lignocellulosic biomass. *Acta Biologica Szegediensis* 60 (2): 129-137. p.
- JEFFRIES, T.W.** (1994): Biodegradation of lignin and hemicelluloses. 233-277. p. In: Ratledge, C. (Szerk.): *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands
- JIANG, J., Zhao, J., He, C., Cui, B., Xiong J., Jiang, H., Ao, J., Xiang, G.** (2017): Recyclable magnetic carboxymethyl chitosan/calciumalginate - cellulase bioconjugates for corn stalk hydrolysis. *Carbohydrate Polymers* 166 (1): 358–364. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.003>
- JORGENSEN, S.V.** (1979): Industrial waste water management. Chapter 29.: The pulp, paper and wood industry. *Studies in Environmental Science* 5: 353-365. p. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0166-1116\(08\)71620-0](https://dx.doi.org/10.1016/S0166-1116(08)71620-0)
- JUHÁSZ, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-aho, M., Viikari, L.** (2005): Characterisation of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry* 40 (11): 3519-3525. p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.057>
- KÁDÁR, Z., Szengyel, Z., Réczey, K.** (2004): Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products* 20:103-110. p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.12.015>
- KALIYAN, N., Morey, R.V., Tiffany, D.G.** (2011): Reducing life cycle greenhouse gas emissions of corn ethanol by integrating biomass to produce heat and power at ethanol plants. *Biomass and Bioenergy* 35 (3): 1103-1113. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.11.035>
- KANSOHI, A. L., Essam, S. A., Zeinat, A. N.** (1999): Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. *Polymer Degradation Stability* 62 (1): 173-178. p.
- KAMARI, A., Saimw W.N.W., Ken, L.L.** (2009): Chitosan and chemically modified chitosan beads for acid dyes sorption. *Journal of environmental Sciences* 21 (3):296-302. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62267-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62267-6)
- KARIMI, K., Taherzadeh, M.J.** (2016): A critical review on analysis in pretreatment of lignocellulose: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. *Bioresource Technology* 203: 348-356. p. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.035>
- KARMAKAR, M., Ray, R.R.** (2011): Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology* 6 (1): 41-53. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.3923/jm.2011.41.53>
- KIM, S., Dale, B.E.** (2004): Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 4 (26): 361-375. p.

- KIM, S., Singh, A.P.** (2000): Micromorphological characteristics of wood biodegradation in wet environments: a review. *Iawa Journal/International Association of Wood* 21 (2): 135-155. p. DOI: 10.1163/22941932-90000241
- KLYOSOV, A.A.** (1988): Cellulases of the third generation. 87-99. p. In: Aubert, J.P., Béguin, P., Millet, J. (szerk.): *FEMS Symposim 43.: Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. Academic Press, London
- KRISTENSEN, J.B., Felby, C., Jørgensen, H.** (2009): Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels* 2 (1): 11. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-2-11>
- KUDSY, M., Kumazawa, H., Sada E.** (1995). Pyrolysis of kraft lignin in ZNCL2-KCL media with teralin vapor addition. *Canadian Society for Chemical Engineering* 73 (3): 411-415. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cjce.5450730319>
- KUHAD, R.C., Singh, A.** (2008): Lignocellulose biotechnology: Current and future prospects. *Reviews in Biotechnology* 13 (2): 151-172. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/07388559309040630>
- KUMAR, P., Barrett, D., Delwiche, M.J., Stroeve, P.** (2009): Methods for pretreatment of lignocellulose biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48 (8): 3713-3729. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ie801542g>
- KUMAR, R., Wyman, C.E.** (2009): Access of cellulase to cellulose and lignin for poplar solids produced by leading pretreatment technologies. *Biocatalysts and Bioreactor Design* 25 (3): 807-819. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.153>
- KUMAR, A.K.Sharma, S.** (2017): Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 4 (1): 7. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>
- KYZAS, G.Z., Lazaridis N.** (2009): Reactive and basic dyes removal by sorption onto chitosan derivatives. *Journal of Colloid and Interface Science* 331 (1): 32-39. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2008.11.003>
- LAKSHMI, K.P., Rajeswari, P.** (2016): Bioethanol production from newspaper waste using microorganisms. *International Journal of Applied Research* 2 (12): 380-382. p.
- LAWFORD, H.G., Rousseau, J.D.** (1991): Ethanol production by recombinant *Escherichia coli* carrying genes from *Zymomonas mobilis*. *Applied Biochemical and Biotechnology* 28-29: 221-236. p.
- LEE, Y.Y., Iyer, P., Torget, R.W.** (1999): Dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 65 (1): 93-115. p.
- LEE, J.W., Kim, J.Y., Jang, H.M., Lee, M.W., Park, J.M.** (2015): Sequential dilute acid and alkal pretreatment of corn stover: Sugar recovery efficiency and structural characterization. *Bioresource Technology* 82 (1): 296-301. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01>.
- LELE I., Víg A.** (2007): Papírgyártás – Vegyipari technológiák Környezetmérnököknek, a Papíripari Kutatóintézet oktatási segédlete, BME-Papíripari Kutatóintézet Kft. 1-27. p.
- LI, C., Cheng, G., Balan, V., Kent, M.S., Ong, M., Chundawat, S.P.S., da Costa, S.L., Melnichenko, Y.B., Dale, B.E., Simmons, B.A., Singh, S.** (2011): Influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility of ionic liquid and AFEX pretreated corn stover. *Bioresource Technology* 102 (13): 6928–6936. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.005>.
- LIMAYEM, A., Ricke, S.C.** (2012): Lignocellulosic biomass for ethanol production. Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* 38 (4): 449-467. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peccs.2012.03.002>
- LIN, H., Wang, B., Zhuang, R., Zhou, Q., Zhao, Y.** (2011): Artificial construction and characterization of a fungal consortium that produces cellulolytic enzyme system with strong wheat straw saccharification. *Bioresource Technology* 102 (22): 10559-10576. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.095>
- LIN, Y., Tanaka, S.** (2006): Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69 (6): 627-642. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0229-x>

- LIU, H.Q.,** Feng, Y., Zhao, D.Q., Jiang, J.X. (2012): Evaluation of cellulases produced from four fungi cultured on furfural residues and microcrystalline cellulose. *Biodegradation* 23 (3): 465-472. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10532-011-9525-6>
- MACEDO, I.C.,** Leal, M.R.L.V., Silva, J.E.A.R. (2008): Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy* 32 (7): 582-595. p.
- MAES, C.** Delcour, J.A. (2002): Structural characterisation of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *Journal of Cereal Science* 35 (3): 315-326. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.2001.0439>
- MAHESHWARI, D.K.,** Gohade, S., Paul, J., Varma, A. (1994): Paper mill sludge as a potential source for cellulase production by *T. reesei* QM 9123 and *Aspergillus niger* using mixed cultivation. *Carbohydrate Polymers* 23: 161-163. p. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90098-1](https://dx.doi.org/10.1016/0144-8617(94)90098-1)
- MAITAN-ALFENAS, G.P.,** Visser, E.M., Guimarães, V.M. (2004): Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science* 1 (1): 44-49. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2014.10.001>.
- MANDELS, M.** (1985): Applications of cellulases. *Biochemical Society Transactions* 13: 414-416. p.
- MARÁZ A .,** Hornok L. (2003): A gombák genetikája. In: Jakucs E. és Vajna L. (szerk.): *Mikológia*. Agroinform Kiadó, Budapest, 197-238. p.
- MARQUES, S.,** Alves, L., Roseiro, J.C., Gírio, F.M. (2008): Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Biomass and Bioenergy* 32 (5): 400-406. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.10.011>
- MAURYA, D.P.,** Singla, A., Negi, S. (2015): An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech* 5 (5): 597-609. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-015-0279-4>
- MCILVAINE, T.C.** (1921): A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry* 49: 183-186.
- MCKENDRY, P.** (2002): Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology* 83 (1): 37-46. p.
- MENON, V.,** Rao, M. (2012): Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science* 38 (4): 522-550. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
- MOHAGHEGHI, A.,** Evans, K., Chou, Y.C., Zhang, M. (2002): Cofermentation of glucose, xylose and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98 (1-9): 885-898. p. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4612-0119-9_72
- MOLNÁR, S.** (2004) Faanyagismeret. Szaktudás Kiadó Ház Rt.
- MONIRUZZAMAN, M.,** Dien, B., Sulbarán, B., Bothast, R.J. (1996): Ethanol production from AFEX pretreated corn fiber by recombinant bacteria. *Biotechnology Letters* 18 (8): 985-990. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00154635>
- MOYSÉS, D.N.,** Reis, V.C.B., de Almeida, J.R.M., de Moraes, F.A.G. (2016): Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (3): 207. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17030207>
- MURYETI, E.B.M.,** Sinurat, E. (2015): Adsorption of carbon black using chitosanin in the deinking process. *Procedia Chemistry* 17 (1): 106-110. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.117>
- MURYETI, E. B.,** Sinurat, E. (2017): Adsorption of carbon black using carboxymethyl chitosan in deinking process. *AIP Conference Proceedings* 1823: 1-6. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4978111>
- MUSSATTO, S.,** Fernandes, M., Milagres, A. M. F., Roberto, I. (2008): Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology* 43 (2): 124-129. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.006>

- MUSSATTO, S.I.,** Teixeira, J.A. (2010): Lignocellulose as raw material in fermentation processes. 897-907. p. In: Méndez-Vilas, A. (szerk.): *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*.
- NAGY, B.** (2011): Újrahasznosítási ismeretek. 6. fejezet: Papír újrahasznosítása és technikai feltételei. Szent István Egyetem
- NAVARRETE-BOLAÑOS, J.S.,** Serrato-Joya, O., Botello-Alvarez, E., Rico-Ramirez, R. (2007): Analyzing microbial consortia for biotechnological processes design. In: Méndez-Vilas, A. (szerk.): *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 437-449. p.
- NCUBE, T.,** Moyo, N.P., Sibanda, T. (2015): Production of cellulase by solid state fermentation of brewery spent grains using *Aspergillus niger* FGSC A733. *Zimbabwe Journal of Science & Technology* 10: 119-127. p.
- NELSON, N.** (1944): A photometric adaptation of the Somogyi-Nelson method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153: 375-380. p.
- NI, J.,** Tokuda, G. (2013): Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotechnology Advances* 32 (6): 838-850. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.005>
- NICU, R.,** Bobu, E., Miranda, R., Blanco, A. (2013): Flocculation efficiency of chitosan for papermaking applications. *Bioresources* 8 (1): 768-784. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.15376/biores.8.1.768-784>
- NIGAM, J.N.** (2002): Bioconversion of water-hyacinth (*Eichornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *Journal of Biotechnology* 97 (2): 107-116. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00013-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00013-5)
- NIGAM, P.S.,** Gupta, N., Anthwal, A. (2009): Pre-treatment of agro-industrial residues. 13-33. p. In: Nigam, P.S., Pandey, A. (szerk.): *Biotechnology for agro-industrial residues utilization*. Netherlands, Springer
- NISHIMURA, H.,** Tan, L., Sun, Z.H., Morimura, S. (2015): Efficient production of ethanol from waste paper and the biochemical methane potential of stillage eluted from ethanol fermentation. *Waste Management* 48 (1): 644-651. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.11.051>
- NONKLANG, S.,** Abdel-Banat, B.M., Cha-aim, K., Moonjai, N., Hoshida, H., Limtong, S., Yamada, M., Akada, R. (2008): High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Applied Environmental Microbiology* 74 (24): 7514-7521. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01854-08>
- NUNN, T.R.,** Howard, J.B., Longwell, J.P., Peters, W.A. (1985): Product compositions and kinetics in the rapid pyrolysis of milled wood lignin. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* 24 (1): 844-852. p.
- OJEDA, K.,** Ávila, O., Suárez, J., Kafarov, V. (2011): Evaluation of technological alternatives for process integration of sugarcane bagasse for sustainable biofuels production - Part 1. *Chemical Engineering Research and Design* 89 (3): 270-279. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2010.07.007>
- OKANO, K.,** Ohkoshi, N., Nishiyama, A., Usagawa, T., Kitagawa, M. (2009): Improving the nutritive value of madake bamboo, *Phyllostachys bambusoides*, for ruminants by culturing with the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *Animal Feed Science and Technology* 152 (1): 278-285. p.
- OLOFSSON, K.,** Bertilsson, M., Lidén, G. (2008): A short review on SSF – An interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels* 1:7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-1-7>
- OTIENO, D.O.,** Ahring, B.K. (2012): The potential for oligosaccharide production from hemicellulose fraction of biomass through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). *Carbohydrate research* 360: 84-92. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.017>
- PALMAROLA-ADRADOS, B.,** Galbe, M., Zacchi, G. (2005): Pretreatment of barley husk for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80 (1): 85-91. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.102/jctb.1161>

- PANDEY, A., Selvakumar, P. Soccol, C., Nigam, P. (1999):** Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Sciences* 77 (1): 149-162. p.
- PAREKH, S.R., Yu, S., Wayman, M. (1986):** Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolysates for increased ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 25 (3): 300-304. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00253667>
- PARK, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D. (2010):** Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulose performance. *Biotechnology Biofuels*, 3 (1): 1-10. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>.
- PENTJUSS, A., Odzina, I., Kostromins, A., Fell, D.A., Stalidzans, E., Kalnenieks, U. (2013):** Biotechnological potential of respiring *Zymomonas mobilis*: a stoichiometric analysis of its central metabolism. *Journal of Biotechnology* 165 (1): 1-10. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.02.014>
- PÉREZ, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J. (2002):** Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 5 (2): 53-63. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>
- PÉREZ-GUERRA, N., Torrado-Agrasar, A., López-Macias, C. Pastrana, L. (2003):** Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 2 (3): 343-350. p.
- PEZTOLD, G., Schwarz, S. (2015):** Investigation of an improved deinking process of waste paper – The influence of surface tension and charge in suspension on ink removal. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 480 (1): 398-404. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.01.084>
- POPP J., Potori N. (2008):** Az élelmezés-, energia- és környezetbiztonság összefüggései. *Gazdálkodás*. Károly Róbert Kutató-oktató Közhasznú Nonprofit Kft. Gyöngyös 6: 528-544.p.
- PRASAD, S., Singh, A. Joshi, H.C. (2007):** Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resource Conversation and Recycling* 50 (1): 1-39. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resconrec.2006.05.007>
- QUEVEDO-HIDALGO, B., Monsalve-Marín, F., Narváez-Rincón, P.C., Pedroza-Rodríguez, A.M., Velásquez-Lozeno, M.E. (2013):** Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* using lignocellulosic hydrolysate from *Chrysanthemum* waste degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29 (3): 459-466. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-012-1199-7>
- RAHMAN, S.H.A., Choudhury, J.P. and Ahmad, A.L. (2006):** Production of xylose from oil palm empty fruit bunch fiber using sulfuric acid. *Biochemical Engineering* 30 (1): 97-103. p.
- RALPH, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H. (2004):** Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews* 3 (1): 29-60. p.
- RATHMANN, R., Szklo, A., Shaeffer, R. (2010):** Land use competition for production of food and liquid biofuels: An analysis of the arguments in the current debate. *Renewable Energy* 35 (1): 14-22. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2009.02.025>
- RAVI, K., Schrinner, T., Grossmann, H., Ray, A., Tandon, R (2016):** Improving adsorption deinking by identifying the optimum balance between polymer beads and deinking chemistry. *BioResources* 11 (1): 1664-1671. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.15376/biores.11.1.1664-1671>
- REID, I.D. (1989):** Solid-state fermentations for biological delignification. *Enzyme and Microbial Technology* 11 (12): 786-803. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90052-5](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(89)90052-5)
- RÉCZEY, K., Szengyel, Z., Eklund, R., Zacchi, G. (1996):** Cellulase production by *T. reesei*. *Biorecourse Technology* 57 (1) :25-30. p. DOI: [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00038-7](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00038-7)
- ROBINSON, T., McMullan G., Marchant R., Nigam P. (2001):** Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* 77 (3): 247-255. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)000808](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(00)000808)
- RODRUSSAMEE, N., Lertwattanasakul, N., Hirata, K., Limtong, S., Kosaka, T., Yamada, M. (2011):** Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various

- conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90 (4): 1573-1586. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3218-2>
- ROSENBERG, M.**, Tomáška, M., Kaňuch, J., Šurdík, E. (2004): Improved ethanol production from whey with *Saccharomyces cerevisiae* using immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Acta Biotechnologica* 15 (4): 387-390. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/abio.370150413>
- ROZENFELDE, L.**, Puke, M., Krůma, I., Poppele, I., Matjuškova, N., Vederòikovs, N., Rapoport, A. (2017): Enzymatic hydrolysis of lignocellulose for bioethanol production. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences* 71 (4): 275-279. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/prolas-2017-0046>
- SADDLER, J.N.**, Ramos, L.P., Breuil, C. (1993): Steam pretreatment of lignocellulosic residues. In: Saddler J.N. (szerk.): *Bioconversion of forest and agricultural plant residues*. CAB International, Wallingford, 73-91. p.
- SAHU, S.**, Pramanik, K. (2015): Evaluation and optimization of organic acid pretreatment of cotton gin waste for enzymatic hydrolysis and bioethanol production. *Applied Biochemical and Biotechnology* 1-14. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-018-2790-7>
- SAINI, R.**, Saini, J.K., Adsul, M., Patel, A.K., Mathur, A., Tuli, D. (2015): Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. *Bioresource Biotechnology* 188: 240-246. p. DOI: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.048>
- SAJITH, S.**, Priji, P., Sreedevi, S., Benjamin, S. (2016): An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *Journal of Nutrition and Food Sciences*. 6 (461): 1-13. p.
- SARI, E.**, Syamsiah, S., Sulisty, H. (2011): The kinetic of biodegradation lignin in water hyacinth (*Eichhornia Crassipes*) by *Phanerochaete chrysosporium* using solid state fermentation (SSF) method for bioethanol production, Indonesia. World Academy of Science, Engineering and Technology, *International Journal of Chemical and Molecular Engineering* 5 (6): 452-455. p.
- SARTORI, T.**, Tibolla, H., Prigol, E., Colla, L.M., Costa, J.A.V., Bertolin, T.E. (2015): Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues by cellulases obtained from solid state fermentation using *Trichoderma viride*. Hindawi Publishing Corporation, *BioMed Research International* 2015: 9 p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/342716>
- SÁNCHEZ, S.**, Bravo, V., Castro, E., Moya, A.J., Camacho, F. (2002): The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77 (6): 641-648. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.622>
- SÁNCHEZ, O.J.**, Cardona, C.A. (2008): Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioreource Technology* 99 (13): 5270-5295. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>
- SÁNCHEZ, C.** (2009): Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27 (2): 185-194. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- SANGKHARAK, K.** (2011): Optimization of enzymatic hydrolysis for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of wastepaper. *Waste Management & Research* 29 (11): 1134-1144. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0734242X10387656>
- SANTOYA, F.**, González, A.E., Terron, M.C., Pisabarro, A.G. (2008): Quantitative linkage mapping of lignin-degrading enzymatic activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme and Microbial Technology* 43 (2): 137-143. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.007>
- SARKAR, N.**, Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K. (2012): Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*. 37 (1): 19-27. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>
- SCHELL, D.J.**, Dowe, N., Chapeau, A., Nelson, R.S., Jennings, E.W., (2016): Accounting for all sugars produced during integrated production of ethanol from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 205: 153-158. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.024>
- SELIG, M.**, Weiss, N., Ji, Y. (2008): Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass; laboratory analytical procedure. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.
- SEMBERY P.**, Tóth L. (2004): Hagymányos és megújuló energiák, Szaktudás Kiadó Ház, Budapest, 274-279. p.

- SEO, D.J., Fujito, H., Sakoda, A. (2011):** Effects of a non-ionic surfactant, Tween 20, on adsorption/desorption of saccharification enzymes onto/from lignocelluloses and saccharification rate. *Adsorption* 17 (5): 813-822. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10450-011-9340-8>
- SHAFIEI, M., Kumar, R., Karimi, K. (2015):** Pretreatment of lignocellulosic biomass. 85-114. p. In: Karimi, K. (szerk.): *Biobutanol from lignocellulosic wastes*. Springer International Publishing DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-14033-9_3
- SHI, C., Lv, C., Wu, L., Hou, X. (2017):** Porous chitosan/ hydroxyapatite composite membrane for dyes static and dynamic removal from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials* 338 (1): 241-249. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.022>
- SINDHU, R., Binod, P., Pandey, A. (2016):** Biological pretreatment of lignocellulose biomass- An overview. *Bioresour. Technology* 199 (1): 76-82. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- SINGH, J., Suhag, M., Dhaka, A. (2015):** Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. *Carbohydrate Polymers* 117 (1): 624-631. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.012>
- SINGHANIA, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A. (2010):** Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 46 (7): 541-549. p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
- SIPOS, B., Réczey, J., Somorai, Z., Kádár, Z., Dienes, D., Réczey, K. (2009):** Sweet sorghum as feedstock for ethanol production: Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 153 (1-3): 151-162. p. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8423-9>
- SIPOS, B., Schleicher, Á., Perazzini, R., Dienes, D., Crestini, C., Siika-aho, M., Réczey, K. (2010):** Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam pretreated spruce in the presence of poly(ethylene glycol). *Enzyme and Microbial Technology* 47 (3): 84-90. p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.05.010>
- SJÖSTRÖM, E. (1981):** Fundamentals and Applications of Wood Chemistry. 223-245. p. In: Sjöström, E. (szerk.): *Wood Chemistry*, Academic Press Inc., New York
- SOCCOL, C.R., da Costa, E.S.F., Letti, L.A.L., Karp, S.G., Woiciechowski, A.L., da Souza Vanderberghe, L.P. (2017):** Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation* 1 (1): 52-71. p. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>
- SOMOGYI, M. (1945):** Determination of blood sugar. *Journal of Biological Chemistry* 160: 69-73. p.
- SOMOGYI, M. (1952):** Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195: 19-23. p.
- SPAGNA, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Restuccia, C., Giudici, P. (2002):** Properties of endogenous β -glucosidase of a *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme and Microbial Technology* 31 (7): 1036-1041. p. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00239-9](https://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00239-9)
- STRAKOWSKA, J., Błaszczak, L., Chelkowski, J. (2014):** The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *Journal of Basic Microbiology* 54 (1): 12-13. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201300821>
- SUN, Y., Cheng, J. (2002):** Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technology* 83 (1): 1-11. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- SUN, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S. (2005):** Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydrate Research* 340 (1): 97-106. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2004.10.022>
- SUN, X., Liu, Z., Qu, Y., Li, X. (2008):** The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 146 (1-3): 119-28. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-007-8049-3>
- SUN, S., Sun, S., Cao, X., Sun, R. (2016):** The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technology* 199 (1): 49-58. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>

- TAHA**, M., Shahsavari, E., Al Hothaly, K., Mouradov, A., Smith, A., Ball, A. Adetutu, E. (2015): Enhanced biological straw saccharification through coculturing of lignocellulose-degrading microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175 (8): 3709-3728. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-015-1539-9>
- TAHERZADEH**, M.J., Karimi, K. (2008): Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences* 9 (9): 1621-1651. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms9091621>
- TANIGUCHI**, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., Tanaka, T. (2005): Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (6): 637-643. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.100.637>
- TANIMURA**, A., Nakamura, T., Watanabe, I., Ogawa, J., Shima, J. (2012): Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. *SpringerPlus* 1:27. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-1-27>
- TAO**, F., Miao, J.Y., Shi, G.Y., Zhang, K.C. (2005): Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. *Process Biochemistry* 40 (1): 183-187. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.054>
- TENKANEN**, M. (1998): Action of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus oryzae* esterases in the deacetylation of hemicelluloses. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 27 (1): 19-24. p.
- TIMELL**, T.E. (1997): Recent progress in the chemistry of wood hemicellulose. *Wood Science and Technology* 1 (1): 45-70. p.
- TRUMIĆ**, M.Ž., Trumić, M.S., Marković, Z. (2007): Separation of ink particles from waste newspaper by deinking flotation. *Journal of Mining and Metallurgy* 43: 33-41. p.
- TSATIS**, D.E., Papachristos, D.K., Valta, K.A., Vlyssides, A.G., Economides, D.G. (2017): Enzymatic deinking for recycling of office waste paper. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5 (2): 1744-1753. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resconrec.2006.05.007>
- TUCKER**, M.P., Kyoung, H.K., Newman, M.M., Quang, A.N. (2003): Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulase enzyme digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105-108: 165-177. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1385/abab:105:1-3:165>
- TURAN**, Y., Zheng, M. (2005): Purification and characterization of an intracellular beta-glucosidase from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* 70 (12):1363-1368. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10541-005-0270-5>
- VAKILI**, M., Rafatullah, M., Salamatina. B., Abdullah. A., Ibrahim, M., Gholami, Z., Amouzgar, P. (2014): Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review. *Carbohydrate Polymers* 113 (1): 115-130. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.007>
- VALDÍVIA**, M., Galan, J.L., Laffarga, J., Ramos, J.L. (2016): Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. *Microbial Biotechnology* 9 (5): 585-594. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12387>
- VAN DER POL**, E., Bakker, R.R., Beats, P., Eggink, G. (2014): By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (1): 9579-9593. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6158-9>
- VAN KUIJK**, S.J.A., Sonnenberg, A.S.M., Baars, J.J.P., Hendriks, W.H., Cone, J.W. (2015): Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review. *Biotechnology Advances* 33 (1): 191-202. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.014>
- VARGA**, E., Szengyel, Z., Réczey, K. (2002): Chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98-100: 73-88. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1385/abab:98-100:1-9:73>
- VARGA**, E., Réczey, K., Zacchi, G. (2004): Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 114 (1-3): 509-523. p. <http://dx.doi.org/10.1385/ABAB:114:1-3:509>

- VASHISTH, S.**, Bennington, C.P.J., Grace, J.R. Kerekes, R.J. (2011): Column Flotation Deinking: State-of-the-art and opportunities. *Resources, Conservation and Recycling* 55 (12): 1154-1177. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.06.013>.
- WAN, C.**, Li, Y. (2012): Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances* 30 (6): 1447-1457. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.003>.
- WANG, W.**, Yan, L., Cui, Z., Gao, Y., Wang, Y., Jing, R. (2011): Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresource Technology* 102 (19): 9321-9324. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.065>
- WANG X.**, Padgett, J.M., De la Cruz, F.B., Barlaz, M.A. (2011): Wood biodegradation in laboratory-scale landfills. *Environmental Science and Technology* 45 (16): 6864-6871. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/es201241g>
- WANG, W.**, Yuan, T.Q., Cui, B.K., Dai, Y.C. (2013): Investigation lignin and hemicellulose in white rot fungus-pretreated wood that affect enzymatic hydrolysis. *Bioreource Technology* 134: 381-385.
- WANG, S.**, Dai, G., Yang, H., Luo, Z. (2017): Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. *Progress in Energy and Combustion Science* 62: 33-86. p. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.peccs.2017.05.004>
- WEN, Z.**, Liao, W., Chen, S. (2004): Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. *Bioresource Technolgy* 91 (1): 31-39. p. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00166-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00166-4)
- WIRAWAN, F.**, Cheng, C.L., Kao, W.C., Chang, J.S. (2012): Cellulosic ethanol production performance with SSF and SHF processes using immobilized *Zymomonas mobilis*. *Applied Energy* 100 (1): 19-26. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.04.032>
- WONGWILAIWALIN, S.**, Rattanachahomsri, U., Laothanachareon, T., Champreda, V. (2010): Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. *Enzymes and Microbial Technology* 47 (6): 283-290. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.07.013>
- WOO, S.L.**, Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Lanzuise, S., Manganiello, G., Lorito, M. (2014): *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Microbiology Journal* 8 (1): 71-126. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1874437001408010071>
- XIE, Y.**, Yasuda, S., Wu, H., Liu, H. (2000): Analysis of the structure of lignin-carbohydrate complexes by specific ¹³C tracer method. *Journal of Wood Science* 46 (2): 130-136. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00777359>
- XU, D.**, Hein, S., Loo, S.L., Wang, K. (2008): The fixed-bed study of dye removal on chitosan beads at high pH. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47 (22): 8796-8800. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ie800387z>
- YADAV, S.K.**, Naseeruddin, S., Prashanthi, G.S., Sateesh, L.L., Rao, V. (2011): Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology* 102 (11): 6473-6478. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.019>
- YAMADA, R.** Yamakawa, S., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2011): Direct and efficient ethanol production from high-yielding rice using a *Saccharomyces cerevisiae* strain that express amylases. *Enzyme and Microbial Technology* 48 (4-5): 393-396. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.01.002>.
- YAMASHITA, Y.**, Kurosumi, A., Sasaki, C., Nakamura, Y. (2008): Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*. *Biochemical Engineering Journal* 42 (3): 314-319. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2008.07.013>
- YANG, S.**, Fei, Q., Zhang, Y., Contreras, L.M., Utturkar, S.G., Brown, S.D., Himmel, M.E., Zhang, M. (2016): *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. *Microbial Biotechnology* 9 (6): 699-717. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12408>
- YOUNES, I.**, Rinaudo, M. (2015): Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs* 13 (3): 1133-1174. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md130311338>

- ZHANG, Y.H.P., Lynd, L.R. (2006):** A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. *Biotechnology and Bioengineering* 94 (5): 888-898. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20906>
- ZHANG, J., Lynd, L.R. (2010):** Ethanol production from paper sludge by simultaneous saccharification and co-fermentation using recombinant xylose-fermenting microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering* 107 (2): 235-244 p. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22811>
- ZHANG, K., Pei, Z., Wang, D. (2016):** Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. *Bioresource Technology* 199 (1): 21-33. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.102>
- ZHAO, Y., Wu, B., Yan, B. (2004):** Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. *Science China Life Sciences* 47 (1): 18-24. p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1360/02yc0163>.
- VENDITTI, R.A., Rojas, O.J., Morris, H., Tucker, J., Spence, K., Austin, C., Castillo, L.G. (2007):** Natural surfactants for flotation deinking in paper recycling. TAPPI 8th Research Forum on Recycling, Niagara Falls CA.
- VILLAS-BOAS, S.G., Esposito, E., de Mendonca, M.M. (2002):** Novel lignocellulolytic ability of *Candida utilis* during solid-state cultivation on apple pomace. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18 (6): 541-545. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016350612380>
- VINTILA, T., Dragomirescu, M., Strava, S., Croitoriu, V. (2009):** Enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* 42 (1): 125-129. p.
- VOHRA, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., Patil, S. (2014):** Bioethanol production: feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2 (1): 573-584. p. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013>
- MARRY, A. M. (2018): Research Interests.** http://web.mnstate.edu/marryand/research_interests.htm.
Látogatási dátum: 2018.06.03

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném hálásan megköszönni témavezetőimnek, **Dr. Nguyen Duc Quangnak** és **Rezessyné dr. Szabó Juditnak** a munkám során nyújtott szakmai útmutatását, támogatását és szüntelen bátorítását.

Köszönettel tartozom a **Sör- és Szeszipari Tanszék munkatársainak, kollégáimnak** és **doktorandusz társaimnak**, akik egy-egy kávé kíséretében észrevételeikkel segítettek a munkámat, és akikhez szakmai kérdéseimmel nyugodtan fordulhattam.

Továbbá köszönöm **hallgatóimnak** a kitartó munkát, amit a szak- és diplomadolgozatok, valamint a TDK pályaművek készítése során nyújtottak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm **Családomnak** és **Páromnak** a lelki támaszt, hogy mindvégig mellettem álltak és e munka elkészítéséhez nyugodt háttérrel biztosítottak.