



Pannon Egyetem

Vegyésmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskola

**LIGNOCELLULÓZ HIDROLÍZISE ÉS
TOVÁBBHASZNOSÍTÁSA IONOS FOLYADÉKBAN
ENZIMEK SEGÍTSÉGÉVEL**

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

DOI:10.18136/PE.2019.731

Készítette:

Megyeri Gábor

Okleveles környezetmérnök

Témavezetők:

Dr. Gubicza László

egyetemi tanár

Dr. Nemestóthy Nándor

egyetemi docens

Pannon Egyetem

Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet

2019

Lignocellulóz hidrolízise és tovább hasznosítása ionos folyadékban enzimek segítségével

Készült a Pannon Egyetem Vegyészmérnöki- és Anyagtudományok Doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Gubicza László egyetemi tanár
Dr. Nemestóthy Nándor egyetemi docens

Elfogadásra javaslom (igen / nem) (aláírás)

Elfogadásra javaslom (igen / nem) (aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton%-ot ért el,

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem
(aláírás)

Bíráló neve:) igen /nem
(aláírás)

***Bíráló neve:) igen /nem
(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Veszprém,

.....
a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

.....
Az EDHT elnöke

KIVONAT

A munka célja a lignocellulóz tartalmú biomassza hasznosításának továbbfejlesztése volt. Fontosságát az indokolja, hogy a mezőgazdasági hulladékokból származó biomassza magas cellulóz tartalmának köszönhetően jó megújuló nyersanyagforrásnak tekinthető. A cellulóz rendezett, kristályos szerkezetének köszönhetően nem oldódik vízben, így az enzimek nehezen tudják bontani, egyes ionos folyadékokban viszont jól oldódik.

Első lépésként tisztított cellulóz oldása került vizsgálatra 1-butil-3-metil-imidazolium-klorid-ban ([Bmim]Cl), majd puffer és celluláz enzim hozzáadása után a két lépést (előkezelés és enzimes hidrolízis) sikerült összevonni, és két reakciót egy reakciótérben lejátszatni. Miután megállapítást nyert, hogy a két lépés összevonható, a munka mezőgazdasági hulladékokkal (szalma, kukoricaszár és levél) került folytatásra, valamint az előkezelés vizsgálata kibővült az 1-butil-3-metil-imidazolium-acetát ([Bmim]Ac) ionos folyadékkal.

A kísérletek során egyértelműen megállapítást nyert, hogy a mezőgazdasági hulladékokból is jó hozammal kinyerhető a glükóz, így a következő lépésben annak tovább hasznosítása került vizsgálatra. Környezetbarát felületaktív anyag előállítására esett a választás, mivel számos iparág használja őket nagy mennyiségben. Egy másik ionos folyadékban, 1-butil-3-metil-imidazolium-hexafluoro-foszfátban ([Bmim]PF₆) lipáz enzim segítségével glükózból és palmitinsavból cukor-zsír-sav észtert, új, lebomló felületaktív anyagot képzett. Az eljárás előnyei az enyhe reakció körülmények, az enzim újra felhasználhatósága és a megújuló forrásból származó glükóz.

A harmadik lépésben az előkezelésre használt ionos folyadékok toxicitásának és biológiai bonthatóságának vizsgálata volt, mivel fontos, hogy olyan vegyszereket alkalmazzunk, amelyek nem szennyezik a környezetet egy véletlen kijutás esetén sem. Megállapítást nyert, hogy bár egyik ionos folyadék sem bontható biológiai úton, de nem is toxikusak Polyseed liofilizált baktérium konzorciumra.

A további vizsgálatok kimutatták, hogy [Bmim]Cl nélküli rendszerben a Celic Htec2 katalizálta enzimatikus reakció jól leírható a Michaelis-Menten kinetikával. Az enzim találkozása koncentrált ionos folyadékkal azonban, mégha ez rövid ideig is tart, irreverzibilis inhibíciót eredményezhet, ezért a két lépés (cellulóz előkezelés és enzimes hidrolízis) összevonásakor ügyelni kell a pufferrel történő megfelelő hígításra.

ABSTRACT

The aim of the work was to improve the utilization of lignocellulose-containing biomass.

An important aspect that biomass from agricultural waste with high cellulose content can be considered as a good source of renewable raw materials. Due to its ordered crystalline structure, cellulose does not dissolve in water, making it difficult for enzymes to break down, but is soluble in some ionic liquids.

As a first step, the dissolution of purified cellulose was tested in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([Bmim]Cl). After the addition of buffer and cellulase enzyme, the two steps (pre-treatment and enzymatic hydrolysis) could be simultaneously carried out in one pot. After it was found that the two critical steps could be merged, the work was continued with agricultural waste (straw, corn stalk and leaf). The pre-treatment test was extended with the ionic liquid of 1-butyl-3-methylimidazolium acetate ([Bmim]Ac).

The experiments clearly demonstrated that glucose can also be recovered from agricultural waste with good yield, so the next step was to investigate its further use. The production of environmentally friendly surfactant has been investigated due to its industrial relevance. In another ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([Bmim]PF₆), a sugar-fatty acid ester, a novel degradable surfactant, was produced from glucose and palmitic acid by using a lipase enzyme. The advantages of this method are mild reaction conditions, reusability of the enzyme and the origin of glucose from renewable sources.

In the third step, the toxicity and biodegradability of the ionic liquids used for pre-treatment was investigated as it is important to use chemicals that do not contaminate the environment in case of accidental release. It has been found that although ionic liquid are not biodegradable, they are for example not toxic to the Polyseed lyophilized bacterial consortium.

Further studies have shown that in a system without [Bmim]Cl, the enzymatic reaction catalyzed by Celic Htec2 can be well described by Michaelis-Menten kinetics. However, when the enzyme gets in contact with concentrated ionic liquid, even for a short time, it may result in irreversible inhibition. Therefore, when combining the two steps (cellulose pre-treatment and enzymatic hydrolysis), appropriate dilution with buffer should be taken into account.

AUSZUG

Ziel der Arbeit war es, die Verwertung von lignocellulosehaltiger Biomasse zu verbessern.

Es ist wichtig, dass Biomasse aus landwirtschaftlichen Abfällen mit hohem Cellulosegehalt als eine gute Quelle für nachwachsende Rohstoffe angesehen werden kann. Aufgrund seiner geordneten Kristallstruktur löst sich Cellulose nicht in Wasser, was den Abbau von Enzymen erschwert, es ist aber in einigen ionischen Flüssigkeiten löslich.

In dem ersten Schritt wurde die Auflösung von gereinigter Cellulose in 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid ([Bmim]Cl) getestet. Nach der Zugabe von Puffer und Cellulaseenzym konnten die beiden Schritte (Vorbehandlung und enzymatische Hydrolyse) gleichzeitig in einem Topf durchgeführt werden. Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die beiden kritischen Schritte zusammengeführt werden konnten, wurde die Arbeit mit landwirtschaftlichen Abfällen (Stroh, Maisstängel und Laub) fortgesetzt. Der Vorbehandlungstest wurde mit der ionischen Flüssigkeit von 1-Butyl-3-methylimidazoliumacetat ([Bmim]Ac) erweitert.

Die Experimente zeigten deutlich, dass Glucose auch aus landwirtschaftlichen Abfällen mit guter Ausbeute gewonnen werden kann. Der nächste Schritt bestand darin, die weitere Verwendung zu untersuchen. Die Herstellung von umweltfreundlichem Tensid wurde aufgrund seiner industriellen Relevanz untersucht. In einer anderen ionischen Flüssigkeit, 1-Butyl-3-methylimidazoliumhexafluorphosphat ([Bmim]PF₆), wurde ein Zucker-Fettsäureester, ein neues abbaubares Tensid, aus Glucose und Palmitinsäure unter Verwendung eines Lipaseenzym hergestellt. Die Vorteile dieser Methode sind milde Reaktionsbedingungen, Wiederverwendbarkeit des Enzyms und die Herkunft von Glucose aus erneuerbaren Quellen.

Im dritten Schritt wurde die Toxizität und biologische Abbaubarkeit der zur Vorbehandlung verwendeten ionischen Flüssigkeiten untersucht, da es wichtig ist, Chemikalien zu verwenden, die die Umwelt im Falle einer versehentlichen Freisetzung nicht kontaminieren. Es wurde festgestellt, dass ionische Flüssigkeiten zwar nicht biologisch abbaubar sind, jedoch beispielsweise für das lyophilisierte Bakterienkonsortium von Polyseed nicht toxisch sind.

Weitere Studien haben gezeigt, dass in einem System ohne [Bmim]Cl die durch Celic Htec2 katalysierte enzymatische Reaktion durch die Michaelis-Menten-Kinetik gut beschrieben werden kann. Wenn das Enzym jedoch auch nur für kurze Zeit mit konzentrierter ionischer Flüssigkeit in Kontakt kommt, kann es zu einer irreversiblen Hemmung kommen. Daher sollte bei der Kombination der beiden Schritte (Cellulosevorbehandlung und enzymatische Hydrolyse) eine angemessene Verdünnung mit Puffer berücksichtigt werden.

JELÖLÉSJEGYZÉK	8
1. BEVEZETÉS.....	10
2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ	12
2.1. A biomassa mint megújuló energia- és nyersanyagforrás	12
2.1.1. Lignocellulóz	12
2.1.1.1. A lignocellulóz felépítése	12
2.1.1.2. Lignocellulóz bontásában részt vevő enzimek.....	15
2.1.1.3. Cellulóz előkezelése napjainkban	16
2.2. Ionos folyadékok	18
2.2.1. Az ionos folyadékok általános jellemzői	18
2.2.1.1. 1-n-Butil-3-metil-imidazolium-klorid	21
2.2.1.2. 1-n-Butil-3-metil-imidazolium-acetát	22
2.2.2. A cellulóz előkezelés ionos folyadékban	22
2.3. Glükóz-palmitát enzimatisz előállítása	25
2.3.1. Lipáz enzimek	26
2.3.2. Felületaktív anyagok.....	27
2.3.3. Enzimkatalitikus észterezés ionos folyadékokban.....	28
2.4. Az ionos folyadékok környezetre kifejtett hatása	30
2.4.1. Enzimekre kifejtett hatás.....	31
2.4.2. Baktériumokra kifejtett hatás	31
2.4.3. Környezetre kifejtett hatás.....	33
2.4.4. Biológiai bonthatóság.....	33
2.4.5. Biológiai oxigénigény.....	34
3. CÉLKITŰZÉS.....	36
4. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS TECHNIKÁK	37
4.1. Előkezelés és enzimatisz hidrolízis.....	37
4.1.1. Felhasznált anyagok	37
4.1.2. Használt eszközök.....	37
4.1.3. A mérés menete	38
4.2. Glükóz-palmitát enzimatisz előállítása	38
4.2.1. Felhasznált anyagok	38
4.2.2. Használt eszközök.....	38
4.2.3. Mérés menete	39
4.2.4. Kísérlettervezés	39
4.2.5. A kísérlettervezés során meghatározott paraméterek.....	41
4.3. Biológiai oxigénigény mérés	42
4.3.1. Felhasznált anyagok	42

4.3.2. Használt eszközök.....	42
4.3.3. A mérés menete	42
4.4. Enzim kinetikai mérés ionos folyadékban	43
4.4.1. Cellulóz hidrolízis [Bmim]Cl nélkül Michaelis-Menten kinetika.....	43
4.4.2. Cellulóz hidrolízis [Bmim]Cl jelenlétében	43
4.4.3. Enzim deaktiváció hígítatlan [Bmim]Cl-al.....	44
4.4.4. Cellulóz hidrolízis	45
5. EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁSUK	46
5.1. Ionos folyadékos előkezelés vizsgálatának eredményei	46
5.1.1. Tisztított cellulóz vizsgálata	46
5.1.1.1. Morfológiai változás eredménye	46
5.1.1.2. Az egy edényes (one pot) előkezelés és enzimes hidrolízis eredményei.....	48
5.1.2. Kukorica szárából és leveléből készült őrlemény vizsgálata.....	49
5.1.2.1. Morfológiai változás eredménye	49
5.1.2.2. Az egy edényes előkezelés és enzimes hidrolízis eredményei	50
5.1.3. Kukorica szárából és leveléből készült őrlemény további vizsgálata az ionos folyadékok és enzimek különböző kombinációja esetén.....	51
5.1.4. Szalma őrlemény vizsgálata.....	52
5.1.5. A szalma őrlemény vizsgálata alapanyagként az ionos folyadékok és enzimek különböző kombinációja esetén.....	53
5.2. Glükóz-palmitát enzimatisz előállítás vizsgálata eredményei	55
5.2.1. Ionos folyadékok összehasonlítása	55
5.2.2. Enzim újrafelhasználás	56
5.2.3. A kísérlettervezés eredménye.....	57
5.2.4. Glükóz-palmitát előállítása az optimális reakció paraméterekkel.....	60
5.3. Biológiai oxigénigény mérés eredménye	63
5.4. Enzim kinetikájának mérési eredménye	64
5.4.1. Cellulóz hidrolízis [Bmim]Cl ionos folyadék nélkül	64
5.4.2. Cellulóz enzimatisz hidrolízis gátlásának eredményei [Bmim]Cl ionos folyadék jelenlétében	66
5.4.3. Celluláz enzim deaktiválása [Bmim]Cl ionos folyadék jelenlétében.....	69
6. ÖSSZEFOGLALÁS	73
7. TÉZISEK.....	75
IRODALOMJEGYZÉK:	77
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:	91

Jelölésjegyzék

[Bmim]Cl- 1-butil-3-metil-imidazolium-klorid
[Bmim]Ac- 1-butil-3-metil-imidazolium-acetát
[Bmim]PF₆- 1-butil-3-metil-imidazolium-hexafluoro-foszfát
[Bmim]HCOO- 1-butil-3-metil-imidazolium-formiát
[Emim]MeSO₄- 1-etil-3-metil-imidazolium-metilszulfát
[Bmim]MeSO₄- 1-butil-3-metil-imidazolium-metilszulfát
[Bmim]Br- 1-butil-3-metil-imidazolium-bromid
[Bmim]SCN- 1-butil-3-metil-imidazolium-tiocianát
[Bmim]BF₄- 1-butil-3-metil-imidazolium-tetrafluoroborát
[C₂mim]OAc- 1-etil-3-metil-imidazolium-acetát
[Bmim]Tf₂N- 1-butil-3-metil-imidazolium-bis(trifluoro-metil-szulfonil)-imid
[C₇-mim]Tf₂N- 1-heptil-3-metilimidazolium-bis(trifluoro-metil-szulfonil)-imid
[C₁₂-mim]Tf₂N- 1-dodecil-3-metilimidazolium-bis(trifluoro-metil-szulfonil)-imid
[BTMA]Tf₂N- butil-trimetil-ammonium-bis(trifluoro-metil-szulfonil)-imid
[HTMA]Tf₂N- hexil-trimetil-ammonium-bis(trifluoro-metil-szulfonil)-imid
[Emim]TfO- 1-etil-3-metil-imidazolium-tri-fluoro-metil-szulfonát
[Bmim]TfO- 1-butil-3-metil-imidazolium-tri-fluoro-metil-szulfonát
[Hmim]TfO- 1-hexil-3-metil-imidazolium-tri-fluoro-metil-szulfonát
[Bmpyr]PF₆- 1-butil-4-metil-piridinium-hexafluorofoszfát
[Emim]BF₄- 1-etil-3-metil-imidazolium-tetrafluoroborát
[Omim]BF₄- 1-oktil-3-metil-imidazolium-tetrafluoroborát
[Emim]PF₆- 1-etil-3-metil-imidazolium-hexafluorofoszfát
[Omim]PF₆- 1-oktil-3-metil-imidazolium-hexafluorofoszfát
Cyphos 104- trihexil-tetradecil-foszfónium-bisz(2,4,4-trimetil-pentil)-foszfinát
Cyphos 109- trihexil (tetradecil)-foszfónium-bisz (trifluor-metánszulfonil)-imid
[Emim]Dep- 1-etil-3-metil-imidazolium-dietil-foszfát
EC₅₀- hatásos maximális koncentráció fele
OECD- Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet
E- enzim
S- szubsztrát
ES- Enzim-szubsztrát komplex
V- termék képződési arány (g termék/g enzim- perc)

$V_{\max}$ - maximális termék képződési arány (g termék/g enzim- perc)

[S]- szubsztrát koncentráció (g/l)

K_s - fél telítési koncentráció (g/l)

K_i és K'_i - enzim-gátló és (enzim-szubsztrát)-gátló megoszlási konstans (g/l)

[I]- inhibitor koncentráció (g/l)

A- relatív enzim aktivitás

a_t - mért aktivitás ionos folyadék jelenlétében, miután az enzimet különböző ideig (t) kezeltem hígítatlan ionos folyadékban

a_0 - mért aktivitás ionos folyadék jelenlétében megelőző enzim inkubálás nélkül hígítatlan ionos folyadékban (t=0, alap aktivitás)

k_{de1} - celluláz deaktiváció elsőrendű sebességi állandója (min^{-1})

e- exponenciális együttható (2,718)

GOD- glükóz oxidáz

CALB- *Candida antarctica* lipáz B

SFAE- (sugar fatty acid ester) cukor-zsírsav észter

rpm- fordulatszám

BOI- biológiai oxigénigény

1. Bevezetés

Napjainkban az emberiség folyamatosan növekvő energia és nyersanyag szükséglete miatt egyre nagyobb igény mutatkozik az alternatív, megújuló energia- és nyersanyagforrások iránt, amelyek könnyen beilleszthetők a már meglévő rendszerekbe, és nem kívánnak nagy átalakításokat. Ennek egyik megoldása lehet a biomassa, konkrétan a lignocellulóz (Abels, 2013) tartalmú anyagok hidrolízise és a felszabaduló egyszerű cukrok továbbalakítása (Orozco, 2007). A biomassa szinte korlátlan mennyiségben áll rendelkezésünkre, megújuló nyersanyagforrásnak tekinthető (Lozano, 2011), és a mezőgazdasági termelésből származó hulladékok folyamatos nyersanyag-utánpótlást biztosítanak. A mezőgazdasági hulladékok alkalmazásainak további előnyei:

- nem jelent plusz földhasználatot
- költséghatékony
- alkalmazásával csökkenthető a nettó CO₂ kibocsátás, mivel kevesebb fosszilis energiára van szükség
- csökken a függőség a fosszilis energiától
- a növények nem élelmiszer előállítására termesztett részét használja, ezért nem jelent veszélyt az élelmiszer ellátásra

Mivel képződéséhez napenergiára is szükség van, ezért ez jó és fontos megújuló nyersanyagforrás (Aimaretti, 2012), és így a Földre érkező napenergia nagyobb részét tudnánk hasznosítani.

A biomassa előkezelése kulcslépésnek is tekinthető, mivel képes átalakítani a lignocellulóz struktúráját, így megkönnyítve az enzimek munkáját, és növelve a felszabaduló cukrok mennyiségét (Bahcegul, 2012). A lignocellulóz, így a cellulóz stabil, kristályos szerkezete ezt az átalakítást nagyon nehézvé (Sindhu, 2016) és energiaigényessé teszi. Ennek megkönnyítésére jelenthet alternatívát az ionos folyadékok alkalmazása, mivel ezek képesek bontani a cellulózban található H-híd kötésekét. Az így kapott lazább szerkezetű cellulózhoz a celluláz enzimek már jobban hozzáférnek, és hatékonyabban tudják hidrolizálni azt.

Az ionos folyadékok alkalmazása két fő zöld kémiai elvnek is eleget tesz: környezetbarát oldószer és megújuló nyersanyag forrás használata (Zhu, 2006). Előkezelésre való alkalmazásuk még korai fázisban van, de egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik irántuk (Bahcegul, 2012), mivel kiválthatják a környezetre rendkívül veszélyes, illékony szerves oldószereket.

A kőolajhoz való ragaszkodásunk, a környezetbarát technológiák hiánya, a cellulóz átalakításának nehézségei és a kevés használható oldószer hátráltatták a cellulóz még nagyobb mértékű kihasználását. Ugyanakkor a sok nyersanyagot és energiát használó iparágaknak szükségük van alternatív, megújuló nyersanyagforrásokra és technológiákra, hogy csökkentsék a fosszilis forrásból származó nyersanyag és energiaigényt, ezáltal környezetbaráttá téve a technológiát. Az alternatív technológiákra megoldás lehet az enzimes katalízis, mivel enyhébb reakciókörülményeket igényel, mint a kémiai katalízis, és szelektíven katalizálják a reakciókat, gyorsabbá téve őket. Enzimeket már most is sok iparágban használnak, mint például papíripar, textilipar, detergensok előállítása, stb. A cellulózból származó cukor megújuló alapanyag lehet, mivel platform vegyületnek tekinthető (Abels, 2013). Cukorból legegyszerűbben bioetanol készíthető fermentálással. Ezen kívül enzimes reakciók során összetettebb vegyületek építőegysége is lehet. Egyik ilyen bonyolultabb eljárás az ionos folyadékban történő észterezés, amely alkalmával a bioetanolnál értékesebb felületaktív anyagokat lehet előállítani, melyeket számos ipar használ.

Habár az ionos folyadékokat zöld oldószereknek nevezik, nem szabad elfelejteni, hogy ezek mesterséges, bonyolult kémiai eljárásokkal előállított vegyületek, így fontos vizsgálnunk az esetleges kijutásuk környezetre kifejtett hatását is. Mivel nagy részük jól oldódik vízben, ezért a vízi környezet van kitéve a legnagyobb veszélynek (Tsarpali, 2015). Lényeges tudni, hogy esetleges környezetbe való kijutásukkor lebomlanak-e vagy felhalmozódnak.

2. Irodalmi összefoglaló

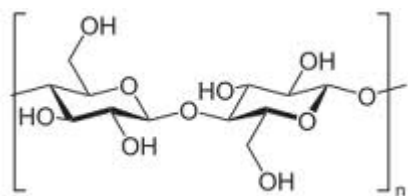
2.1. A biomassa mint megújuló energia- és nyersanyagforrás

2.1.1. Lignocellulóz

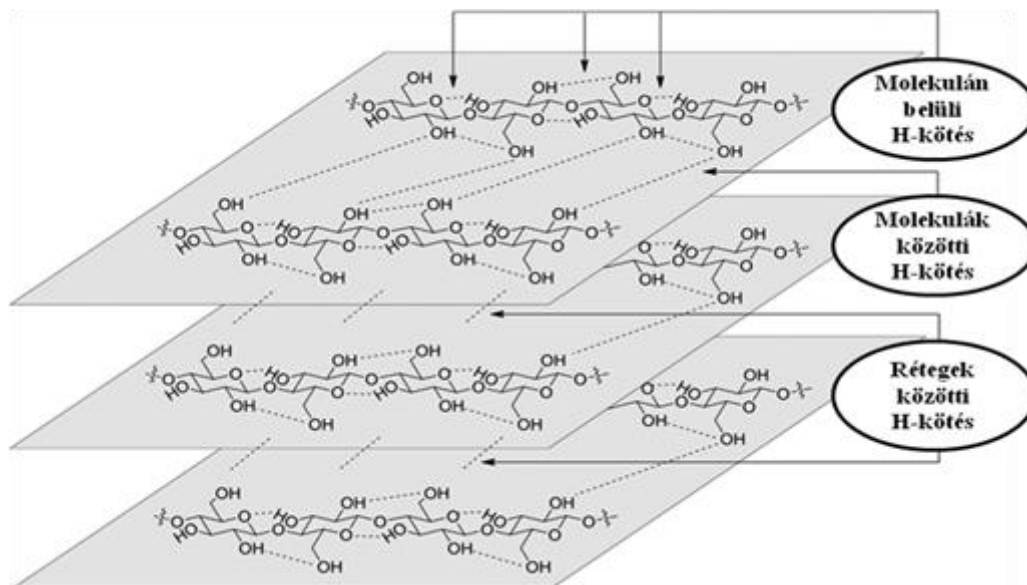
2.1.1.1. A lignocellulóz felépítése

A lignocellulóz tartalmú anyagok három fő polimerből épülnek fel. Ezek a cellulóz, a lignin és a hemicellulóz. A cellulóz az élővilág legnagyobb mennyiségben előforduló anyaga (Sindhu, 2016; Gupta, 2015; Kumar, 2008a).

A cellulóz (1. és 2. ábra) egy lineáris, rendkívül rendezett (gyakran kristályos) homopoliszaharid amely cellobiózból (D-glukopiranozil- β -1,4-D-glukopiranoz) épül fel (Van Eylen, 2011; Kumar, 2008a; Dadi, 2006). A β -1,4-es glikozidos kötések mellett az egyik glükóz molekula C3-as hidroxil és a másik molekula gyűrűben lévő oxigén atomja között is létrejön hidrogén-híd kötés. Ennek a kétféle kötésnek köszönhető a lánc linearitása, merevsége és oldódási tulajdonságai (Iguchi, 2013). A cellobióz a cellulóz legkisebb ismétlődő egysége (Kumar, 2008a). A biomasszában 35-50%-ban van jelen (Chen, 2017; Sun, 2002).

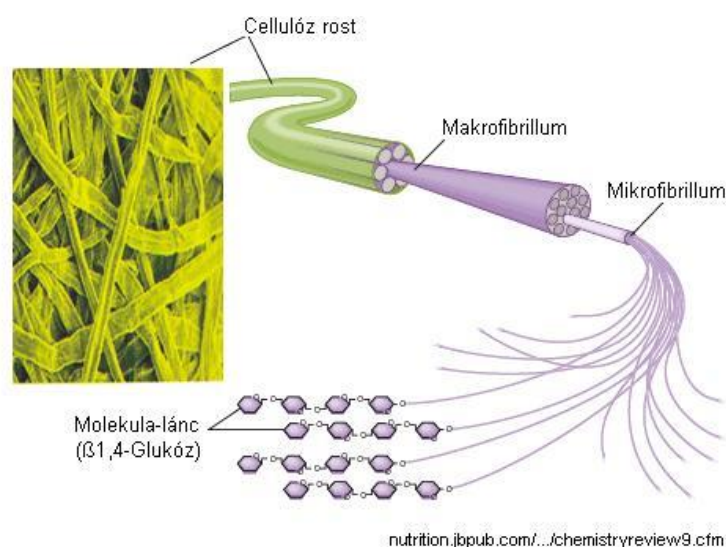


1. ábra: A cellulóz általános szerkezete (Internet 1)



2. ábra: A cellulóz szerkezete (Bhaumik, 2015)

A cellulózból kialakuló polimer szálakat erős hidrogénkötések és Van der Waals kötéserők tartják össze (Dadi, 2006; Swatloski, 2002). Egy szál akár néhány ezer glükóz egységből is állhat (Elgharbawy, 2016) (3. ábra).

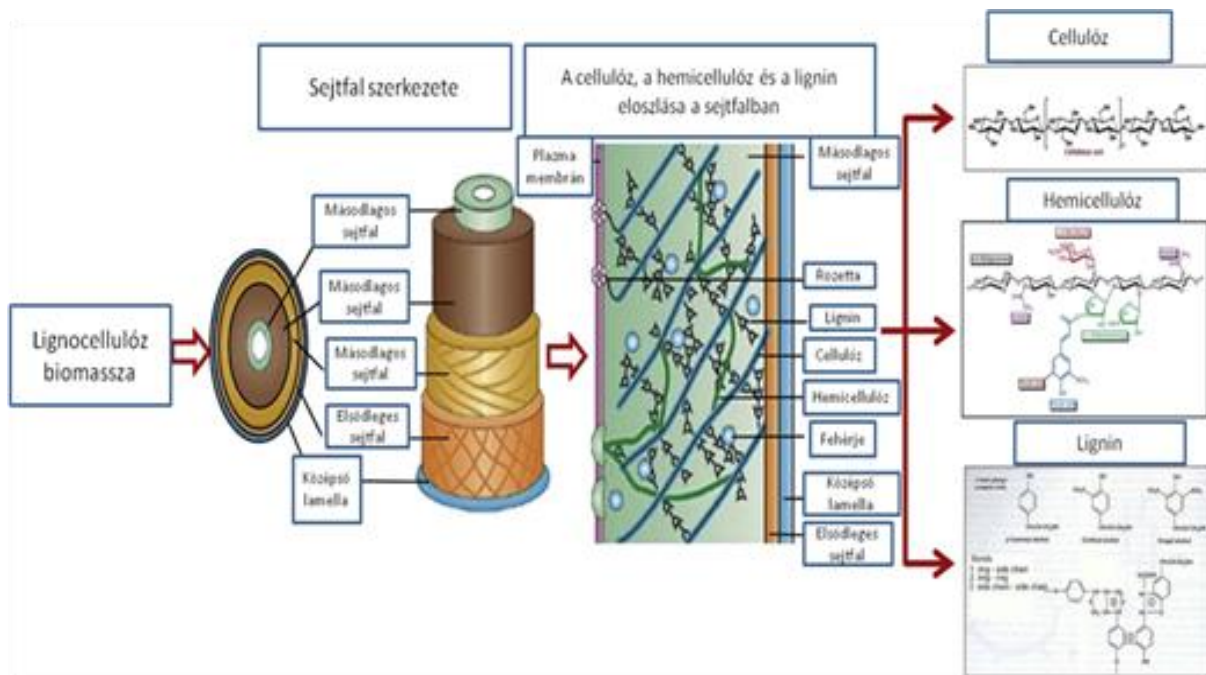


3. ábra: A cellulóz rost szerkezete (Internet 2)

A lignin egykomplex aromás polimer (Jönsson, 2016) amely háromdimenziós hálózatot épít fel dimetoxil (S), monometoxilált (G) és nem-metoxilált (H) fenilpropanoid egységekből (Xu, 2015; Kumar, 2008a). Ezek p-hidroxi-fahéjalkoholokból származnak (Kumar, 2008a). A lignin rendkívül ellenálló kémiai és biológiai bontásokkal szemben, így mechanikai és kémiai védelmet biztosít (Yoo, 2017; Xu, 2015; Yuan, 2013; Kumar, 2008a). A középső lamellában

található meg a legnagyobb mennyiségben, ahol a rostok között a cementhez hasonló kötő szerepe van. Emellett a külső rétegben is megtalálható (főleg a másodlagos sejtfalban). Itt a hemicellulózzal amorf mátrixot alkotnak, amibe beágyazódva találhatók a cellulóz rostok, így védve őket meg a biológiai bontástól. A háromféle lignin arányának megfelelően (H:G:S) különbséget tehetünk a különböző növények között. A fás nyitvatermőkben (puhafák) van a legnagyobb lignin tartalom, és ez főleg a G alegységből épül fel. A fás zárvatermőkben (keményfák) az S és G alegységek dominálnak. A nem-fás zárvatermőkben mind a három alegység megtalálható. A lignin összetétel változhat a szövetek és a sejtfal rétegek között (Kumar, 2008a). A biomasszában 15-20%-ban fordul elő (Chen, 2017; Sindhu, 2016; Zhao, 2009) és a cellulóz után a második legbőségebb anyag a természetben (Pollegioni, 2015).

A hemicellulóz egy heterogén-polimer, amely különböző pentózokból (D-xilóz, D-arabinóz) és hexózokból (D-mannóz, D-glukóz, D-galaktóz) és glukóz savakból (Kumar, 2008a; Mosier, 2005; Carpita, 1993) épül fel, amik gyakran acetiláltak és elágazó szénláncot tartalmaznak (Martínez, 2005). A puhafákban általában glukomannán, a keményfákban főleg xilán alkotja különböző százalékban galaktózzal, arabinózzal, ramnázzal és metilglukuron savval (Van Eylen, 2011; Huisman, 2000; Kumar, 2008a; Martínez, 2005). A lignocellulóz biomasszában 25-35%-ban fordul elő (Chen, 2017; Sindhu, 2016; Kumar, 2008a), ezért bőséges megújuló biomassza (Kumar, 2008a). A hemicellulóz hidrogén híd kötésekkel kapcsolódik a cellulózhoz és így alakítják ki a sejtfal vázát (Sindhu, 2016). A rostok lényegesen rövidebbek, és a láncok gyakran elágazódást tartalmaznak. Kémiai ellenálló képességük kisebb a cellulózéénál. A kristályos régiók hiányának és az alacsony polimerizáltsági foknak köszönhetően könnyen bontható (Chen, 2017; Jönsson, 2016). A lignocellulóz tartalmú biomassza felépítésének bonyolultságát és összetettségét a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra: Lignocellulóz felépítése (Menon, 2012)

A további nem strukturális elemek között vannak extraktívumnak nevezett szerves oldatok, amik lehetnek polárosak (fenol, csersav) vagy nem-polárosak (zsírok, szterolok), vízzeloldható vegyületek (cukrok, keményítő), és fehérjék (Jönsson, 2016; Shindu, 2016; Martínez, 2005). Néhány puhafában ezek a fa száraz tömegének akár a 20%-át is elérhetik, de általában kevesebb, mint 5%-ban fordulnak elő (Martínez, 2005). A növények színének és illatának kialakításában, valamint a paraziták elleni védelemben van szerepük (Jönsson, 2016).

Ennek a bonyolult szerkezetnek köszönhetően a növényi részek nehezen bonthatók, emészthetők (Wang, 2010; Hayes, 2009; Zhao, 2009), és nehéz kinyerni belőlük a cellulózt. Vízben oldhatatlan (Chang, 2000) és a cellulázok is csak nehezen férnek hozzá, ezért előkezelés szükséges (Sindhu, 2016; Gupta, 2015; Dadi, 2006), hogy a felszabaduló redukáló cukor mennyiségét növelni, a reakció időt pedig csökkenteni lehessen.

A lignocellulóz tartalmú biomassza az egyik legfontosabb megújuló nyersanyagforrás. Ipari vagy mezőgazdasági mellékterméket használva, melyek nem versenyeznek az élelmiszer ellátással, használatuk gazdaságos lehet (Elgharawy, 2016).

2.1.1.2. Lignocellulóz bontásában részt vevő enzimek

A cellulóz bontásában a cellulázok vesznek részt, melyek hidrolízissel bontják azt. Három fő fajtája van: endoglukanáz, exoglukanáz és a β -glukozidáz (Abels, 2013; Kalyani, 2013). Az

endoglukanáz random hasítja a cellulóz láncot. Az exocelluláz a cellulóz lánc végéről hasít le cellobióz egységeket. A β -glukozidáz glükóz monomerekre hasítja a cellobiózt (Abels, 2013; Lozano, 2014, Kumar, 2008a; Zhang, 2004). Több tanulmány is bizonyítja, hogy ezek indukálható enzimek (Kumar, 2008a), de mindegyiknél fellép a termékgátlás (Abels, 2013).

A hemicellulóz bontásában sokféle enzim vesz részt. A xilán bontásért például az endo-1,4- β -xilanáz, a β -xilozidáz (Shindu, 2016; Kumar, 2008a), az α -glukuronidáz, az α -L-arabinofuranozidáz és az acetilxilán észteráz felelősek a természetben. A glukomannán bontásában a β -mannanáz és a β -mannozidáz vesznek részt (Kumar, 2008a).

A baktériumokban a cellulázok egy nagy komplexet is alkothatnak, amit celluloszómának neveznek. Ez egy nagy molekula (2000 kDa), mely extracellulárisan kapcsolódik össze. A többféle alegység egymás munkáját segíti. Hatékonyan bontja a glikozidos kötéseket. Ez az enzim komplex a sejten kívül helyezkedik el, de horgonyzó fehérjék a sejthez kötik (Kumar, 2008a).

Az enzimes hidrolízis előnye, hogy az enzimek specifikusan bontják a rendelkezésükre álló szubsztrátot, így elkerülhető a melléktermékek keletkezése (Lozano, 2014). Ennek két fő lépése van. Az első az enzim megkötődése a cellulózon, a második pedig az enzim-szubsztrát komplex kialakulása (Elgharbawy, 2016).

A vizes közegű enzimes hidrolízis lassú folyamat, mivel a cellulóz egy vízzoldhatatlan biopolimer (Dadi, 2006), ezért ez a lépés a fő limitáló a lignocellulóz átalakításában (Sindhu, 2016). A szorosan álló cellulóz rostok kizárják az enzimeket (Lynd, 2002), ezért vagy a cellulóz szabályos szerkezetét kell megbontani, vagy a keletkező terméket kell eltávolítani (Abels, 2013). Celluláz enzimeket például a papíriparban a farostok puhítására használják (Jegannathan, 2013).

2.1.1.3. Cellulóz előkezelése napjainkban

Az előkezelés a legenergiaigényesebb (Sindhu, 2016) és költségesebb (Reina, 2016; Mosier, 2005) lépés a biomassza átalakításában. A módszer kiválasztása alapjaiban határozza meg a felszabaduló cukor mennyiségét (Bahcegul, 2012) illetve az egyéb downstream folyamatokat (Sindhu, 2016). A cellulóz oldhatatlan vízben és a legtöbb hagyományos szerves oldószerben (Yoo, 2017; Swatloski, 2002), ezért előkezelést kell végezni (Wang, 2010; Mosier, 2005). Az előkezelés hatására megváltozik a biomassza mikro- és makroszkópos mérete valamint a szerkezete, mely fellazul, duzzad (Chen, 2017; Sindhu, 2016). Az oldódás hatására homogén reakciófázis jön létre (Swatloski, 2002). A napjainkban használt eljárások (pl: réz-oxid és xantán

eljárás) nehézkesek, drágák és a használt oldószerek komoly környezeti problémákat okoznak, mivel nem regenerálhatók (Zhu, 2006). További hátrányuk, hogy speciális eszközöket igényelnek és a későbbi enzimes hidrolízisre, illetve fermentálásra káros, gátló anyagok képződnek. Csökken továbbá a fermentálható cukor mennyisége is (Weerachanchai, 2017; Sindhu, 2016). A gátló anyagok az előkezelés módjától függően főleg a ligninből és/vagy a hemicellulózból képződnek (Jönsson, 2016), ezért olyan előkezelést kell választani, ahol nő a cukor felszabadulás mellékreakciók és szénhidrát veszteség nélkül (Weerachanchai, 2017).

Attól függően, hogy milyen erők játszanak benne szerepet, beszélünk biológiai, kémiai, fizikai és fizikai-kémiai előkezelésről (Gupta, 2015; Chandra, 2007).

- A biológiai előkezelésben baktériumok és gombák vesznek részt (Sindhu, 2016; Gupta, 2015), de a cellulózt nem tudják hatékonyan bontani, ezért a polimerizáció foka nem csökken jelentősen. Az előkezelés során nem keletkeznek a későbbi hidrolízisre nézve gátló melléktermékek az enyhébb reakciókörülmények miatt (Sindhu, 2016).
- A fizikai előkezelés során az őrlés és a darálás energiaigényes (Gupta, 2015; Menon, 2012), ezért ipari alkalmazása kerülendő.
- A kémiai és fizikai-kémiai eljárások (pl: gőzrobbantás, SO₂-gőzrobbantás, savak, lúgok) hátránya a vegyszer igény, ezek ára és az előkezelés során keletkező melléktermékek (alifás savak, furaldehid, aromás vegyületek), amelyek enzim inhibitorokként viselkednek (Auxenfans, 2012; Menon, 2012; Van Eylen, 2011; Martin; 2003), valamint a felszabaduló cukor is tovább bomlik (Pengilly, 2015). Enyhébb reakciókörülmények között kevesebb cukor bomlik el, viszont hemicellulóz marad az előkezelés után, és csökken a cellulóz hozzáférhetősége a további enzimes hidrolízishez (Pengilly, 2015).

Az előkezelés során segíteni kell az enzimes hidrolízist, minimalizálni kell a szénhidrát veszteséget és költséghatékonynak kell lenni (Sun, 2002). Egy ideális előkezelés során elkerülhető a biomassza méretének csökkentése, és a gyors hidrolízis nagy mennyiségű cukor felszabadulással jár inhibitorok minimális képződése mellett (Gupta, 2015).

A fentiek miatt új eljárások kidolgozása szükséges a gazdaságos, környezetbarát cellulóz feldolgozáshoz, amelyre az egyik lehetséges mód az ionos folyadékok alkalmazása és kombinálása enzimekkel. Az ionos folyadékos előkezelés hagyja a legkevesebb enzim inhibitor az előkezelt anyagban (Reina, 2016), míg az enzimek célzottan bontják a cellulózt.

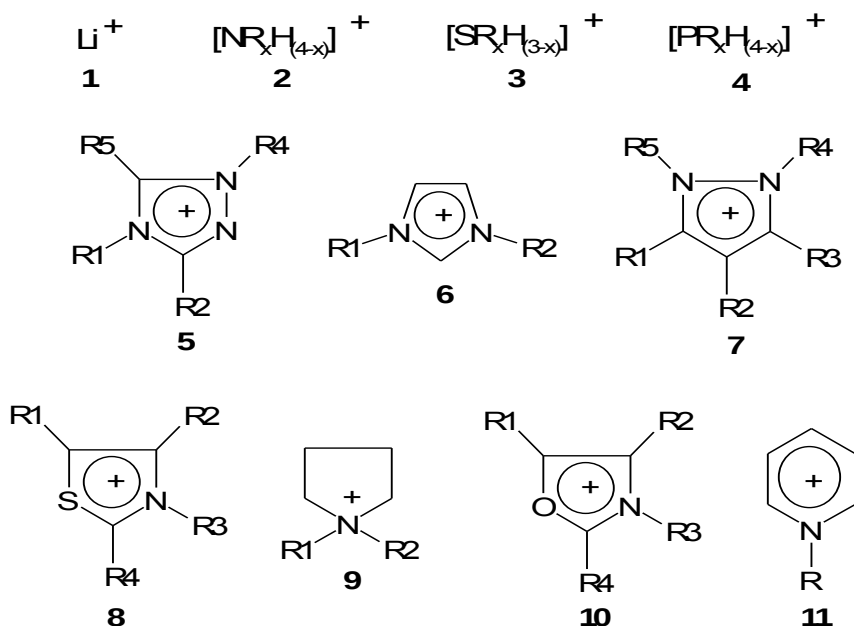
2.2. Ionos folyadékok

2.2.1. Az ionos folyadékok általános jellemzői

Az ionos folyadékok olyan alacsony olvadáspontú (100 °C alatt) sók (Wang, 2010), melyek kizárólag ionokból állnak, magas hőmérsékleten sem párolognak, nem illékonyak, nem gyúlékonyak (Auxenfans, 2012; Łuczak, 2008; Lozano, 2011; Wang, 2010), hőstabilak, kémiaiilag stabilak (Ganske, 2006; Zhu, 2006) és nagy az elektrokémiai stabilitásuk (MacFarlane, 2014). Jól oldódnak szerves, szervesetlen és fémorganikus vegyületekben (Harjani, 2009). Az alacsony olvadáspont az aszimmetrikus szerves kationnak köszönhető, mely csökkenti a rácsenergiát (Łuczak, 2008), valamint, hogy az ionos folyadékot felépítő ionok gyengén koordináltak (Megaw, 2015). Előnyük a nagy vezetőképesség (Montalbán, 2016; Stolte, 2007) és mivel nem párolognak nincs oldószer veszteség párologáson keresztül (Romero, 2008). Jó oldószerek kémiai és biokatalitikus reakciókhoz (Fernández, 2015; Ganske, 2006). A jó oldási képességük miatt hatékonyan tudnak oldani polimereket és komplex makromolekulákat (Tan, 2012). A tulajdonságaiknak köszönhetően egyre nagyobb az érdeklődés az ipari alkalmazásuk iránt a párologó szerves oldószerek alternatívájaként (Costa, 2015). Mivel zöld oldószereknek tervezték őket, leválthatják a párologó szerves vegyületeket (Elgharbawy, 2018).

Az ionos folyadékok nagy szerves kationból (ammónium, imidazolium, piridinium, piperidinium vagy pirrolidium) és az ehhez kapcsolódó, változatos hosszúságú alkil oldalláncból, valamint szerves vagy szervesetlen anionból épülnek fel (Grzonkowska, 2016; Liu, 2015; Passos, 2014). Szinte korlátlan variációban állíthatók elő (Fehér, 2007; Harjani, 2009; Stolte, 2007; Swatloski, 2002), mivel a felépítő anionok és kationok száma tetszőlegesen, majdhogynem korlátlanul kombinálható. A nagy változatosság ellenére a legtöbbet használt az 1-alkil-3-metilimidazolium, mivel nem párolog, nem gyúlékony, hő- stabil, valamint sokféle szerves és szervesetlen anyagot tud oldani (Romero, 2008). Ezen belül is az 1-alkil-3-metilimidazolium-klorid típusú ionos folyadékok az első ipari méretekben használt ionos folyadékok csoportjába tartozik (Megaw, 2015).

A 5. és 6. ábrákon, a teljesség igénye nélkül, feltüntettem néhány kation és anion szubsztituálási lehetőséget (Brandt, 2013; Fehér, 2008).



5. ábra: Leggyakoribb kationok: 1. lítium-, 2. ammónium-, 3. szulfónium-, 4. foszfónium-, 5. triazolium-, 6. imidazolium-, 7. pirazolium-, 8. thiazolium-, 9. pirrolidínium-, 10. oxazolium-, 11. piridínium-ionok különböző mértékben szubsztituálva, ahol R_x lehet: H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ ($n=0, 1, 2, 3, \dots$), aril-, stb. (Fehér, 2008)

Nem vízdoldható		Vízoldható	
1 $[\text{PF}_6]^-$		9 $[\text{CF}_3\text{CO}_2]^-$	
2 $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$		10 $[\text{CH}_3\text{CO}_2]^-$	
3 $[\text{BR}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4]^-$		11 $[\text{NO}_3]^-$	
4 $[\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3\text{SO}_2]^-$	6 $[\text{CF}_3\text{SO}_2]^-$	12 $[\text{Al}_2\text{Cl}_7]^-$	
5 $[\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3\text{CO}_2]^-$	7 $[\text{BF}_4]^-$	13 $[\text{AlCl}_4]^-$	
	8 $[\text{N}(\text{CN})_2]^-$	14 $[\text{Cl}]^-$	
		15 $[\text{Br}]^-$	

6. ábra: Az ionos folyadékok leggyakoribb anionjai csoportosítása vízdoldhatóságuk szerint (Fehér, 2008)

A nagyszámú kombinációs lehetőségnek köszönhetően az ionos folyadékok tulajdonságai alakíthatók (Megaw, 2015; Passos, 2014; Romero, 2008; Kumar, 2008b; Fehér, 2007), „méretre szabhatók”. Egy becslés szerint több mint 10^6 különböző ionos folyadék készíthető (Montalbán, 2016). Arra is van lehetőség, hogy modellező szoftverek segítségével

kiválasszuk a valószínűleg legmegfelelőbb ionos folyadékok körét a feladatunk megoldásához (Fehér, 2007).

Van olyan ionos folyadék, amelyik egyáltalán nem toxikus, jelenlegi tudásunk szerint nem károsítja a környezetet (Wang, 2010), így zöld oldószerként jól alkalmazható. Regenerálhatóak például ioncserével, reverz ozmózissal (Zhu, 2006), extrakcióval (Abels, 2013) és újra felhasználhatóak (Auxenfans, 2012; Stepnowski, 2007; Zhu, 2006).

Az ionos-folyadékok alkalmazásainak lehetőségei:

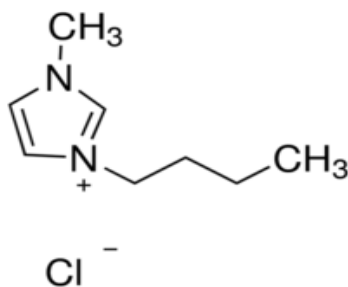
Energetika:	elemek üzemanyagcella termofluidok
Biotechnológia:	biokatalízis protein tisztítás
Vegyipar:	extrakció folyékony membránok elválasztás
Kémia:	polimerizáció katalízis szerves szintézis
Bevonat:	fémleválasztás mosószeresek síkosítók
Egyéb:	olajok nanoszemcsék folyadékkristályok kromatográfiás szilárd fázis (Yoo, 2017; Grzonkowska, 2016; Montalbán, 2016; Salam, 2016; Pham, 2010)

A cellulóz szálakban lévő hidrogén híd kötések bontásában az anionok játszik a fő szerepet (Elgharbawy; 2016). Irodalmi adatok alapján a hosszú oldalláncot tartalmazó ionos-folyadékok kevésbé hatékonyan oldják a cellulózt, viszont ezek szobahőmérsékleten is folyékonyak. A gyengén vagy nem koordináló anionokat tartalmazó ionos folyadékok sem oldják hatékonyan a cellulózt (Swatloski, 2002). A nagyméretű kationok csökkentik az anionnak a cellulóz hidroxil csoportjához való kötődését és ezáltal a cellulóz oldhatóságát (Elgharbawy; 2016). Cellulózoldásra alkalmas ionos folyadékot e tulajdonság figyelembe vételével érdemes választani (Swatloski, 2002).

Széleskörű lignin és cellulóz oldási képességgel rendelkeznek az imidazoliumon alapuló kationok (Xu, 2015). Ezen belül is az 1,3-dialkil-imidazolium típusú ionos folyadékok oldják hatékonyan a cellulózt (Brandt, 2013). Ezek rendezett háromdimenziós szerkezettel rendelkeznek. Ezekben a kationok és anionok H-kötésekkel hálózatot alkotnak. Ez kétdimenziós monomer egységekből épül fel úgy, hogy egy aniont minimum három kation vesz körül és fordítva (Fehér, 2007). A butil-metilimidazolium csoportot, melyet második generációs ionos folyadéknak is neveznek, az illékony szerves vegyületek kiváltására tervezték, mivel hőstabilak, alig párolognak és nem gyúlékonyak (Jordan, 2015). Ezen belül az 1-butil-3-metilimidazolium kationt tartalmazó ionos folyadékok sokféle anionnal lehetnek párban, a kicsi, hidrogénkötést elfogadótól (Cl^-) egészen a nagy, nem koordinálóig ($[\text{PF}_6]^-$), ide értve a Br^- , SCN^- és $[\text{BF}_4]^-$ ionokat is (Swatloski, 2002). A kationok mellett az anionoknak is fontos szerepük van az oldott anyagok oldhatóságának meghatározásában (Payal, 2015).

2.2.1.1. 1-n-Butil-3-metil-imidazolium-klorid

Az általam használt 1-n-butil-3-metil-imidazolium-klorid ($[\text{Bmim}]\text{Cl}$) (7. ábra) imidazolium szerves kationt és szervesetlen klorid aniont tartalmazó hidrofil ionos folyadék (Zhu, 2006). Összegképlete: $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{ClN}_2$, moláris tömege pedig 174,68 g/mol. Olvadáspontja 60°C körül van, a tisztított cellulózt 100°C -on 20 tömeg %-ig oldja.

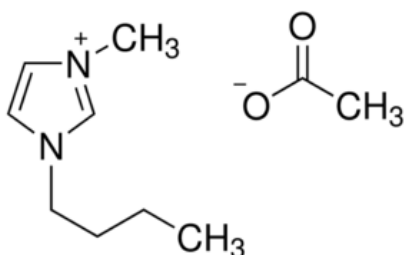


7. ábra: $[\text{Bmim}]\text{Cl}$ sematikus ábrája (Internet 1)

A cellulóz származékok képződése nélkül oldódik benne (Zhu, 2006). Feltételezhetően a klorid ionok aktivitása játszik jelentős szerepet a hidrogén híd kötések felbontásában (Elgharrawy, 2016; Zhu, 2006; Swatloski, 2002). A klorid anion a szabad hidroxil csoportokhoz kapcsolódik és deprotonálja a cellulózt (Dadi, 2006). Ezzel lehet a legnagyobb mértékben oldani a cellulózt (Lozano, 2011; Swatloski, 2002), bár irodalmi adatok szerint az enzimek gyors dezaktiválódását okozza (Lozano, 2014).

2.2.1.2. 1-n-Butil-3-metil-imidazolium-acetát

A kutatásba bevont 1-n-butil-3-metil-imidazolium-acetát ([Bmim]Ac) (8. ábra) szintén imidazolium szerves kationt tartalmaz, de az előzőhöz képest szerves acetát anion van benne. Szintén hidrofil, összegképlete: $C_{10}H_{18}N_2O_2$, moláris tömege 198,26 g/mol, olvadáspontja -20°C körül van.



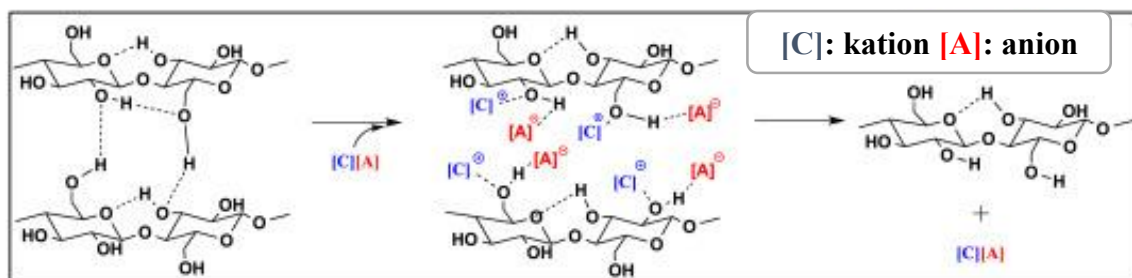
8. ábra: [Bmim]Ac sematikus ábrája (Internet 2)

Habár a nagyobb anion méretnek köszönhetően csökken benne a cellulóz oldhatósága (Elgharbawy, 2016), de irodalmi adatok alapján az várható, hogy az enzimeket kevésbé dezaktiválja (Bahcegul, 2012).

2.2.2. A cellulóz előkezelés ionos folyadékban

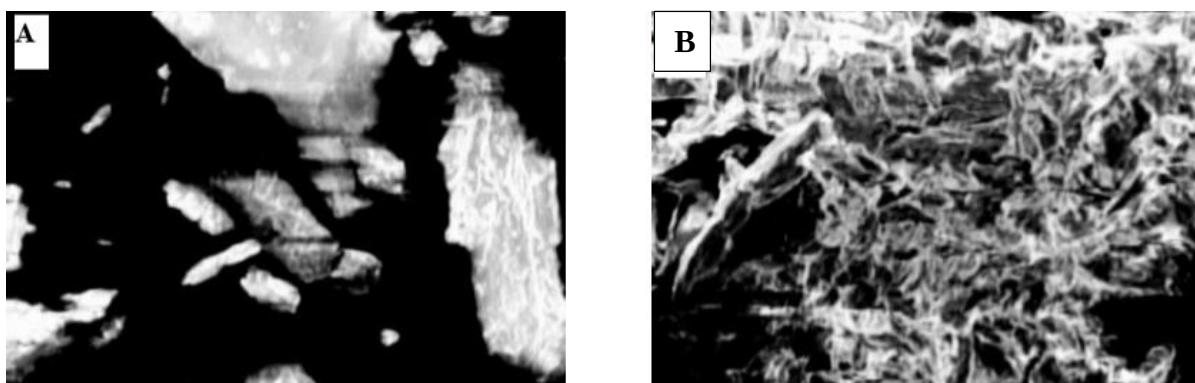
Az ionos folyadékos előkezelés a kémiai előkezelések csoportjába tartozik. Graenacher már 1934-ben felfedezte, hogy nitrogén tartalmú bázisok jelenlétében az N-etilpiridinium képes oldani a cellulózt (Zhu, 2006; Swatloski, 2002).

Az ionos folyadékok a lignocellulóz biomassa széles skáláját tudják részben vagy egészben oldani (Bahcegul, 2012; Lozano 2011) anélkül, hogy a cellulóz kémiai átalakuláson menne keresztül (Iguchi, 2013). Feltételezhetően a vízmentes közeg miatt a hidrogénkötésben részt vevő hidrogén az anionhoz, míg a kation az oxigénhez kötődik (9. ábra) (Payal, 2015; Auxenfans, 2012; Zhu, 2006). Ez segít a molekulán belüli és a molekulák közötti hidrogén híd kötések felbontásában és ezáltal az oldódásban (Auxenfans, 2012). Ennek eredményeként a celluláz enzimek hatékonyabban hidrolizálják a cellulózt (Reina, 2016; Auxenfans, 2012; Bahcegul, 2012). A [Bmim]Cl ionos folyadék esetében a nagy klorid ion koncentráció és aktivitás segíti a kiterjedt hidrogén-híd kötési rendszer bomlását, ezáltal nagyobb mennyiségben oldja a cellulózt és a celluláz enzimek munkáját is megkönnyíti a hagyományos rendszerekhez képest (Abels, 2013; Swatloski, 2002).



9. ábra: Cellulóz oldódása ionos folyadékban (Yoo, 2017)

Elektronmikroszkópos felvételeken (10. ábra) (Saher, 2018) láthatóak, hogy a mikrokristályos cellulóz szerkezete hogyan változik meg ionos folyadékos előkezelés hatására. A felvételeken jól látható, hogy a cellulóz merev, rendezett szerkezete fellazul az előkezelés hatására és amorfabb lesz, így könnyítve az enzimes hidrolízist.



10. ábra: A: mikrokristályos cellulóz elektronmikroszkópos felvétele; B: mikrokristályos cellulóz elektronmikroszkópos felvétele ionos folyadékos előkezelés után (Saher, 2018)

Az ionos folyadékok hatása függ a biomasszától, annak lignin és hemicellulóz tartalmától, (Auxenfans, 2012) illetve a biomassza őrlmény szemcséinek méretétől (Bahcegul, 2012). A szemcseméret csökkentése energiaigényes, és növeli a keletkező termék árát (Bahcegul, 2012). Az előkezelés hosszának növekedése pedig kismértékben csökkenti az ionos folyadék hatékonyságát (Auxenfans, 2012).

Korábbi cellulóz oldási eredményeket az 1. táblázatban, míg biomassza oldhatóságának eredményeit a 2. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat: Cellulóz oldódása különböző ionos folyadékokban

Ionos folyadék	Előkezelés módja és hőfoka	Keverés módja	Oldhatóság (%)	Forrás
[Bmim]HCOO	melegítés (110 °C)	mágneses keverő	<5%	Xu, 2015
[Emim]MeSO ₄	melegítés (110 °C)	mágneses keverő	<5%	Xu, 2015
[Bmim]Cl	melegítés (100 °C)	n.a.	10%	Swatloski, 2002
	melegítés (70 °C)	n.a.	3%	Swatloski, 2002
	melegítés (105-110 °C)	n.a.	5%	Sathitsuksanoh, 2012
	melegítés (80 °C) + ultrahang	n.a.	5%	Swatloski, 2002
	melegítés (110 °C)	mágneses keverő	8%	Xu, 2015
[Bmim]Br	mikrohullámú melegítés	keverés vagy vortex	5-7%	Swatloski, 2002
[Bmim]SCN	mikrohullámú melegítés	keverés vagy vortex	5-7%	Swatloski, 2002
[Bmim]BF ₄	mikrohullámú melegítés	keverés vagy vortex	oldhatatlan	Swatloski, 2002
	melegítés (110 °C)	mágneses keverő	<5%	Xu, 2015
[Bmim]PF ₆	mikrohullámú melegítés	keverés vagy vortex	oldhatatlan	Swatloski, 2002
	melegítés (110 °C)	mágneses keverő	<5%	Xu, 2015

n.a. – nincs adat

2. táblázat: Biomassza oldása különböző ionos folyadékokban

Ionos folyadék	Biomassza fajtája	Előkezelés hőfoka	Keverés módja	Oldhatóság (%)	Forrás
[Bmim]Cl	rizsszalma	melegítés (110 °C)	mágneses keverő	10%	Xu, 2015
[Bmim]Cl	olaj pálmalevél	120 °C	mágneses keverő	12%	Tan, 2012
[Bmim]Cl	kukoricaszár	105-110 °C	n.a.	5 %	Sathitsuksanoh, 2012
[Bmim]Ac	szalma	125 °C	mágneses keverő	4 %	Guragain, 2011
[C ₂ mim]OAc	kukoricaszár és levél	160 °C	n.a.	3%	Li, 2011
[C ₂ mim]OAc	köles, fenyő, eukaliptusz	120, 160 °C	n.a.	3%	Singh, 2013

n.a. - nincs adat

A táblázatokból látható, hogy kis koncentrációban oldották fel a tisztított cellulózt, illetve a biomasszát az ionos folyadékokban. Ez azzal magyarázható, hogy nagyobb koncentrációban sűrű lesz a minta és nehéz homogenizálni. Rázógépben rázatva, vagy mágneses keverővel nehéz feloldani őket. Ennek a problémának megoldása lehet külső keverők alkalmazása, amelyek nagyobb erővel, hatékonyabban keverik meg a mintát. A homogén reakció előnye, hogy új bomlási utak nyílnak meg és kontrollálni lehet a keletkező terméket (Zhu, 2006).

Eddigi kísérletek során az előkezelés után az ionos folyadékot ioncserélt desztillált vízzel vagy etanollal kicsapatták. Ezután a cellulózt tisztították, szárították és így végezték el vele a hidrolízist. A hidrolízis mértéke egy-másfél nagyságrenddel növekedett a kezeletlen mintákhoz képest, azonban az előkezelt cellulóz tisztítása és szárítása nehézkes és drága. A cellulóz előkezelése és enzimes hidrolízisének egy reakciótérben történő lejátszásával ennek a két lépésnek az idejét és energiaigényét meg lehet spórolni.

2.3. Glükóz-palmitát enzimatisz előállítása

Egyre nagyobb az érdeklődés a vegyszerek környezetbarát módon történő előállítása iránt. A hagyományos felületaktív anyagok nagyrészt a petrokémiai iparból származnak, így előállításuk környezetszennyező, valamint biológiailag nehezen bonthatók (Ren, 2017). Ezzel szemben az enzimes reakció egy különleges kémiai reakció, ahol az enzim a katalizátor, és ez növeli a reakció sebességét (Papamichael, 2012). A nagyobb szelektivitáson túl az alacsonyabb

hőmérséklet és a termékek könnyebb szeparációja is jelentős előnye az enzimes észterezésnek, a hagyományos kémiai szintézishez képest (Ren, 2017). A reakció sok paramétertől függ, mint például az enzim stabilitása, szelektivitása, anyagtranszport, enzim és szubsztrát koncentráció, víztartalom (Stergiou, 2013; Zaks, 1988). Az ionos folyadékok jó közegek biokatalízisekhez, mivel nem denaturáló közeg a szubsztrátok számára, valamint megmarad az enzimek szerkezete és aktivitása (Passos, 2014). Ezenkívül változtatható a kémiai szerkezetük, így különböző szubsztrátokat tudnak oldani (Ren, 2017). További előnyük a nagyobb reakciósebesség és szelektivitás, miközben növekszik az enzimek újrahasználatossága is (Elgharbawy, 2018).

A cukor-zsírsav észterek egy cukor és egy zsírsav között lejátszódó észterezési reakcióval állíthatók elő (Gumel, 2011), ahol a lipáz enzim katalizálja az észter kötés létrejöttét (Ren, 2017). A lignocellulózból származó glükóz és a természetes forrásból származó palmitinsav jó alapanyagok cukor-zsírsav észter (sugar fatty acid ester-SFAE) előállítására.

2.3.1. Lipáz enzimek

A széles körben használt lipáz enzimmel történő cukor-észter előállításához olyan vízmentes oldószer szükséges, amely képes oldani a szubsztrátokat (Stergiou, 2013; Gumel, 2011), mivel ezek aránya befolyásolja az észterezést, és nem deaktiválja az enzimet (Arcens, 2018). Mivel a glükóz poláros, a zsírsav nem poláros és a cukor-észter amfifil, ezért a megfelelő oldószer kiválasztása nehéz (Liang, 2012; Lee, 2008a). A szerves oldószerekkel szemben az ionos folyadékok nagy előnye, hogy nem párolognak, termikusan és kémiaiilag stabilak, valamint képesek oldani szerves-, szervetlen-, poláros- és nem poláros anyagokat, illetve polimereket (Liang, 2012; Lee, 2008a). Az oldószer az enzim stabilitásra és enantioszelektivitásra is nagy hatással van (Gumel, 2011). Az ionos folyadékok alkalmazásának további előnyei, hogy növelik az enzimek reaktivitását és szelektivitását (Elgharbawy, 2018; Liang, 2012; Lee, 2008a).

A lipázok nagyon stabil enzimek (Stergiou, 2013), melyek lipidek hidrolízisét katalizálják vizes közegben a lipid-víz határfelületen (Reis, 2009; Gupta, 2004). Használják például az élelmiszeriparban (Elgharbawy, 2018; Pandey, 1999), a gyógyszeriparban, a bőrparban (Jegannathan, 2013) és a papíriparban is (Jegannathan, 2013; Bajpai, 2012). Az enzimek számos szerves oldószerben és alacsony hőmérsékleten is működnek, ezek a leggyakrabban használt enzimek a cukor-zsírsavak előállítása során (Arcens, 2018). Nem vizes közegben a reakció iránya megfordul (Gumel, 2011; Cauglia, 2008; Degn, 1999). Ionos folyadékokban is stabilak (Elgharbawy, 2018), de minimális vízmennyiség szükséges az

enzimek hidratációjához (de Silva, 2015; Gumel, 2011; Humeau, 1998), mely befolyásolja a stabilitásukat, még akkor is, ha a reakcióhoz nem szükséges, nagyobb koncentrációban pedig gátolja a szintézist. A minimálisan szükséges vízmennyiség növeli az enzim aktív helyének polaritását és szerkezeti flexibilitását, míg a túl sok víz enzim aggregációt is okoz (Elgharbawy, 2018).

A lipáz katalizálta reakciók ping-pong bi-bi mechanizmussal írhatók le (Stergiou, 2013). SFAE szintézis során rögzített formában szokták használni őket. A fontosabb lipáz termelő törzsek a *Bacillus*, *Pseudomonas* és a *Bulkholderia* (Gupta, 2004). A leggyakrabban használt enzimek pedig a *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Rhizomucor miehei*. A különböző forrásból származó lipázok különböző katalitikus aktivitással rendelkeznek. Vannak, amik hosszabb, vannak, amik a rövidebb szénláncú zsírsav szubsztrátok reakcióit katalizálják gyorsabban (Gumel, 2011; Vaysse, 2002). A rövidebb szénláncot tartalmazó zsírsavakkal alacsonyabb (35-45 °C), míg a hosszabb szénláncot tartalmazókkal magasabb hőmérsékleten (60 °C) játszódik le jobban a katalitikus észterezés (Gumel, 2011). A katalitikus triád Ser- Asp/Glu-His-ből áll (Reis, 2009; Meier, 2007; Gupta, 2004), mellyel végrehajtja a katalízist (Stergiou, 2013). Az enzim köti a savat és acilezi azt, majd kilép a víz. Az acilezett enzim köt egy cukrot és kialakul az észterkötés. Az acilezés a limitáló lépés (Yu, 2008). A kilépő vizet meg kell kötni, hogy a reakció a cukor-észter képződés felé tolódjon el (Arcens, 2018).

Az általam is használt Novozyme 435 (*Candida antarctica* lipáz B) egy széles körben használt enzim (Ferrer, 2005), amely a leghatékonyabb az észterezésben. 317 aminosavból álló globuláris molekula (Li, 2015). Rögzített enzimmészítmény (Li, 2015; Gumel, 2011), amely sztereospecifikus (Humeau, 1998) és az elágazást nem tartalmazó hosszabb szénláncú zsírsavak iránt mutat nagyobb specificitást (Gumel, 2011). Az O-6-glükóz észterezést szelektíven katalizálja (Liang, 2012), kompatibilis az ionos folyadékokkal, és azokban a magasabb hőmérsékletet is tolerálja (Elgharbawy, 2018).

2.3.2. Felületaktív anyagok

A cukor-zsírsav észterek nem ionos felületaktív anyagok (Li, 2015; Liang, 2012; Lee, 2008a), melyeket olcsó, természetes alapanyagokból lehet készíteni (Arcens, 2018). Biológiai úton bomlanak és alacsony a toxicitásuk (Li, 2015; Gumel, 2011; Degn, 1999). Szagtalanok, íztelenek (Ren, 2017; Gumel, 2011) valamint nem irritálják a bőrt (Ren, 2017), így használja őket az élelmiszeripar, gyógyszeripar, felhasználják őket kozmetikumokban, mosószerekben

(Li, 2015; Gumel, 2011; Yu, 2008). A felületaktív anyagokat előszeretettel alkalmazzák a mosószerekben, mivel feltöltávolító hatásuk van. Néhány azonban toxikus lehet a környezetre (Jegannathan, 2013). A felületaktív anyagok jó detergenssek (Ferrer, 2005; Degn, 1999), hatásukat a szénhidrát és acil csoportok befolyásolják (Arcens, 2018). Közülük néhány rovarölő és fégirtó (Gumel, 2011; Habulin, 2008), de lehet antioxidáns vagy antimikrobiális hatásuk is (Arcens, 2018).

Kémiai előállításuknál átészterezést szoktak alkalmazni a megfelelő zsírsav metil észteréből (Gumel, 2011), mely energiaigényes, valamint toxikus és karcinogén melléktermékeket tartalmaz (Gumel, 2011; Cauglia, 2008). További hátrány, hogy a reakció nem szelektív, védő csoportokat kell alkalmazni (Liang, 2012; Cauglia, 2008; Ferrer, 2005) és a terméket bonyolult eljárással tisztítani kell (Liang, 2012; Habulin, 2008). Ezzel szemben az enzimatisz előállítás lényegesen környezetbarátabb (Li, 2015; Jegannathan, 2013), régió- (Gumel, 2011; Cauglia, 2008), enantio- (Meier, 2007), dia- (Gumel, 2011), és sztereoszelektív (Liang, 2012), így rögtön mono-észter képződik (Arcens, 2018). A környezetbe kijutva pedig lebomlanak (Arcens, 2018; Jegannathan, 2013).

2.3.3. Enzimkatalitikus észterezés ionos folyadékokban

Zhao és munkatársai (Zhao, 2016) 12-féle ionos folyadékban (3. táblázat) vizsgálták az észterezést. 1 ml ionos folyadékban oldottak fel 0,058 g metil-glükózidot és 0,3 M laurinsavat. A reakcióelegyhez 100 mg zeolitot és 20 mg Novozym 435 enzimet adtak. Rázógépben 300 rpm-el rázatva, 45 °C-on 24 óra után a 3. táblázatban szereplő eredményeket kapták.

3. táblázat: Metil-glükózid észterezése laurinsavval különböző ionos folyadékokban (Zhao, 2016)

Ionos folyadék	Konverzió (%)
[Bmim]PF ₆	6,21
[Bmim]BF ₄	22,46
[Emim]MeSO ₄	0,21
[Bmim]MeSO ₄	0,21
[Bmim]Tf ₂ N	5,71
[C ₇ -mim]Tf ₂ N	7,29
[C ₁₂ -mim]Tf ₂ N	6,59
[BTMA]Tf ₂ N	3,74
[HTMA]Tf ₂ N	3,47
[Emim]TfO	2,38
[Bmim]TfO	30,89
[Hmim]TfO	30,67

A táblázat eredményeiből látható, hogy a hidrofil aniont (pl: TfO⁻ és BF₄⁻) tartalmazó ionos folyadékokban magasabb volt a konverzió, mint a hidrofób aniont (pl: PF₆⁻ és Tf₂N⁻) tartalmazókban. A legmagasabb konverziót [Bmim]TfO és [Hmim]TfO ionos folyadékokkal érték el, míg a legalacsonyabbat a MeSO₄⁻-iont tartalmazókkal (Zhao, 2016).

Fischer és munkatársai (Fischer, 2013) 3 g ionos folyadékban (4. táblázat) oldottak fel 10 mmol linolsavat és 5 mmol *D*(+)-maltóz-monohidrátot. A reakcióelegyhez 0,8 g zeolitot (3Å), 0,9 g Novozym 435 enzimet adtak. Inkubátorban 65 °C-on, 350 rpm-en rázatva 3 nap után a 4. táblázatban szereplő eredményeket kapták.

4. táblázat: *D*(+)-maltóz-monohidrát észterezése linolsavval különböző ionos folyadékokban (Fischer, 2013)

Ionos folyadék	Konverzió (%)
[Emim]MeSO ₃	36,8
[Bmpyr]PF ₆	25,1

A táblázatból látható, hogy a vízzeloldható [Emim]MeSO₃ ionos folyadékban magasabb konverziót érték el, mint a vízzel nem elegyedő [Bmpyr]PF₆ ionos folyadékkal (Fischer, 2013).

Katsoura és munkatársai (Katsoura, 2009) 6-féle ionos folyadékban (5. táblázat) oldottak fel ferulin savat és butanolt 50-50 mM-os koncentrációban. A reakcióelegyhez zeolitot (3Å) és 80 mg/ml koncentrációban CALB enzimet raktak. Rázógépben 250 rpm-el rázatták 60 °C-on, 72 órán keresztül és az 5. táblázatban szereplő eredményeket kapták.

5. táblázat: Butanol észterezése ferulin savval különböző ionos folyadékokban (Katsoura, 2009)

Ionos folyadék	Konverzió (%)
[Emim]BF ₄	2,3
[Bmim]BF ₄	3,4
[Omim]BF ₄	7,6
[Emim]PF ₆	23,4
[Bmim]PF ₆	32,9
[Omim]PF ₆	55,6

A táblázatból látható, hogy a legmagasabb konverziót az [Omim]PF₆-al, míg a legalacsonyabbat az [Emim]BF₄-el érték el. Mindkét kation esetében elmondható, hogy az anionhoz egyre hosszabb oldalláncot kapcsolva nő a konverzió, így elmondható, hogy az anion jobban befolyásolja a konverziót (Katsoura, 2009).

A fent említett példákban látszik, hogy CALB enzimmal lejátszódik az észterezés ionos folyadékokban. A legmagasabb konverziót (55,6 %) Katsoura és munkatársai (Katsoura, 2009) mérték [Omim]PF₆-ban, míg a legalacsonyabbat (0,21%) Zhao és munkatársai (Zhao, 2016), [Emim]MeSO₄-ban és [Bmim]MeSO₄-ban. Az eredmények nagy szórásából látható, hogy a szubsztrátokat és reakció paramétereket változtatva még növelhető a konverzió. Az eredményekből az olvasható ki, hogy a reakciót magasabb hőmérsékleten érdemes lejátszatni (60-65 °C). Mivel ez egy lassú reakció, ezért a reakcióidőt hosszabb időintervallumban kell megválasztani (48-72 óra).

2.4. Az ionos folyadékok környezetre kifejtett hatása

A zöld kémia szempontjából fontos, hogy ne termeljünk ökotoxikus vegyületeket nagy mennyiségben (Gathergood, 2004), ezért fontos vizsgálni az ionos folyadékok toxicitását és biológiai bonthatóságát, kiváltképpen, hogy ez egy alig kutatott terület (Claus, 2018; Diaz,

2018). Habár számos ionos folyadékot biológiailag bontható osztályba soroltak (Passos, 2014) a változatos felépítésük miatt célszerű mindegyik toxicitását és biológiai bonthatóságát megvizsgálni. Mivel nem párolognak, így a légköri szennyezésük közel nulla, jó oldhatóságuk és stabilitásuk miatt a vízi és szárazföldi környezetre jelenthetnek veszélyt (Costa, 2015; Ghanem, 2015; Czerwicka, 2009).

Általánosságban elmondható, hogy a kationok fejcsoportjának van jelentősége a toxicitásban. Az oldallánc hosszát növelve nő a kation lipofilitása, ezért könnyebben keresztül jut a sejtfalon, így nő a toxicitás (Claus, 2018; Grzonkowska, 2016; Montalbán, 2016; Salam, 2016). Az anionoknak kisebb a jelentőségük (Grzonkowska, 2016; Salam, 2016).

2.4.1. Enzimekre kifejtett hatás

A gátló hatás a kationnak köszönhető. Ezen belül is piridinium gyűrűt tartalmazó kationnak valamivel erősebb a hatása, mint az imidazolium gyűrűt tartalmazónak (Pham, 2010). A kation gátló hatása a rajta található oldallánc hosszának növekedésével növekszik (Pham, 2010).

AMP deamináz esetében megfigyelték, hogy az IC_{50} érték [Bmim][PF₆] esetében 5 μ M, míg [Bmim][Cl] esetében 10 μ M (Pham, 2010). Ezzel szemben viszont elmondható, hogy lipáz enzimek stabilitását, katalitikus aktivitását növelik (Elgharbawy, 2018).

2.4.2. Baktériumokra kifejtett hatás

A baktériumokkal végzett kísérletek során szintén azt tapasztalták, hogy növelve az imidazolium gyűrűhöz kapcsolt oldallánc hosszát növekszik annak gátló hatása (Ghanem, 2015; Pham, 2010; Harjani, 2009; Ranke, 2004). Az antibakteriális hatás általában nem függ az aniontól (Pernak, 2003), kivétel a foszfónium sókat tartalmazó anionok, melynél gátló hatást figyeltek meg (Pham, 2010). Az irodalomban található eredményeket a 6. táblázatban foglaltam össze.

6. táblázat: A vizsgált ionos folyadékok toxicitásának eredményei

Vizsgált baktérium	Vizsgált ionos folyadék	EC ₅₀ érték	Log EC ₅₀ érték	Forrás
<i>Vibrio fischeri</i>	[Bmim]Cl		3,46 µM	Montalbán, 2016
<i>Vibrio fischeri</i>	[Bmim]Cl		3,39 µM	Romero, 2008
<i>Vibrio fischeri</i>	[Bmim]Cl		3,34±0,13 µM	Garcia, 2005
<i>Vibrio fischeri</i>	[Bmim][PF ₆]		3,29 µM	Montalbán, 2016
<i>Vibrio fischeri</i>	[Bmim][PF ₆]		3,07±0,29 µM	Garcia, 2005
<i>Vibrio fischeri</i>	[Bmim]Cl	3162±2 µM		Diaz, 2018
<i>E. Coli</i>	[Bmim]Cl	80,05±0,055 mmol/l		Ghanem, 2015
<i>P. phophoreum</i>	[Bmim]Cl		3,39±0,15 µM	Romero, 2008

A táblázat adataiból látható, hogy az ionos folyadékok már nagyon kis mennyiségben is károsak a baktériumokra. Mindegyik tesztet baktérium monokultúrával végeztek el. Ha egy vegyület környezetbe való kijutásának hatását akarjuk vizsgálni, akkor célszerűbb baktérium konzorciummal elvégezni a mérést, mivel a környezetbe kijutva az ionos folyadékok ilyen konzorciumokkal fognak találkozni. Több baktérium együttesen ellenállóbb, mint egy-egy törzs. Ezt Diaz és munkatársainak (2018) eredményei is alátámasztják, amely szerint a [Bmim]Cl gyakorlatilag ártalmatlan szennyvíz iszapban található baktériumokra.

Az ionos folyadékok toxicitásáért nagyrészt az alkil lánc hossza a felelős (Fernández, 2015; Romero, 2008), gátló hatása azzal magyarázható, hogy a hidrofób molekularész interkalálódik a sejtmembránba (Pham, 2010). Viszont a magas só vagy szénhidrogén tartalomhoz akklimatizálódott baktériumok sokkal jobban túlélnek a magas ionos folyadék koncentrációt (Jordan, 2015). Az anionoknak kisebb szerepe van a toxicításban (Fernández, 2015), a legtoxikusabbak a fluorid atomot tartalmazók, míg a legkevésbé toxikus a Cl atomot tartalmazók (Montalbán, 2016).

2.4.3. Környezetre kifejtett hatás

Az ionos folyadékok kémiai és hő stabilitása nagy hátrányt jelentenek az ártalmatlanításukra (Pham, 2010). Az alacsony környezeti és biológiai bonthatóságuk veszélyt jelenthet a vízi élőlényekre (Tsarpali, 2015) és felhalmozódhatnak a szennyvizekben (Romero, 2008). A tervezhetőségből adódó nagy változatosság szintén problémát okoz, mivel mélyreható tudás nélkül nem lehet megmondani a környezeti hatásukat (Stolte, 2007), pedig fontos tudni toxicitásukat, és hogy hogyan viselkednek a környezetben (Montalbán, 2016). Az 1-alkil-3-metilimidazolium ionos folyadékok általában toxikusabbak a környezetre, mint a klór mentes és klórozott szerves oldószerek, de nem olyan veszélyesek, mint a kationos felületaktív anyagok (Garcia, 2005).

„Mivel az imidazolium bázisú ionos folyadékok erős elektron akceptorok a delokalizált aromás rendszer (Pham, 2010; Jastorff, 2003) miatt és hidrofób komponensek miatt, sokféle mechanizmussal tudnak felhalmozódni a talajban és az üledékben” (Pham, 2010). A hosszabb oldalláncot tartalmazóak erősebben kötődnek a talaj részecskéihez (Jordan, 2015; Pham, 2010; Stepnowski, 2007), míg a rövid oldalláncot vagy hidroxil csoportot tartalmazók mobilisabbak, így könnyebben elszennyezik a felszíni és talajvizeket (Megaw, 2015), de a megkötődés függ a talaj ásványi anyag összetételétől is (Jordan, 2015). A lipofilitás csökkenésével növekszik az ionos folyadékok mobilitása, így a hidrofób ionos folyadékok csak néhány centimétert mennek be a talajba (Jordan, 2015). A hosszú oldalláncot tartalmazó ionos folyadékok a finom szemcséjű tengeri üledékhez irreverzibilisen kötődnek (Stepnowski, 2007) és a mezőgazdasági talajokból való kimosás is csökken oldallánc hosszának növelésével (Stepnowski, 2007). [Bmim]Cl esetében agyagos talajban minimális a megkötődése, ami azt jelenti, hogy akadálytalanul mosódik be a talajvízbe (Gorman-Lewis, 2004). A kis hidrofobicitásának köszönhetően a baktériumok felületén sem kötődik jól (Pham, 2010).

2.4.4. Biológiai bonthatóság

A biológiai bontás egy környezetbarát eljárás a kémiai vegyületek bontására (Pham, 2010) mely során különböző mikroorganizmusok biomasszává vagy szerves vegyületekre (CO_2 , H_2O) bontják a nagy molekulákat (Harjani, 2009). Előnye, hogy csökken a hulladék égetés és lerakás (Gathergood, 2004).

Biológiailag bontható vegyületek tervezésénél három dolgot kell figyelembe venni. Az első, hogy legyen hely az enzimes hidrolízishez, a második, hogy legyen oxigén a hidroxil,

aldehid vagy karbonsav csoportokban, harmadik pedig, hogy legyen nem szubsztituált lineáris alkil lánc és fenil gyűrű (Gathergood, 2004).

A butil oldallánccal kapcsolt imidazolium csoport esetében nem figyeltek meg biológiai bonthatóságot (Romero, 2008; Stolte, 2007; Docherty, 2007), melyet alátámaszt Garcia és munkatársai (2005) eredménye mely szerint [Bmim]Cl és [Bmim]PF₆ estében 28 nap alatt 5% alatt volt a biológiai bontás mértéke. Ez egybevág azzal, hogy a dialkil-imidazolium ionos folyadékok (bmimX) biológiai bontása elhanyagolható (Jordan, 2015; Gathergood, 2004). Viszont növelve az alkil oldallánc hosszát nő a biológiai bonthatóság, de a 16-18 szénatom hosszú láncot tartalmazó ionos folyadékok már gyengén oldódnak vízben (Jordan, 2015).

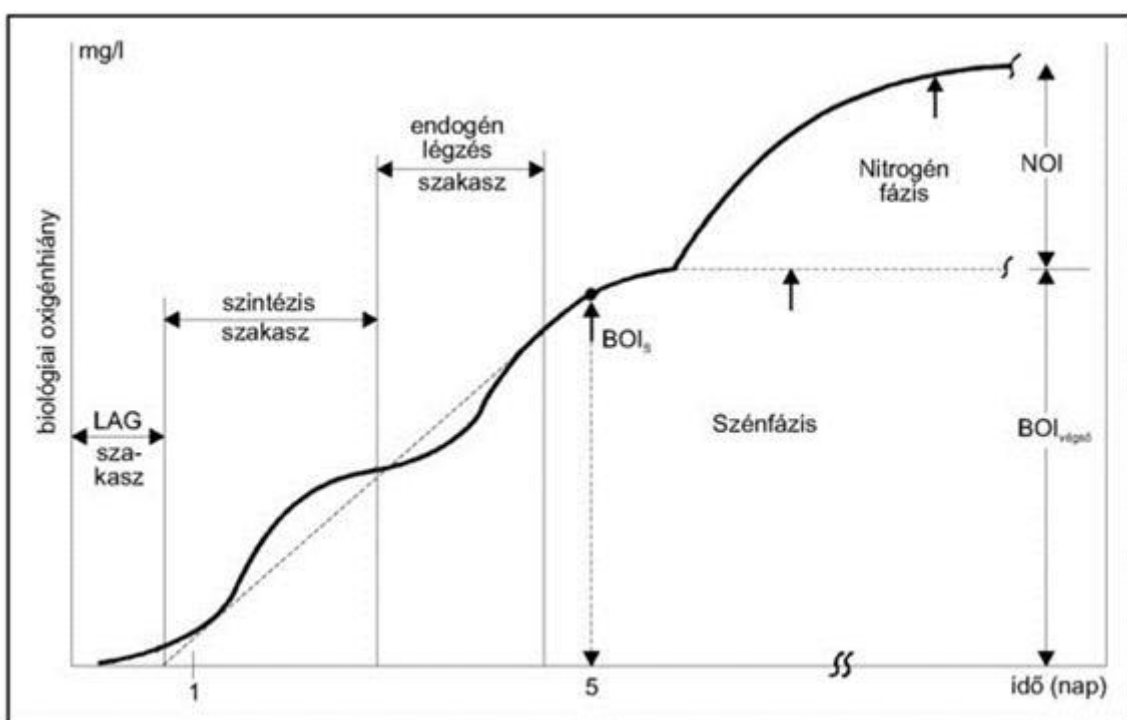
Az anionoknak általában nincs hangsúlyos szerepe a biológiai bonthatóságban, kivétel az oktil-szulfát mely segíti a lebontást (Garcia, 2005), viszont meghatározza az ionos folyadék vízben való oldódását és ezért fontos paraméter (Ganske, 2006).

A zöld kémia szabályai szerint a kémiai vegyületnek használat után bonthatónak kell lennie, hogy elkerülje a felhalmozódást a környezetben (Stolte, 2007). A biológiai bonthatóság tűnik a szűk keresztmetszetnek az ionos folyadékok tervezésében, mivel olyan szerkezetet kell kialakítani ami, növeli a biológiai bonthatóságot, nem növeli a lipofilitást és ezáltal a toxicitást (Stolte, 2007). De egy jól bontható toxikus vegyület kisebb gondot jelent, mint egy nem toxikus stabil vegyület (Harjani, 2009). A tervezésben nagy segítséget nyújthatnak a biológiailag bontható felületaktív anyagok, mivel ezek nagy hasonlóságot mutatnak a legfontosabb ionos folyadékokkal (Gathergood, 2004), főleg az imidazolium vegyületekkel (Ranke, 2004). Oxigén tartalmú (alkohol, aldehid) funkciós csoport kapcsolása az ionos folyadékhoz igaz csökkenti annak hatékonyságát, mint reakció közeg, de növeli a biológiai bonthatóságát. Ez az észter csoporttal magyarázható (Pham, 2010; Harjani, 2009; Garcia, 2005). Az oldallánchoz kapcsolt hidroxil csoport csökkenti az ionos folyadékok toxicitását (Fernández, 2015; Czerwicka, 2009). Észter csoportok molekulába való integrálása pedig azért célszerű, mert az észteráz enzimek széles szubsztrát specifitással rendelkeznek (Harjani, 2009).

2.4.5. Biológiai oxigénigény

A biológiai vagy biokémiai oxigénigény a szerves anyagok, mikrobák által történő oxidációjához szükséges molekuláris oldott oxigén mennyiségét adja meg 20 °C-on adott időintervallumon, általában 5 nap (Halász, 2007; Barótfi, 2000). Biológiailag gyorsan bonthatónak nevezhető (ready biodegradability) az az anyag aminek az oldott szerves széntartalom 70 %-a, és a 60 %-a az elméleti oxigén igénynek eltávolítható, vagy az elméleti

széndioxid mennyiség termelődése eléri a 60 %-ot respirometrikus módszerrel, 10 nap alatt a 28 napos mérés során (OECD, 1992). A biológiai lebontás „közelítőleg első rendű reakciósebességgel írható le”, az oxidálható szerves anyag mennyisége arányos az oxigén felhasználás sebességével, mértékegysége mg/l oxigén. A reakció két fő lépésben megy végbe. Az első a szénfázis, amikor a szerves anyag oxidálása folyik, a második a nitrogénfázis, amikor az ammónia és a nitrit alakul át nitráttá (11. ábra) (Barótfi, 2000).



11. ábra: A biológiai oxigénigény elméleti lefutása (LAG szakasz: mikroorganizmusok adaptálódása; szintézis szakasz: oldható szerves szubsztrát felvétele; endogén légzés szakasz: baktérium sejt belső légzése (Barótfi, 2000)

3. Célkitűzés

Munkám célja az 1-butil-3-metil-imidazolium kationt tartalmazó ionos folyadékokban történő cellulóz oldás optimalizálása, majd a cellulóz hidrolíziséhez szükséges optimális mennyiségű puffer meghatározása, anélkül, hogy a fellazult cellulózt tisztítási eljárásnak vetném alá. A cellulóz oldása után a hidrolízist ugyanabban a reakciótérben vizsgálom. A méréseket tisztított cellulózzal kezdem meg, majd lignocellulóz tartalmú mezőgazdasági hulladékokkal folytatom. Az ionos folyadékos előkezelés és enzimes hidrolízis lépéseinek egy reakciótérben történő lejátszatásával a folyamatot kívánom egyszerűsíteni.

A cellulóz enzimes hidrolízise után a termékként kapott glükózt lipáz enzimmel észterezésnek vetem alá ionos folyadéokban. Ennek a vizsgálatnak az a célja, hogy a glükózból értékes terméket állítsak elő, jelen esetben glükóz-palmitinsav észtert, mely felületaktív anyag. Enzimekkel enyhébb reakciókörülmények között is lejátszódik a folyamat, így energiát lehet spórolni a kémiai szintézishez képest.

Következő lépésben az ionos folyadékok környezetre kifejtett hatását vizsgálom biológiai oxigénigény mérés módszerével, hogy megállapítsam azok toxicitását. Mivel az általam vizsgált ionos folyadékok jól oldódnak vízben, fontos tudni, hogy milyen hatást fejtenek ki a vízi környezetre, és esetleges kijutásukkor lebomlanak-e vagy nem. Irodalmi adatok alapján baktérium monokultúrákra toxikusak az ionos folyadékok, ezért poli-kultúrával fogom elvégezni a tesztet. Azáltal, hogy ez többféle baktériumot tartalmaz, azt várom, hogy jobban ellenáll az ionos folyadékoknak.

Munkám utolsó szakaszában az ionos folyadékok és az alkalmazott celluláz enzimkomplex kölcsönhatását vizsgálom meg. Azt szeretném bizonyítani, hogy a cellulóz ionos folyadékos előkezelése majd enzimes hidrolízise egy reakciótérben lejátszatható az enzimek nagyarányú deaktivációja nélkül, ezáltal tényleg egyszerűsödik a cellulózból történő cukor kinyerés folyamata.

4. Felhasznált anyagok és technikák

4.1. Előkezelés és enzimes hidrolízis

4.1.1. Felhasznált anyagok

- Tisztított cellulóz por (Macherey Nagel, MN100; Düren, Németország) standard tisztaságú,
- kukorica szár és levél, szalmaszár: hamutartalmuk 7,7% és 7,3%, míg a maximálisan kinyerhető redukáló cukor tartalmuk 44,9% és 29,6% volt,
- ionos folyadék: 1-butil-3-metil-imidazolium-klorid ([Bmim]Cl) ($C_8H_{15}ClN_2$; $M=174,68$ g/mol; Merck. O. p.: $60\text{ }^{\circ}\text{C}$; tisztaság: $\geq 99\%$; Cas-No:79917-90-1) és Io-Li-Tec (Lot: J02031.1.4; tisztaság: $> 99\%$); 1-butil-3-metil-imidazolium-acetát ([Bmim]Ac) ($C_{10}H_{18}N_2O_2$; $M=198,26$ g/mol; O. p.: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; tisztaság: $> 98\%$ Io-Li-Tec (Lot.: K00131.1)),
- enzimek: Cellic HTec2 (VHN00002) sárga színű folyadék, aminek a sűrűsége $1,09\text{ g/cm}^3$, enyhén erjesztett szaga van, xilanázt (endo-1,4-) (IUB:3.2.1.8) tartalmaz; Cellic CTec2 (VCPI0006): barna folyadék, aminek a sűrűsége $1,15\text{ g/cm}^3$ és erjedt szaga van, cellulázt (IUB:3.2.1.4) és xilanázt tartalmaz; Celluclast 1,5L (CCN03133) Gyártó: Novozymes (Dánia), Optimális működési hőmérsékletük $45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH: 5,0-5,5,
- orto-toluidin (TO01201000, Scharlau, Spanyolország, tisztaság: $> 99\%$ és 1421704V, Sigma-Aldrich, Svájc, tisztaság: $> 99\%$),
- ecetsav (11110601, Scharlau, Spanyolország, tisztaság: $> 99,8\%$),
- NaOH (Gy.sz.:09040407; Spektrum 3D, tisztaság: $> 98\%$),
- nátrium-acetát puffer: 2,8 ml ecetsavat oldottam desztillált vízben, a pH-t NaOH-al 5-ös értékre állítottam be, majd desztillált vízzel 1 l-re töltöttem fel,
- GOD kit (Sigma-Aldrich, Magyarország).

4.1.2. Használt eszközök

- Külső keverők (RW16 basic, RW20 DZM, EVROSTAD digital, IKA-Labortechnik, Staufen, Németország),
- fotométer (DR3900, HACHLANGE),
- centrifuga (Sigma 4K10, B. Braun Biotech International),

- főzőlapok (Velp Scientifica, Arex Heating Magnetic Stirrer; RCT basis, IKA-Labortechnik, Staufen, Németország).

4.1.3. A mérés menete

Az előkezelés során adott mennyiségű tisztított cellulózt, majd lignocellulózt feloldottam 0,5 g ionos folyadékban, üveg reaktorban, lassú külső keveréssel (50 rpm), 10 percen keresztül 100 °C-on. Az előkezelés lejárta után nátrium-acetát puffert és 15 µl enzimkészítményt adtam hozzá. A hidrolízis, előkísérletek alapján, két órán keresztül ment 50 °C-on intenzív (650 rpm) keveréssel. A hidrolízis végén Eppendorf csövekben centrifugáltam a mintákat és orto-toluidin reagenssel mértem a felszabadult redukáló cukor mennyiséget.

4.2. Glükóz-palmitát enzimatiszus előállítás

4.2.1. Felhasznált anyagok

- Novozyme 435 (*Candida antarctica* lipase B, EC. 3.1.1.3.) Novo Nordisk (Basvaerd, Dánia) (LC200222)
- Trihexil-tetradecil-foszfónium-bisz(2,4,4-trimetil-pentil)-foszfinát (Cyphos 104) ($C_{48}H_{102}O_2P_2$; M=773,27 g/mol; TG-0100 tisztaság: > 90 %); trihexil (tetradecil)-foszfónium-bisz (trifluor-metánszulfonil)-imid ($C_{34}H_{68}F_6NO_4PS_2$; M=764 g/mol; Op.: -72,4 °C; F00410.1; tisztaság: > 98 %) (Cyphos 109), 1-butyl-3-metil-imidazolium hexafluoro-foszfát ([Bmim][PF₆]) ($C_8H_{15}F_6N_2P$; M= 284.19 g/mol; O.p.: -8°C; tisztaság: > 99 %) Io-Li-Tec (Németország)
- palmitinsav (tisztaság: ≥ 99 %), glükóz (tisztaság: ≥ 99,5 %), bisz-(trimetil-szilil)-trifluoro-acetamid (BSTFA) (tisztaság: ≥ 98,5 %), trimetil-szilil-imidazol (TMSI) (tisztaság: ≥ 98 %) és D-glükopiranozid (tisztaság: ≥ 99 %) Sigma-Aldrich (Svájc)

4.2.2. Használt eszközök

- HP 5890A típusú gázkromatográf; HP-FFAP-DB oszlop (10mx0,53mm) és FID deketor
- 25 ml-es Erlenmeyer lombik
- rázógép (IKA, KS 4000i)

4.2.3. Mérés menete

Gázkromatográfiás analízis:

A glükóz-palmitát koncentrációt HP 5890A típusú gázkromatográfon határoztam meg HP-FFAP-DB oszloppal (10mx0,53mm) és FID detektorral. Az oszlop kezdeti hőmérséklete 30 °C volt és 10 °C/perc sebességgel emeltem 250 °C-ra. A D-glükopiranozidot belső sztenderdként használtam. A mintákat Degn és munkatársai (1999) leírása alapján készítettem elő, azzal a kivétellel, hogy az ionos folyadékot nem párologtattam el. Az egy külön fázist adott a minta előkészítés során.

Glükóz-palmitát szintézise:

Az észterezést 25 ml-es Erlenmeyer lombikban végeztem 210 rpm-en és 50 °C-on egy rázógépben. Egy tipikus reakcióelegy palmitinsavból (0,5 mmol/g IL), glükózból (0,15 mmol/g IL), enzimből (0,5 g), vízből (10 µl) és ionos folyadékból állt. Az össztömeg 10 g volt és a reakció az enzim hozzáadásával indult. A kísérleteket három ionos folyadékkal kezdtem: [Bmim][PF₆], Cyphos 104 és Cyphos 109, hogy a további kísérletekhez kiválasszam közülük a legjobbat. Nyomon követtem a reakciót, ami az egyensúly beálltaig ment.

Enziminaktiváció vizsgálata:

Két reaktorban mértem az enzim aktivitásának csökkenését az ismételt felhasználások alatt. 0,5 mmol/g glükózból, 0,15 mmol/g palmitinsavból és 1 % vízből állt mindkét reakcióelegy. A reakció az enzim hozzáadásával indult, az egyik esetben 50 °C-on, a másik esetben pedig 70 °C-on. 48 óra elteltével a reakciót leállítottam és megmértem a keletkezett észter koncentrációját. Az enzimet négyszer használtam és két mérés között izopropil-alkohollal mostam, majd szárítottam.

4.2.4. Kísérlettervezés

A reakció paraméterek hatásait az észter koncentrációra és szubsztrát konverzióra egy mérési sorozattal vizsgáltam. A kísérleteket statisztikai úton terveztem meg, ahol 4 változót vettem figyelembe: hőmérséklet, glükóz- és palmitinsav koncentráció valamint víztartalom (7. táblázat) (Kemény, 2002). Design-Expert program segítségével 2⁴-en teljes faktoros

kísérlettervet határoztam meg, mely egy középpontot tartalmazott. Az eredményeket ANOVA program segítségével értékeltem ki.

7. táblázat: A figyelembe vett változók és azok szintjei

Változó neve	Kód	Alacsony (-1)	Magas (+1)
A: Hőmérséklet, °C	X_1	50	70
B: Glükóz, mmol/g	X_2	0,15	0,50
C: Palmitinsav, mmol/g	X_3	0,15	0,50
D: Víztartalom, %	X_4	0,10	0,50

A kísérleteket a korábban leírtaknak megfelelően végeztem (4.2.3.), eltérés csak a hőmérsékletben és a szubsztrátok mennyiségében volt. A reakció 48 órán keresztül ment. A legmagasabb észter koncentráció elérését tűztem ki célul.

A kísérletterv 33 pontot tartalmazott (2^4 és plusz egy középpont). A hőmérséklet maximumát 70 °C-ban határoztam meg, mivel e fölött az enzim inaktíválódik (Kramer, 2010). Mivel a hőmérséklet növelésével a cukor oldhatósága nő, ezért 50 °C-ban határoztam meg a minimum hőmérsékletet (Yang, 2012). A víztartalom 0,1 és 0,5% között változott, mivel az enzimeknek kell egy kevés víz (Bommarius, 2004). [Bmim]PF₆-ban 25 °C-on a glükóz oldhatósága 0,5 mmol/l (Lee, 2008b) és 0,6 mmol/l 40 °C-on (Lee, 2008a). Irodalmi adatok alapján a glükóz oldhatósága 2-3-szorosára nő különböző ionos folyadékokban, ha a hőmérsékletet 25-ről 40 °C-ra emelik (Liang, 2012), de [Bmim]PF₆-ban ezt a jelenséget nem tapasztaltam, ezért a 0,5 mmol/l-es glükóz koncentrációt választottam.

A használt modellben (1. egyenlet) a „b” egy koefficiens, mely összekapcsolja a variációkat, A (hőmérséklet), B (glükóz koncentráció), C (palmitinsav koncentráció) és D (víztartalom). A változók kölcsönhatását a betűk kombinációja mutatja.

$$Y=b_0+b_1*A+b_2*B+b_3*C+b_4*D+b_{12}*A*B+b_{13}*A*C+b_{23}*B*C+...+b_{123}*A*B*C*D \quad (1)$$

4.2.5. A kísérlettervezés során meghatározott paraméterek

A kísérletek paramétereit a 8. táblázatban foglaltam össze.

8. táblázat: A kísérletek paramétereit

Mintaszám	A T (°C)	B glükóz (mmol/g)	C palmitinsav (mmol/g)	D víz (%)
1	50	0,15	0,5	0,5
2	50	0,5	0,5	0,1
3	50	0,5	0,15	0,5
4	50	0,5	0,15	0,1
5	50	0,5	0,5	0,1
6	70	0,5	0,15	0,1
7	70	0,5	0,5	0,5
8	70	0,5	0,15	0,5
9	70	0,15	0,5	0,1
10	50	0,15	0,15	0,5
11	50	0,5	0,5	0,5
12	70	0,15	0,15	0,1
13	50	0,5	0,15	0,5
14	70	0,5	0,5	0,1
15	50	0,15	0,5	0,1
16	70	0,15	0,5	0,5
17	70	0,15	0,15	0,5
18	70	0,5	0,15	0,1
19	70	0,5	0,5	0,5
20	50	0,15	0,15	0,5
21	70	0,15	0,15	0,1
22	50	0,5	0,15	0,1
23	50	0,15	0,15	0,1
24	70	0,15	0,5	0,1
25	50	0,5	0,5	0,5
26	70	0,15	0,15	0,5
27	50	0,15	0,15	0,1
28	70	0,5	0,5	0,1
29	70	0,5	0,15	0,5
30	50	0,15	0,5	0,5
31	60	0,33	0,33	0,3
32	70	0,15	0,5	0,5
33	50	0,15	0,5	0,1

4.3. Biológiai oxigénigény mérés

4.3.1. Felhasznált anyagok

- glükóz (tisztaság: $\geq 99,5$ %; Sigma-Aldrich, Svájc)
- L-glutaminsav (tisztaság: ≥ 99 %; Reanal)
- Polyseed liofilizált beoltókultúra (Lot# 141311-0205-52)
- nátrium-tripoli-foszfát ((tisztaság: ≥ 85 %; Fluka)
- karbamid (tisztaság: ≥ 98 %; Sigma)
- NTH600 nitrifikáló gátló (N-allylthiourea, $C_4H_8N_2S$, tisztaság: ≥ 98 %, 209331)
- nátrium-hidroxid (Spektrum 3D; tisztaság: > 98 %)

4.3.2. Használt eszközök

- Oxi-topp kontrol 110 mérőfejek
- 500 ml-es barnaüveg
- termosztáló szekrény

4.3.3. A mérés menete

Törzsoldatot készítettem klórmentes csapvízből, mely 4 mg/l-es koncentrációban tartalmazott karbamidot, 1,6 mg/l-es koncentrációban nátrium tripoli-foszfátot, valamint 500 ml-ént egy kapszula Polyseed liofilizált beoltókultúrát. Ezt 24 órán keresztül levegőztettem szobahőmérsékleten, 160 rpm-el. Az idő leteltével 20 mg/l-es koncentrációban adtam hozzá glükózt, valamint glutaminsavat, és hagytam levegőzni újabb 72 órán keresztül 160 rpm-el. A törzsoldat literenként 20 csepp NTH600 nitrifikáló gátlót tartalmazott. Méréseimet az így felnövesztett baktériumkultúrával végeztem.

Első lépésben az ionos folyadékok bonthatóságát vizsgáltam. A felnövesztett baktérium kultúrából kivettem 365 ml-t, ez volt a vak próba, valamint 1-1 üvegbe a 365 ml-be tettem 100-100 mg/l koncentrációban [Bmim]Cl-ot és [Bmim]Ac-ot, így az ionos folyadékokra is kaptam 1-1 mintát. Második lépésben azt vizsgáltam, hogy az ionos folyadék gátolja-e más szénforrások lebontását, illetve ko-fermentációval bontható-e. Ebben az esetben a mintákhoz 164 ml-et mértem ki a felnövesztett baktérium kultúrából, és ehhez tettem 150-150 mg/l koncentrációban glükózt illetve glutaminsavat, NTH600 nitrifikáló gátlót, valamint 100 mg/l koncentrációban [Bmim]Cl-ot és [Bmim]Ac-ot. A mérések 5 napig mentek 20 °C-on. Mérés

közben a mintákat mágneskeverő segítségével kevertettem, és a keletkező szén-dioxidot nátrium-hidroxid pasztillával nyeltem el, hogy mérni tudjam a nyomáscsökkenést és ezáltal az oxigénfogyást. Az oxigénfogyásból a szerves anyagok oxidációjára és annak mértékére lehet következtetni.

4.4. Enzim kinetikai mérés ionos folyadékban

4.4.1. Cellulóz hidrolízis [Bmim]Cl nélkül Michaelis-Menten kinetika

A cellulóz enzimatisz hidrolízise egy sok lépésből álló folyamat:

1. enzim (E) kötődik a szubsztráthoz (S) egy reverzibilis reakcióval (E+S)
2. enzim-szubsztrát komplex jön létre (ES)
3. irreverzibilis bontás eredményeképpen enzim (E) és termék (P) szabadul fel (Zhang, 2010) a klasszikus Michaelis-Menten kinetika szerint (Johnson, 2011)

Ezt a modellt használtam, hogy értékeljem az enzimes hidrolízist [Bmim]Cl nélkül

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_s + [S]} \quad (2)$$

V- aktuális (kezdeti) termék képződési arány (g termék/g enzim- perc)

V_{max}- maximális (kezdeti) termék képződési arány (g termék/g enzim- perc)

[S]- aktuális (kezdeti) szubsztrát koncentráció (g/l)

K_s- fél telítési koncentráció (g/l), ha V=V_{max}/2, akkor egyenlő [S]-el

mivel ez egy jó leírás az enzimes reakciók megértéséhez (Elgharbawy, 2018).

4.4.2. Cellulóz hidrolízis [Bmim]Cl jelenlétében

Négy különböző mechanizmussal fordulhat elő reverzibilis enzim gátlás:

1. kompetitív
2. un-kompetitív
3. kevert
4. nem kompetitív

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (3)$$

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_s + \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)[S]} \quad (4)$$

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_i'}\right)[S]} \quad (5)$$

K_i és K_i' - enzim-gátló és (enzim-szubsztrát)-gátló megoszlási konstans (g/l)

$[I]$ - aktuális (kezdeti) inhibitor koncentráció (g/l)

$[S]$ - aktuális (kezdeti) szubsztrát koncentráció (g/l)

K_s - fél telítési koncentráció (g/l)

Az előforduló inhibíciós folyamat kiderítésére átfogó enzim kinetikai vizsgálatokat kellett csinálni.

4.4.3. Enzim deaktiváció hígítatlan [Bmim]Cl-al

A [Bmim]Cl enzim inaktíváló hatásának vizsgálatára egy elsőrendű kinetikát választottam:

$$A = \frac{a_t}{a_0} = e^{-k_{de1}t} \quad (6)$$

A- relatív enzim aktivitás

a_t - mért aktivitás ionos folyadék jelenlétében (különösképpen 50 mg/l-el), miután az enzimet különböző ideig (t) kezeltem hígítatlan ionos folyadékban

a_0 - mért aktivitás ionos folyadék jelenlétében (különösképpen 50 mg/l-el) megelőző enzim inkubálás nélkül hígítatlan ionos folyadékban (t=0, alap aktivitás)

k_{de1} - celluláz deaktiváció elsőrendű sebességi állandója (min^{-1})

e- exponenciális együttható (2,718)

Ez egy széleskörűen használt modell enzim deaktiváció vizsgálatára (Lencki, 1992) különösképpen celluláz deaktivációra cellulóz hidrolízis közben (Zhang, 2010). Az egyenlet mindkét oldalának természetes alapú logaritmusát véve, és $\ln A$ -t t függvényében ábrázolva, k_{de1} az egyenes meredekségéből származtatható (Lencki, 1992).

4.4.4. Cellulóz hidrolízis

Minden cellulóz hidrolízist zárt 250 ml-es Erlenmeyer lombikban végeztem, 100 ml-es térfogatban, mágneses keverővel keverve (400 rpm) és 60 °C-on. Citrát puffert (100 mM, pH 4,5), modell anyagként alacsony viszkozitású karboximetil-cellulózt (CMC), a hidrolízishez pedig Cellic Htec2 enzimmészítményt használtam. Az enzim 4,5-5,5 közötti pH-n és 60-75 °C között működik optimálisan. Minden teszthez 600(±48) mg/l koncentrációban használtam az enzimmészítményt. Az értékelésnél mindig figyelembe vettem az enzim pontos mennyiségét a lombikban.

Az ionos folyadék nélküli reakciónál (Michaelis-Menten kinetika) a szubsztrát (CMC) koncentrációja 0,5; 2; 5 és 25 g/l volt.

Az enzim inhibíciós tesztnél meghatározott mennyiségű [Bmim]Cl ionos folyadékot adtam a citrát pufferhez, hogy a kívánt ionos folyadék koncentrációt (50, 100, 150, 200 és 250 mg/l) elérjem együtt a szubsztrát 1; 2,5 és 5 g/l-es koncentrációjával.

Az enzim deaktivációs méréskor 60(±4,8) mg enzimet kevertem 5 mg hígítatlan [Bmim]Cl-ba, majd 60 °C-on 1, 2, 3, és 10 percig kezeltem az enzimet. Az idő leteltével a fent leírt citrát puffer alapú reakcióeleggyel (kezdeti [Bmim]Cl koncentráció 50 mg/l, enzim koncentráció 600(±48) mg/l) öntöttem fel a reakcióelegyet, ami 2,5 g/l szubsztrátot tartalmazott.

Refraktív index (RI) mérés segítségével mértem a felszabaduló glükóz mennyiségét. 10 ml/perc sebességgel pumpáltam át a reakcióelegyet 37 °C-on egy Merck-Hitachi (RI-71)-es refraktométeren. Előzetesen jól definiált glükózzal (labor tisztaságú, Sigma-Aldrich, USA) kalibráltam a műszert.

A vizsgálatok az enzim oldat beinjektálásakor kezdődtek. A kinetikai paramétereket (K_s , V_{max} , K_i , k_{de1}) Matlab, legkisebb négyzetek módszerével becsültem meg.

5. Eredmények és tárgyalásuk

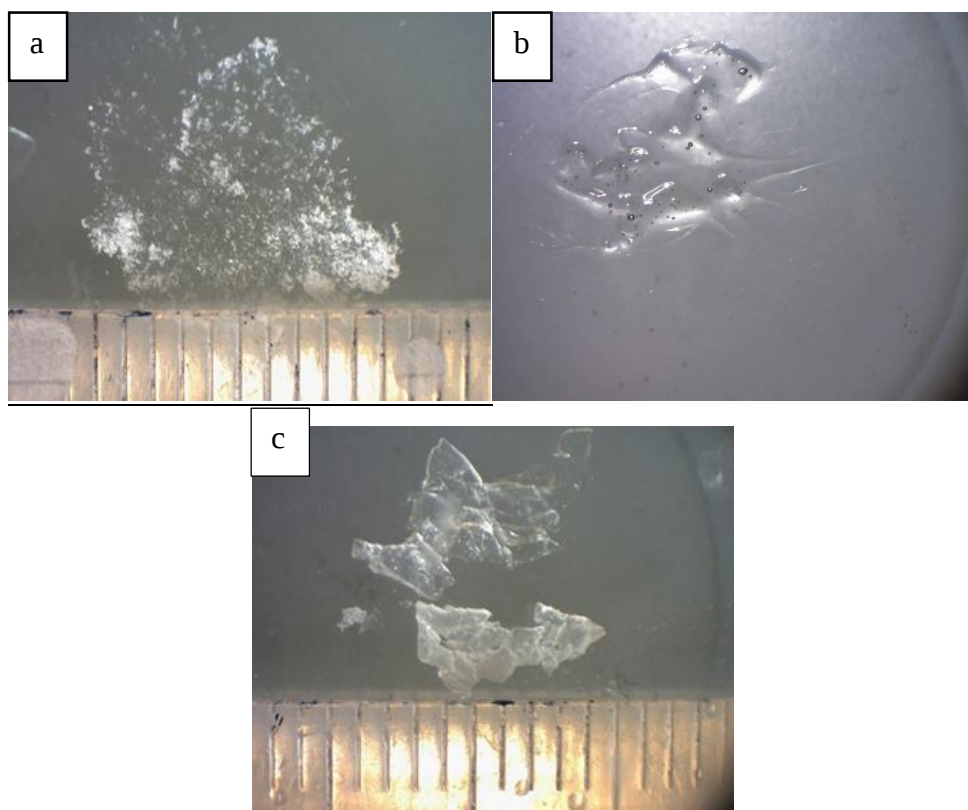
5.1. Ionos folyadékos előkezelés vizsgálatának eredményei

Munkámat tisztított cellulóz ionos folyadékban történő előkezelésével, majd enzimes hidrolízisével kezdtem el. Miután bebizonyítottam, hogy a modell anyagként használt tisztított cellulózzal megvalósítható az ionos folyadékos előkezelés és enzimes hidrolízis egy reakcióterben, mezőgazdasági hulladékokkal folytattam a kísérleteket. Először kukorica szárából és leveléből készült őrlményt vizsgáltam, majd szalma őrlménnyel folytattam, hogy igazoljam, ezek a megújuló forrásból származó hulladékok alapanyagként felhasználhatóak glükóz kinyerésére.

5.1.1. Tisztított cellulóz vizsgálata

5.1.1.1. Morfológiai változás eredménye

Méréseimet tisztított cellulózzal, mint modell anyaggal kezdtem el. 0,5 g [Bmim]Cl ionos folyadékban 25 mg tisztított cellulózt (4,76 %) oldottam fel 10 perc alatt, 100 °C-on. Az előkezelés során végbemenő morfológiai változásokat fénymikroszkóppal követtem nyomon (12. ábra).



12. ábra: a: Cellulóz por fénymikroszkópos képe az ionos folyadékos előkezelés előtt; b: A cellulóz por a 10 perces ionos folyadékos előkezelés végén; c: A cellulóz por a puffer hozzáadása után, az enzimes hidrolízis előtt

Az első képen (12. a ábra) jól láthatóak a cellulóz szemcsék. A por állaga miatt fénymikroszkóppal, sajnos, nem sikerült megállapítani a szemcseméretet, azonban megfigyelhető, hogy a cellulóz por homogén. A második képen (12. b ábra) észrevehető, hogy a cellulóz por teljesen elfolyósodott és teljesen amorf. Ez egybevág az irodalmi adatokkal (Bahcegul, 2012; Swatloski, 2002; Auxenfans, 2012). Ennek a változásnak köszönhetően az enzimek könnyebben hidrolizálják a kezelt anyagot, mivel az ionos folyadék által megbontott hidrogén-híd kötések miatt megszűnik annak szabályos, merev szerkezete. Az így fellazult szerkezetű anyaghoz az enzimek jobban hozzáférnek, és könnyebben, hatékonyabban tudják hidrolizálni azt. A 12. c ábrán az látszik, hogy a puffer hozzáadásakor az előkezeléshez képest a cellulóz opálosabb és rendezettebb. Ez a jelenség valószínűleg annak köszönhető, hogy az ionos folyadék jól oldódik vízben és beoldódik abba, a cellulóz pedig rendezettebb formába áll vissza. A kiindulási, szemcsés állapot nem állt elő újra, így elmondható, hogy az előkezelés sikeres és tartós volt. A fényképeken jól látható tehát, hogy az ionos folyadék tényleg oldja a cellulózt, és ezáltal megkönnyíti annak enzimes hidrolízisét.

5.1.1.2. Az egy edényes (one pot) előkezelés és enzimes hidrolízis eredményei

A hidrolízis végrehajtásához, előkísérletek alapján, 0,5 g [Bmim]Cl ionos folyadékban kezeltem elő 25 mg tisztított cellulózt (4,76 %) 100 °C-on, 10 percen keresztül, majd 3,5 g nátrium-acetát puffert és 15 µl Cellic® CTec2 enzimmészítményt adtam a reakcióelegyhez. Két órás hidrolízis után centrifugáltam a mintát és GOD kittel mértem a glükóz koncentrációt. 9,6 mg glükózt kaptam a reakció végén, ami közel 35 %-os konverciónak felel meg. Így, az irodalmi adatokkal ellentétben (Salvador, 2010; Kamiya, 2008; Turner, 2003), sikerült bizonyítanom, hogy az ionos folyadékos előkezelés és az enzimes hidrolízis egy reakcióterben lejátszható.

Munkám folytatásában egy régebb óta forgalomban lévő enzimmészítményt (Celluclast 1.5 L) és két újabb enzimet (Cellic® CTec2, Cellic® HTec2) hasonlítottam össze. A drágább és a környezeti viszonyokra érzékenyebb GOD kit helyett pedig az egyszerűbb és a cellulóz hidrolízisnél széleskörűen használt orto-toluidin reagenssel mértem a felszabaduló redukáló cukor mennyiségét (9. táblázat).

9. táblázat: Tisztított cellulóz 2 órás enzimes hidrolízise utáni glükóz tartalma és annak aránya a kiindulási anyagmennyiséghez képest különböző enzimekkel

Enzim	Glükóz tartalom (mg)	Glükóz hozam (%)
Celluclast 1.5 L	0,7	2,8
Cellic HTec2	8,4	33,6
Cellic CTec2	9,6	38,4

A táblázatból látható, hogy az újabban kifejlesztett két enzimmészítmény (Cellic® CTec2 és Cellic® HTec2) lényegesen hatékonyabb az enzimes hidrolízis során, mint a régebben forgalomban lévő Celluclast 1.5L. Munkám további részében ezért ezt az enzimmészítményt nem alkalmaztam. A Cellic® CTec2 enzimmészítménnyel mért magasabb hozam pedig az enzimek eltérő szubsztrát specificitásával magyarázható. A Cellic® CTec2 enzimmészítmény celluláz, mely kis mennyiségben xilanázt is tartalmaz, míg a Cellic® HTec2 enzimmészítmény xilanázt (endo-1,4-) tartalmaz.

Ezek után az előkezelt cellulóz mennyiségét növeltem, mivel a vonatkozó irodalom áttanulmányozásakor nem találtam példát arra, hogy a tisztított cellulózt nagy koncentrációban kezelték volna elő. Irodalmi adatok alapján (Swatloski, 2002) tisztított cellulózt 5 %-os

koncentrációban lehet beoldani az ionos folyadékba. Külső keverést alkalmazva sikerült 0,5 g [Bmim]Cl ionos folyadékba beoldanom 0,1 g tisztított cellulózt (16,67 %). A minta viszkozitása nagyon megnőtt és ragadós lett, ezért erősebb külső keverést kellett alkalmaznom. Az előkezelés után különböző mennyiségben adtam a mintához a puffert, hogy vizsgáljam ennek hatását az enzimes hidrolízisre (10. táblázat). 0,1 g tisztított cellulózból 1,11-szeres mennyiségű (0,111 g) glükóz nyerhető ki (Bahcegul, 2012), mely a szabad glükóz és poliszacharidban lévő glükóz moláris tömegének különbségéből adódik (180/162 g/mol) (Auxenfans, 2012).

10. táblázat: A felszabaduló redukáló cukor mennyisége és az elméletileg kinyerhető glükóz tartalomhoz (0,111 g) viszonyított aránya különböző mennyiségű puffer esetében

Puffer mennyisége (g)	Cellic® HTec2		Cellic® CTec2	
	Glükóz tartalom (mg)	Glükóz hozam (%)	Glükóz tartalom (mg)	Glükóz hozam (%)
1	7,16	6,5	9,36	8,4
3,5	33,10	29,8	64,48	58,1
7	32,84	29,6	76,19	68,6

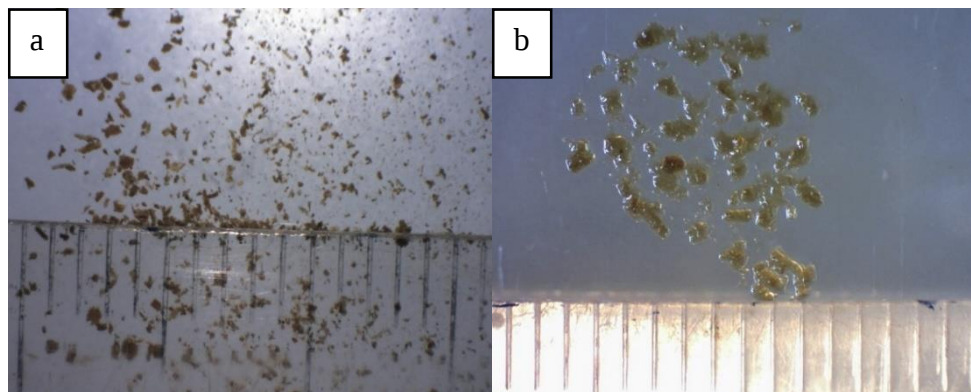
A táblázatból látható, hogy 1 g puffer mennyiség nem elegendő a hatékony hidrolízishez, és hogy a Cellic® CTec2 enzimekészítménnyel mind a három puffermennyiség esetében magasabb glükóz hozamot értem el. Ez az enzimek szubsztrát specificitásának köszönhető. Habár a Cellic® CTec2 esetében a nagyobb puffer mennyiség segítette a hidrolízist, de a nagyobb hígítás miatt a későbbi munkámhoz a 3,5 g-os puffermennyiséget választottam. Ez 1:7-es ionos folyadék:puffer aránynak felel meg, ami megegyezik az irodalomban találtakkal (Kamiya, 2008).

5.1.2. Kukorica szárából és leveléből készült őrlemény vizsgálata

5.1.2.1. Morfológiai változás eredménye

Miután a tisztított cellulózos kísérletekkel sikerült bizonyítanom, hogy az egy edényes ionos folyadékos előkezelés és enzimes hidrolízis működik, munkámat szántóföldről származó mezőgazdasági hulladékkal folytattam. Kukorica szárából és leveléből készítettem mintát, melyet tömegállandóságig szárítottam, daráltam és szita segítségével elválasztottam a 0,5 mm átmérőnél kisebb frakciót. Ezt, a legkisebb szemcseméretű frakciót, a tisztított cellulóznál alkalmazott körülmények között (0,5 g [Bmim]Cl ionos folyadék, 10 perc, 100 °C) 0,075 g

mennyiségben előkezeltem. A minta előkezelés alatti ragadós állaga miatt ebben az esetben is külső keverést alkalmaztam a hatékonyabb érintkeztetés elérése érdekében. A végbemenő morfológiai változásokat ebben az esetben is fénymikroszkóppal követtem nyomon (13. ábra).



13. ábra: a: A kukorica szárából és leveléből készített minta az ionos folyadékos előkezelés előtt; b: A kukorica szárából és leveléből készített minta a 10 perces ionos folyadékos előkezelés végén

A 13. a ábrán jól látható, hogy a szemcsék, a szítálás ellenére változatos méretűek és elkülöníthetők egymástól. A 13. b ábrán megfigyelhető, hogy a minta elfolyósodott és amorf lett, a szemcséket nem lehet megkülönböztetni egymástól. Látható, hogy az ionos folyadék oldja a kukorica szárából és leveléből készült őrléményt. Az eredmény megegyezik azzal, amit elvártam a tisztított cellulózos mérések alapján, és amit a vonatkozó irodalom tanulmányozásakor találtam (Auxenfans, 2012; Bahcegul, 2012; Swatloski, 2002). Az ionos folyadék a biomassa esetében is megbontotta a cellulóz rendezett, kristályos szerkezetét és ennek köszönhetően az enzimek könnyebben hidrolizálják azt.

5.1.2.2. Az egy edényes előkezelés és enzimes hidrolízis eredményei

A hidrolízis végrehajtásához 0,5 g [Bmim]Cl ionos folyadékban kezeltem elő 0,5 mm-nél kisebb szemcseméretű mintát 10 percen keresztül, 100 °C-on, 0,075 g (13 %), 0,1 g (16,67 %) és 0,125 g (20 %) mennyiségekben. Az előkezelés után 3,5 g nátrium-acetát puffert és Cellic® HTec2 valamint Cellic® CTec2 enzimek készítményét adtam a mintákhoz 15-15 µl mennyiségben, majd a két órás enzimes hidrolízis után orto-toluidin reagens segítségével mértem a felszabaduló redukáló cukor mennyiségét (11. táblázat).

11. táblázat: A felszabaduló redukáló cukor mennyisége és hozama különböző szubsztrát mennyiségek esetén

Szubsztrát mennyiség (mg)	Cellic® HTec2		Cellic® CTec2	
	Redukáló cukor mennyisége (mg)	Redukáló cukor hozam (%)	Redukáló cukor mennyisége (mg)	Redukáló cukor hozam (%)
75	6,99	9,3	10,06	13,4
100	13,82	13,8	11,61	11,6
125	9,11	7,3	11,14	8,9

A táblázatból látható, hogy mind a két enzimes készítménnyel sikerült bontani a biomasszát. Igaz, a táblázatban látható eredmények alacsonyabbak a tisztított cellulózokéhoz képest, de ez a lignocellulóz komplexebb struktúrájának köszönhető. Cellic® HTec2 enzimes készítmény esetében elmondható, hogy a szubsztrát mennyiségének növelésével nem nő a felszabaduló redukáló cukor mennyisége, ezért úgy tűnik, hogy elértem a szubsztrát telítettségi szintjét. Tovább növelve a mennyiségét nem szabadul fel több cukor. Cellic® CTec2 enzimes készítmény esetében az figyelhető meg, hogy növelve a szubsztrát mennyiségét csökken a redukáló cukor hozam. Ez az enzimek összetételével magyarázható, mivel a Cellic® CTec2 enzimes készítmény celluláz.

5.1.3. Kukorica szárából és leveléből készült őrlemény további vizsgálata az ionos folyadékok és enzimek különböző kombinációja esetén

Vizsgálataim folytatásába a [Bmim]Cl ionos folyadék mellé bevontam a [Bmim]Ac ionos folyadékot is. Ez is imidazólium kationt tartalmaz, bár az acetát anion miatt, irodalmi adatok alapján, kevésbé hatékonyan oldja a cellulózt (Elgharrawy, 2016), de ugyanakkor az enzimek aktivitását kevésbé csökkenti (Bahcegul, 2012). Munkámat 0,5 mm alatti szemcseméretű kukorica szárából és leveléből készült őrléménnyel végeztem, melyet két mennyiségben 26,4 mg (5 %) és 125 mg (20 %) kezeltem elő 0,5 g ionos folyadékban, 100 °C-on, 10 percen keresztül, külső keverést alkalmazva. Az enzimes hidrolízishez 3,5 g nátrium-acetát puffert és 15-15 µl Cellic® HTec2 valamint Cellic® CTec2 enzimes készítményt adtam a reakcióelegyhez. Az enzimes hidrolízist ebben az esetben is két órán át játszottam le. A felszabaduló redukáló cukor mennyiségét orto-toluidin reagens segítségével mértem (12. táblázat).

12. táblázat: A kukorica szárából és leveléből készült őrlemény vizsgálata az ionos folyadékok és az enzimek különböző kombinációja esetén kétféle koncentrációban

	[Bmim]Cl				[Bmim]Ac			
	Cellic® HTec2		Cellic® CTec2		Cellic® HTec2		Cellic® CTec2	
Kezelt anyag mennyisége (mg)	Felszabadult redukáló cukor (mg)	Hozam (%)	Felszabadult redukáló cukor (mg)	Hozam (%)	Felszabadult redukáló cukor (mg)	Hozam (%)	Felszabadult redukáló cukor (mg)	Hozam (%)
26,4	8,52	32,3	7,81	29,6	7,18	27,2	8,04	30,5
125	9,11	7,3	11,14	8,9	9,93	7,9	12,32	9,9

A táblázat adatai alapján elmondható, hogy mind a négy esetben a kisebb anyagmennyiség (26,4 g) előkezelésekor értem el nagyobb hozamot. Ez azzal magyarázható, hogy az ionos folyadékok hatékonyabban tudták megbontani a lignocellulóz szerkezetét. Ezekben az esetekben közel 30 %-os hozamokat értem el. A Cellic® CTec2 enzimek készítmény esetében nagy különbséget nem tapasztaltam a két különböző ionos folyadékos előkezelés alkalmával. [Bmim]Cl ionos folyadékos előkezelés után Cellic® HTec2 enzimek készítményt használva közel 5 %-al magasabb hozamot mértem, mint ugyanezzel az enzimmel [Bmim]Ac ionos folyadékos előkezelés után. Ez a különbség a [Bmim]Cl hatékonyabb cellulózbontó hatásával magyarázható, mely hatás viszont nem jött elő a Cellic® CTec2 enzimek készítmény esetében. Ebben a koncentrációban a [Bmim]Cl ionos folyadék és Cellic® HTec2 enzimek készítmény kombinációja mutatkozott a legjobbnak, így mértem a legmagasabb hozamot (32,3 %).

Nagyobb anyagmennyiséget előkezelve (125 mg) elmondható, hogy az enzimek közel ugyanakkora hozammal hidrolizálták a lignocellulózt, függetlenül az ionos folyadékos előkezeléstől, bár mindkét ionos folyadéknál megfigyelhető, hogy Cellic® HTec2 enzimek készítménnyel közel 2 %-al magasabb volt a hozam. Az enzimek készítmények között tapasztalt hozambéli különbség az enzimek szubsztrátspecifitásának köszönhető. Ebben az esetben a legmagasabb hozamot (9,9 %) a [Bmim]Ac ionos folyadék és a Cellic® CTec2 enzimek készítmény kombinációjakor kaptam.

5.1.4. Szalma őrlemény vizsgálata

Az ionos folyadékos előkezelés hatásának vizsgálatára végül a szalmát, mint másik megújuló forrásnak tekintett mezőgazdasági hulladékot használtam fel. A kukoricához hasonlóan előkezeltem (10 perc, 100 °C) és hidrolizáltam, de már csak a legnagyobb koncentrációt

vizsgáltam (20%), ami azt jelenti, hogy 0,125 g tömegállandóságig szárított szalmaőrleményt mértem be 0,5 g [Bmim]Cl ionos folyadékba. Az enzimes hidrolízishez 3,5 g nátrium-acetát puffert és 15-15 µl Cellic® HTec2 valamint Cellic® CTec2 enzimmészítményt adtam a reakcióelegyhez. Az enzimes hidrolízist ebben az esetben is két órán keresztül végeztem. A felszabaduló redukáló cukor mennyiségét orto-toluidin reagenssel mértem (13. táblázat).

13. táblázat: A szalmából, mint alapanyagból felszabaduló redukáló cukor mennyisége és annak töménysége a kiindulási anyagmennyiséghez képest (0,125 g) különböző enzimek esetén

Enzim	Redukáló cukor mennyisége (mg)	Redukáló cukor hozam (%)
Cellic® HTec2	7,07	5,7
Cellic® CTec2	8,89	7,1

A táblázatból látható, hogy bár a redukáló cukor hozamok alacsonyabbak a kukoricával mértékekhez képest, de szalmával is kivitelezhető a hidrolízis. A különbség a két növény eltérő felépítésének és így eltérő cellulóz tartalmának tulajdonítható. A kukorica szárából és leveléből készült őrleménynek 7,7% volt a hamutartalma és 44,9% a redukáló cukor tartalma, amit tömény savas hidrolízissel sikerült megmérnem. A szalma esetében 7,3% volt a hamutartalom és csak 29,6% a redukáló cukor tartalom.

5.1.5. A szalma őrlemény vizsgálata alapanyagként az ionos folyadékok és enzimek különböző kombinációja esetén

A kukoricával végzett mérések után szalmával is elvégeztem ugyanazt a mérést. Munkámat 0,5 mm alatti szemcseméretű, tömegállandóságig szárított szalmából készült őrleménnyel végeztem, melyet két koncentrációban, 26,4 mg (5 %) és 125 mg (20 %) kezeltem elő 0,5 g ionos folyadékokban ([Bmim]Cl, [Bmim]Ac), 100 °C-on, 10 percen keresztül, külső keverést alkalmazva. Az enzimes hidrolízishez ebben az esetben is 3,5 g nátrium-acetát puffert és 15-15 µl Cellic® HTec2 valamint Cellic® CTec2 enzimmészítményt adtam a reakcióelegyhez. A hidrolízist most is két órán át folytattam le (14. táblázat).

14. táblázat: A szalmából készült őrlemény vizsgálata az ionos folyadékok és az enzimek különböző kombinációja esetén kétféle koncentrációban

	[Bmim]Cl				[Bmim]Ac			
	Cellic® HTec2		Cellic® CTec2		Cellic® HTec2		Cellic® CTec2	
Kezelt anyag mennyisége (mg)	Felszabadult redukáló cukor (mg)	Hozam (%)	Felszabadult redukáló cukor (mg)	Hozam (%)	Felszabadult redukáló cukor (mg)	Hozam (%)	Felszabadult redukáló cukor (mg)	Hozam (%)
26,4	11,97	45,3	9,54	36,1	11,46	43,4	9,89	37,5
125	7,07	5,7	8,89	7,1	14,06	11,3	11,97	9,6

A táblázat adatai alapján elmondható, hogy szalma esetében is, kevesebb anyagot előkezelve (26,4 mg), magasabb hozam érhető el. Az enzimekkel hasonló hozamot értem el, függetlenül az ionos folyadékos előkezeléstől. Ezen belül is a Cellic® HTec2 enzimekcsítménnyel magasabb hozamot tapasztaltam ([Bmim]Cl esetében 9,2 %-al, [Bmim]Ac esetében pedig 5,9 %-al), mint a Cellic® CTec2 enzimekcsítménnyel. Ez az enzimekcsítmények eltérő összetételének köszönhető. Ebben a koncentrációban a legmagasabb hozamot (45,3 %) a [Bmim]Cl ionos folyadék és Cellic® HTec2 enzimekcsítmény kombinációja esetén kaptam.

Nagyobb mennyiségű anyagot (125 mg) előkezelve elmondható, hogy a [Bmim]Cl ionos folyadékos előkezelés után a hozamok alacsonyabbak lettek, mint a [Bmim]Ac ionos folyadékkal, függetlenül a használt enzimektől. A legmagasabb hozamot (11,3 %) a [Bmim]Ac ionos folyadék és Cellic® HTec2 enzimekcsítmény kombinációja esetén mértem.

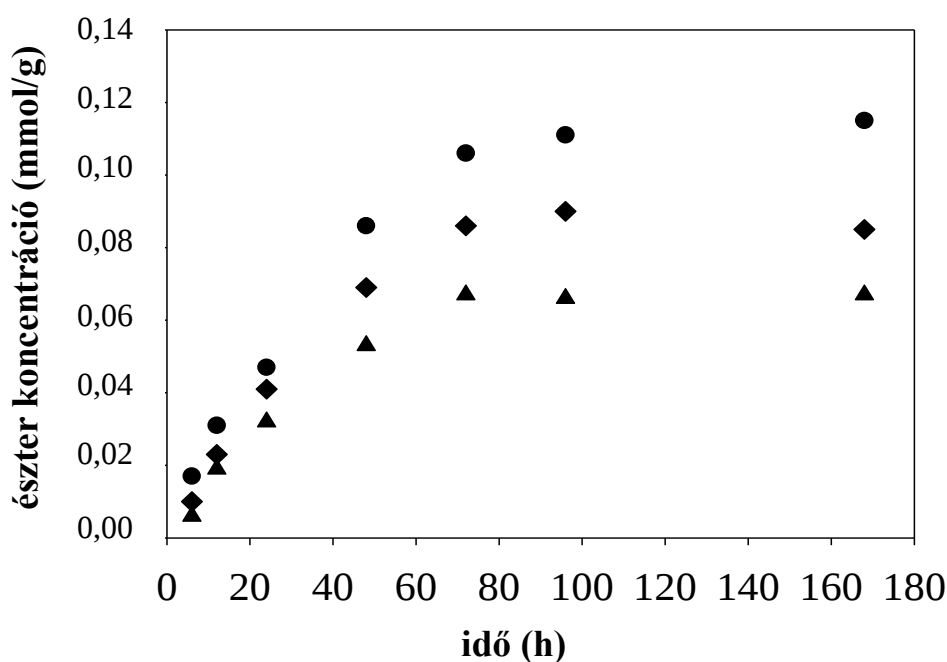
A szalma és a kukorica őrleményt összehasonlítva elmondható, hogy kisebb koncentrációban (5 %) előkezelve őket a szalmából nagyobb hozammal nyerhető ki a redukáló cukor. Nagyobb koncentráció esetén (20 %) kukoricánál [Bmim]Cl ionos folyadékkal előkezelt mintáknál tapasztaltam magasabb hozamot a szalmához képest. Míg [Bmim]Ac ionos folyadékkal előkezelt mintáknál a szalmával mértem magasabb hozam értékeket. Ennek magyarázata lehet a szalma kukoricához képest eltérő lignocellulóz tartalma és szerkezete. Kis koncentrációnál (5 %) a kukorica és a szalma őrleményénél is a [Bmim]Cl ionos folyadék és a Cellic® HTec2 enzimekcsítmény kombinációja esetén értem el a legmagasabb hozamot. Nagyobb koncentráció (20 %) esetén kukoricával [Bmim]Ac ionos folyadék és Cellic® CTec2 enzimekcsítmény kombinációja bizonyult a legjobbnak, míg szalma esetében [Bmim]Ac ionos folyadék és Cellic® HTec2 enzimekcsítmény kombinációja mutatkozott jobbnak.

5.2. Glükóz-palmitát enzimatisz előállítási vizsgálatának eredményei

Munkám ezen szakaszában a korábban kinyert glükóz egyik lehetséges tovább hasznosítását vizsgáltam. Felületaktív anyag előállításra esett választásom, mivel számos iparág használja. Környezetbarát enzimés észterezéssel hajtottam végre a reakciót ionos folyadékban, mivel ebben oldódik a glükóz és általam használt palmitinsav is.

5.2.1. Ionos folyadékok összehasonlítása

A méréseket 25 ml-es Erlenmeyer lombikban végeztem el, 210 rpm-en és 50 °C-on. A reakcióelegy palmitinsavból (0,5 mmol/g IL), glükózból (0,15 mmol/g IL), enzimből (0,5 g), vízből (10 µl) és ionos folyadékból állt. Az össztömeg 10 g volt és a reakció az enzim hozzáadásával indult. A kísérleteket három ionos folyadékkal kezdtem: [Bmim]PF₆, Cyphos 104 és Cyphos 109 (14. ábra), hogy a további kísérletekhez kiválaszthassam közülük a legjobbat. A reakciót az észter koncentráció mérésével követtem az egyensúly beálltáig.



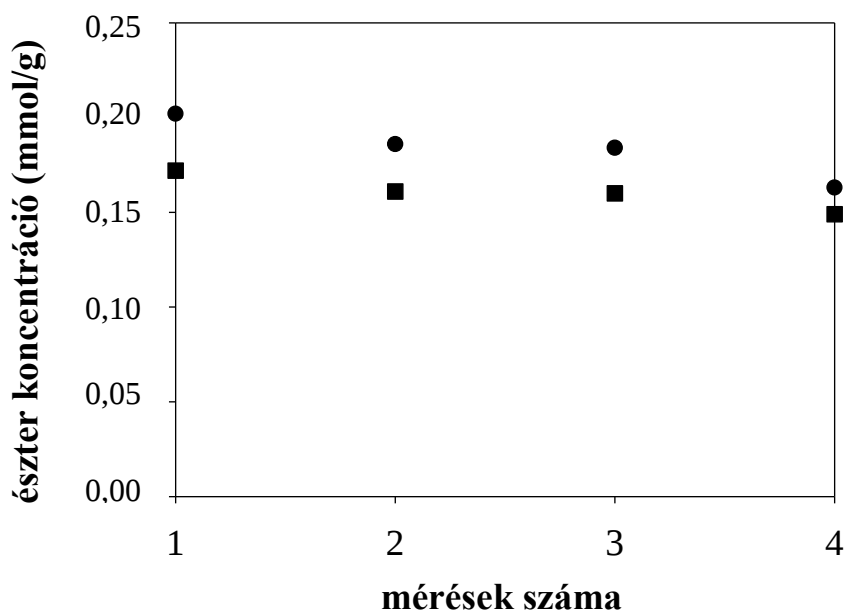
14. ábra: A három ionos folyadék összehasonlítása a glükóz-palmitát képződése során (fekete pont- [Bmim]PF₆; fekete rombusz- Cyphos 104; fekete háromszög- Cyphos 109)

Az ábráról leolvasható, hogy mind a három ionos folyadékban lejátszódott a reakció és képződött észter. Cyphos 104 esetében 0,090 mmol/l, Cyphos 109 esetében 0,067 mmol/l volt az észter koncentráció, ami 60 és 45%-os konverzióknak felel meg. A legjobb eredményt a

[Bmim]PF₆-al értem el, amivel 0,115 mmol/l volt a végső észter koncentráció, ami 77%-os konverziót jelent. Munkámat ezért a [Bmim]PF₆-al folytattam.

5.2.2. Enzim újrafelhasználás

A hosszabban tartó enzim használat során fellépő enzim inaktiváció kvalitatív becslésére ismételt kísérleteket végeztem 50 és 70 °C-on. Egy mérés 48 órán keresztül tartott. Az enzimet izopropil-alkohollal mostam, szárítottam, majd újra felhasználtam, összesen 4 alkalommal (15. ábra). A reakcióelegy glükózt (0,5 mmol/g), palmitinsavat (0,5 mmol/g), enzimet (0,5 g) és vizet (0,1 %) tartalmazott. A reakcióelegy tömege 10 g volt.



15. ábra: Enzim inaktiváció vizsgálata az enzimből készítmény újbóli hasznosítása során különböző hőmérsékleten (fekete pont- 70 °C, fekete négyzet- 50 °C)

Az ábráról leolvasható, hogy mindkét hőmérsékleten lépésről-lépésre csökkent a keletkezett észter koncentrációja. 70 °C-on a kezdeti 0,202 mmol/g szintről 19,3%-al csökkent a koncentráció, míg 50 °C-on a kezdeti 0,172 mmol/g értékről 13,4 %-os csökkenést tapasztaltam.

5.2.3. A kísérlettervezés eredménye

A 4.2.5. fejezetben meghatározott kísérleti paraméterek statisztikai eredményét a 15. táblázat tartalmazza. A táblázatban az egyes változók vagy azok együttes hatásai láthatóak.

15. táblázat: ANOVA analízis eredményei: modell és együttható validálás

	Négyzetösszeg	Szabadságfok	Átlag négyzete	F értéke	Proba > F
Észter koncentráció					
Model	0,082823	15	0,005522	400,6565	< 0,0001
A	0,002162	1	0,002162	156,8458	< 0,0001
B	0,039692	1	0,039692	2880,111	< 0,0001
C	0,025595	1	0,025595	1857,2	< 0,0001
D	0,000713	1	0,000713	51,70295	< 0,0001
AB	0,001116	1	0,001116	81	< 0,0001
AC	0,000604	1	0,000604	43,81179	< 0,0001
AD	8,13E-05	1	8,13E-05	5,897959	0,0273
BC	0,01182	1	0,01182	857,6531	< 0,0001
BD	0,000215	1	0,000215	15,62132	0,0011
CD	0,000399	1	0,000399	28,95465	< 0,0001
ABC	2,28E-05	1	2,28E-05	1,653061	0,2168
ABD	1,65E-05	1	1,65E-05	1,199546	0,2896
ACD	8,78E-05	1	8,78E-05	6,369615	0,0226
BCD	7,5E-05	1	7,5E-05	5,444444	0,0330
ABCD	0,000226	1	0,000226	16,38322	0,0009
Nem linearitás	8,93E-05	1	8,93E-05	6,476259	0,0216
Maradék hiba	0,000221	16	1,38E-05		
Teljes modell korreláció	0,083133	32			

A próba értéke segít különbséget tenni szignifikáns és nem szignifikáns változók között. Ha F értéke 0,05 alatt van, akkor szignifikáns a modell változó hatása, ha értéke magasabb, mint 0,1, akkor a modell változó hatása nem szignifikáns. A táblázatból leolvasható, hogy egyenként minden változónak szignifikáns hatása van az észter képződésre.

Az adatok többszörös regressziós analízise megfelel az észter tartalomnak, mint célfüggvény a modell egyenletben:

$$\begin{aligned}\text{észter tartalom} = & 0,101406 + 0,008219 \cdot A + 0,035219 \cdot B + 0,028281 \cdot C - 0,00472 \cdot D + \\ & 0,005906 \cdot A \cdot B + 0,004344 \cdot A \cdot C + 0,001594 \cdot A \cdot D + 0,019219 \cdot B \cdot C + 0,002594 \cdot B \cdot D + \\ & 0,003531 \cdot C \cdot D - 0,00084 \cdot A \cdot B \cdot C - 0,00072 \cdot A \cdot B \cdot D - 0,00166 \cdot A \cdot C \cdot D - 0,00153 \cdot B \cdot C \cdot D + \\ & 0,002656 \cdot A \cdot B \cdot C \cdot D\end{aligned}$$

A bemutatott modell leírja az összes változó hatását a célfüggvényre. A modell megfelelését ANOVA analízissel ellenőriztem. Az egyenlet alapján az F értéke 400,66 volt, ami azt jelenti, hogy a modell szignifikáns.

A 4.2.5. fejezetben meghatározott reakció paraméterek alapján elvégzett mérések eredményeit a 16. táblázatban foglaltam össze.

16. táblázat: A 4.2.5. fejezetben meghatározott paraméterek és az azokhoz tartozó mérési eredmények

Mintas szám	A T (°C)	B glükóz (mmol/g)	C palmitinsav (mmol/g)	D víz (%)	észter koncentráció (mmol/g)
1	50	0,15	0,5	0,5	0,066
2	50	0,5	0,5	0,1	0,172
3	50	0,5	0,15	0,5	0,077
4	50	0,5	0,15	0,1	0,085
5	50	0,5	0,5	0,1	0,165
6	70	0,5	0,15	0,1	0,107
7	70	0,5	0,5	0,5	0,202
8	70	0,5	0,15	0,5	0,099
9	70	0,15	0,5	0,1	0,085
10	50	0,15	0,15	0,5	0,042
11	50	0,5	0,5	0,5	0,16
12	70	0,15	0,15	0,1	0,058
13	50	0,5	0,15	0,5	0,072
14	70	0,5	0,5	0,1	0,202
15	50	0,15	0,5	0,1	0,07
16	70	0,15	0,5	0,5	0,081
17	70	0,15	0,15	0,5	0,052
18	70	0,5	0,15	0,1	0,101
19	70	0,5	0,5	0,5	0,205
20	50	0,15	0,15	0,5	0,04
21	70	0,15	0,15	0,1	0,062
22	50	0,5	0,15	0,1	0,08
23	50	0,15	0,15	0,1	0,081
24	70	0,15	0,5	0,1	0,089
25	50	0,5	0,5	0,5	0,169
26	70	0,15	0,15	0,5	0,045
27	50	0,15	0,15	0,1	0,077
28	70	0,5	0,5	0,1	0,198
29	70	0,5	0,15	0,5	0,092
30	50	0,15	0,5	0,5	0,069
31	60	0,33	0,33	0,3	0,111
32	70	0,15	0,5	0,5	0,076
33	50	0,15	0,5	0,1	0,066

A táblázatban látható, hogy 48 óra után a legmagasabb észter koncentráció 0,205 mmol/g volt 70 °C-on 0,5 mmol/g glükóz és palmitinsav, valamint 0,5% víztartalom mellett, ami 41%-os konverziónak felel meg. A legnagyobb konverzió 71% volt, (6. sor), mikor glükóz

fölösleg volt a rendszerben. Az optimalás célja olyan kezdeti reakcióparaméterek keresése volt, melyeknél az észter koncentráció maximális.

5.2.4. Glükóz-palmitát előállítása az optimális reakció paraméterekkel

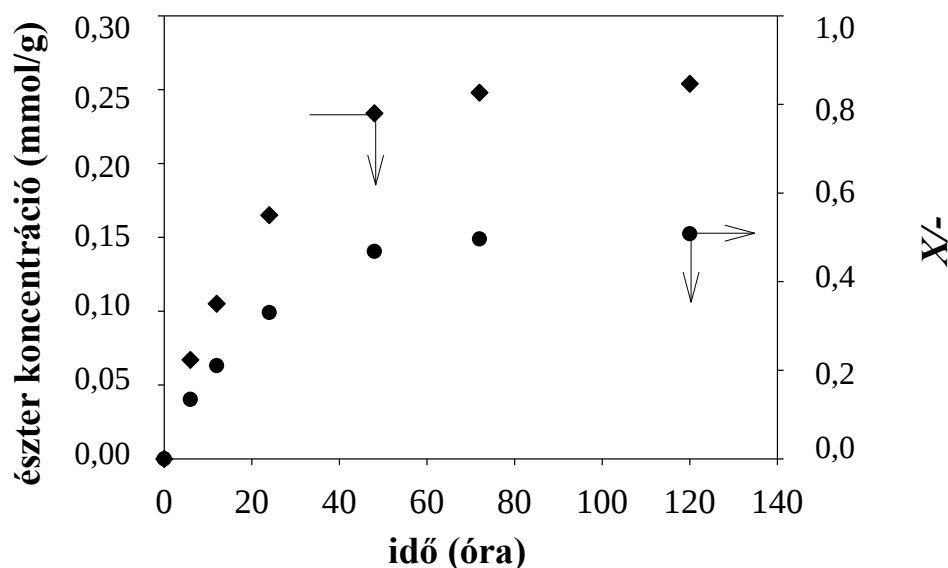
A 17. táblázatban láthatóak a szoftver által optimálisnak javasolt reakciókörülmények.

17. táblázat: A modell optimális oldatai

Név	Célfüggvény	Alsó határ	Felső határ	Fontosság
A: hőmérséklet	tartományban	50	70	3
B: glükóz	tartományban	0,15	0,5	3
C: palmitinsav	tartományban	0,15	0,5	3
D: víz	tartományban	0,1	0,5	3
észter tartalom	maximum	0,04	0,205	5
konverzió	maximum	0,27	0,71	5

Oldatok – Észter tartalom						
Szám	Hőmérséklet (°C)	Glükóz (mmol/g)	Palmitinsav (mmol/g)	Víz (%)	Észter tartalom (mmol/g)	Megfelelő- ségi faktor
1	70	0,5	0,5	0,37	0,202	0,98
2	70	0,5	0,5	0,34	0,202	0,98
3	70	0,5	0,5	0,23	0,201	0,98
4	70	0,5	0,5	0,21	0,201	0,98
5	69,94	0,5	0,5	0,19	0,201	0,97
6	69,63	0,5	0,5	0,14	0,200	0,97
7	67,22	0,5	0,5	0,50	0,198	0,96
8	68,3	0,5	0,5	0,10	0,197	0,95
9	70	0,5	0,46	0,37	0,191	0,91
10	70	0,5	0,45	0,50	0,189	0,90

A szoftver által optimálisnak javasolt reakciókörülmények paramétereinél jól megfigyelhető, hogy minden értéket a felső határon, vagy ahhoz közel állapított meg. Nagyobb változásokat csak a víztartalomban ajánlott. Ennek megfelelően az észter tartalom eredményei és a megfelelőségi faktorok között nagyon kicsi az eltérés. A legmagasabb észter tartalom (0,202 mmol/g) az első két sor paramétere mellett várható (70 °C; glükóz: 0,5 mmol/g; palmitinsav: 0,5 mmol/g; víz: 0,37 illetve 0,34 %) melyek megfelelőségi faktora 0,98. A legalacsonyabb észter tartalom (0,189 mmol/g) a tizedik sor paramétere mellett várható (70 °C; glükóz: 0,5 mmol/g; palmitinsav: 0,45 mmol/g; víz: 0,5 %), ennek megfelelőségi faktora a legalacsonyabb, 0,9. A táblázatból a 9-es számút választottam a mérés elvégzéséhez (16. ábra).



16. ábra: Az észter koncentráció meghatározására szolgáló statisztikai modell validálása.

Glükóz és palmitinsav észterezése az optimális feltételekkel (70 °C, glükóz: 0,5 mmol/g, palmitinsav: 0,5 mmol/g, 0,35 % víz, 9,77g ionos folyadék) a maximális észter koncentráció eléréséhez (fekete négyszög: észter koncentráció, fekete kör: szubsztrát konverzió).

Az ábráról leolvasható, hogy az észter koncentráció 120 óra után érte el a legmagasabb értéket, ami 0,254 mmol/g volt.

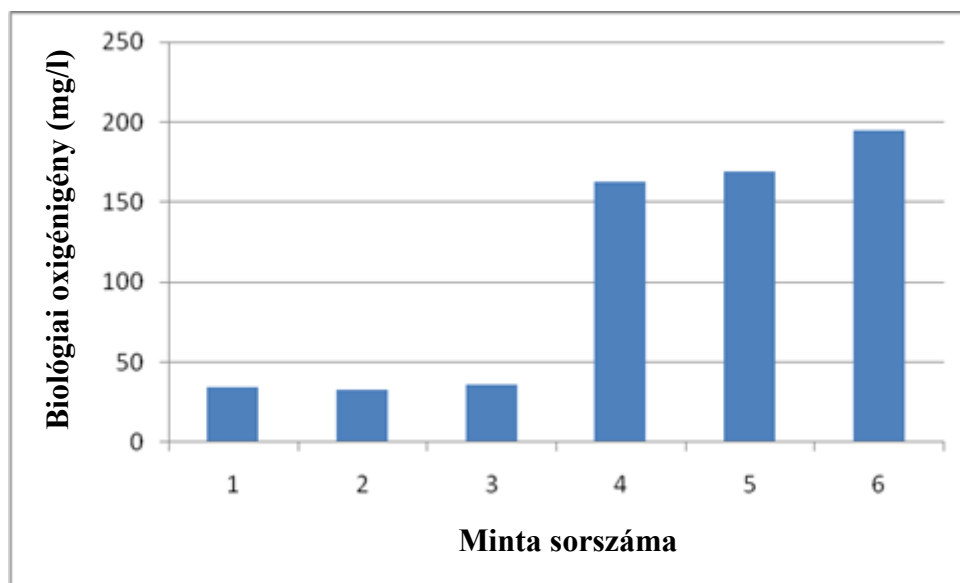
5.3. Biológiai oxigénigény mérés eredménye

Az ionos folyadékok toxikus hatását és biológiai bonthatóságát biológiai oxigénigény (BOI) mérés segítségével vizsgáltam. Kísérleteimmel két kérdésre kerestem a választ.

- Önmagában lebontható-e a felhasznált ionos folyadék?
- Gátolja-e más szénforrások lebontását, illetve ilyen co-fermentációs módon lebontható-e az ionos folyadék?

Az első kérdés megválaszolásához érzékeny tartományban (0-80 mg/l) vizsgáltam a BOI₅ értékeket. A felnövesztett baktérium kultúrából kivettem 365 ml-t, ez volt a vak próba, valamint 1-1 üvegbe a 365 ml-be tettem 100-100 mg/l koncentrációban [Bmim]Cl-ot és [Bmim]Ac-ot, így az ionos folyadékokra is kaptam 1-1 mintát.

A második kérdés vizsgálatához szélesebb (0-400 mg/l) tartományban végeztem a kísérleteket. A mintákhoz 164 ml-et mértem ki a felnövesztett baktérium kultúrából, és ehhez tettem 150 mg/l koncentrációban glükózt illetve glutaminsavat, NTH600 nitrifikáló gátlót, valamint 100 mg/l koncentrációban [Bmim]Cl-ot és [Bmim]Ac-ot. A mérés 5 napon keresztül folyt 20 °C-on Oxitop controll 110 mérőrendszer segítségével (17. ábra).



17. ábra: A biológiai oxigén igény mérés eredménye (1: felnövesztett baktériumkultúra; 2: felnövesztett baktériumkultúra és [Bmim]Cl (100 mg/l); 3: felnövesztett baktériumkultúra és [Bmim]Ac; 4: felnövesztett baktériumkultúra, glükóz és glutaminsav (150-150 mg/l); 5: felnövesztett baktériumkultúra, glükóz és glutaminsav (150-150 mg/l) és [Bmim]Cl (100 mg/l); 6: felnövesztett baktériumkultúra, glükóz és glutaminsav (150-150 mg/l) és [Bmim]Ac (100 mg/l))

Az ábráról leolvasható, hogy az ionos folyadék plusz szénforrás nélkül (2-3 minta) biológiai úton nem bontható, a baktériumok számára fel nem használható szénforrás. Mivel nem okozott csökkenést a BOI értékben, ezért ebben a koncentrációban, az irodalmi adatokkal ellentétben (Garcia, 2005), nem is toxikus, ami megegyezik Diaz és munkatársai (2018) eredményével. Ők azt tapasztalták, hogy ebben a koncentrációba a [Bmim]Cl gyakorlatilag ártalmatlan a szennyvíz iszapban található baktériumokra, valamint *Vibrio fischeri*-re (Diaz, 2018).

Plusz szénforrás hozzáadásakor (5-6. minta) toxicitást nem tapasztaltam. [Bmim]Cl esetében nem figyelhető meg BOI növekedés, ami arra enged következtetni, hogy még plusz szénforrás mellett sem bomlik biológiai úton, ami egybecseng az irodalmi adatokkal (Jordan, 2015; Stolte, 2007). A [Bmim]Ac-nál megfigyelhető BOI növekedés azt jelenti, hogy ez az ionos folyadék részben bontható biológiai úton. Ez a bonthatóság az acetát csoportnak tulajdonítható, mely könnyen felhasználható szénforrás. A mérési eredmények alapján elmondható, hogy az általam használt ionos folyadékok kation csoportjai aerob környezetben biológiai úton nem bomlanak le.

Az ionos folyadékok magas ára miatt is kerülni kell a környezetbe való kijutásukat. Ha ki is kerülnek, ez valószínűleg kis koncentrációban fog megtörténni, ezért nem vizsgáltam a toxicitást nagyobb koncentráció esetén. Az ionos anyagok, részben vízmegkötő sajátságaik miatt, nagy koncentrációban egyébként is toxikusak.

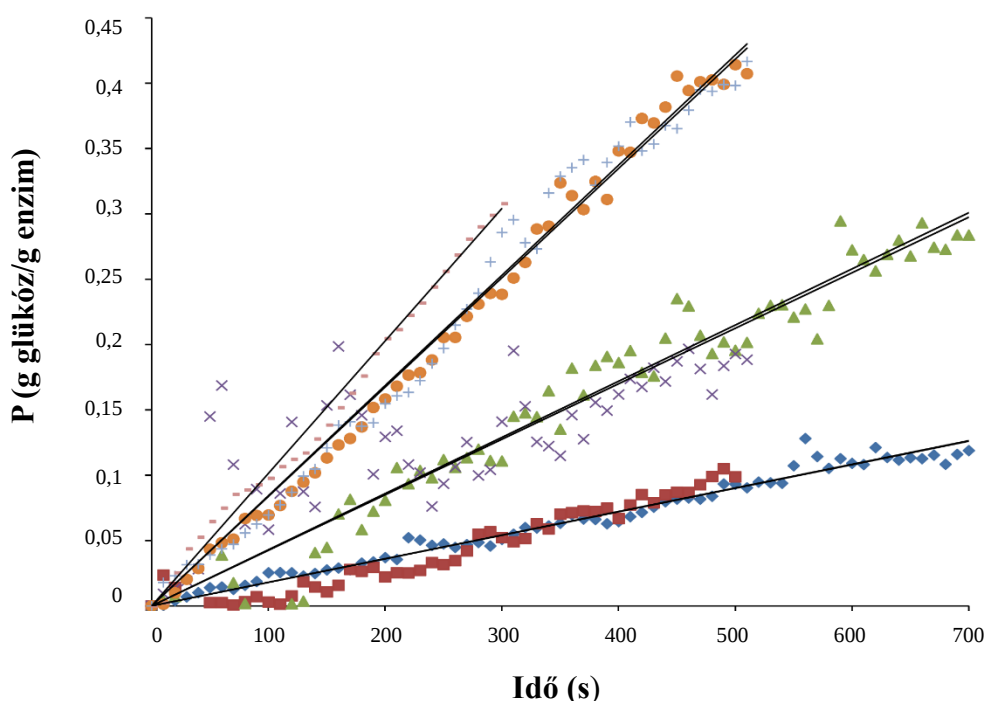
5.4. Enzim kinetikájának mérési eredménye

Munkám utolsó részében azt vizsgáltam, hogy az ionos folyadék jelenléte befolyásolja-e a kereskedelmi forgalomban is kapható Cellic® HTec2 celluláz enzimkészítményt. Ezt azért fontos tudni, mert ha az ionos folyadék kapcsolatba kerül a celluláz enzimmal, mivel az ionos folyadék visszanyerése nem biztos, hogy teljes, akkor ez a kapcsolat befolyásolhatja az egy lépéses előkezelés és enzimes hidrolízis eredményességét.

5.4.1. Cellulóz hidrolízis [Bmim]Cl ionos folyadék nélkül

E mérés során a cellulóz hidrolízisének kinetikáját vizsgáltam ionos folyadék jelenléte nélkül. Ezt az indokolta, hogy átfogóbb képet kapjak az enzim kinetikájáról, és össze tudjam vetni az ionos folyadékot tartalmazó mérésekkel. Modell anyagként karboxi-metil-cellulózt használtam, melyet a kereskedelmi forgalomban is kapható Cellic® HTec2 enzimkészítménnyel hidrolizáltam. A mérések során kapott eredményeket a 18. ábrán foglaltam össze. Az ábráról

leolvasható, hogy a glükóz képződése egyenesen arányos az idővel, ami a nagy R^2 értékekből is érzékelhető (18. táblázat). Habár a kezdeti reakció sebesség bizonytalan, az ismételések azt jelzik, hogy az eredmények megismételhetők és megbízhatóak további analízisre. V_0 értékelése nagy mennyiségű adat felhasználását feltételezi egy bizonyos időn belül, máskülönben félrevezethető lehet, mivel az idő múlásával csökken a cellulóz hidrolízis mértéke (Carrillo, 2005). Ezért, irodalmi adathoz hasonlóan (Yeh, 2010), az első 10-15 percen rögzítettem az adatokat.



18. ábra: Cellulóz hidrolízisének tipikus előre haladása ([Bmim]Cl nélkül, különböző kiindulási szubsztrát koncentrációkkal) kék négyszög és piros kocka: $[S]=0,5$ g/l; zöld háromszög és lila kereszt: $[S]=2$ g/l; kék plusz és narancssárga pont: $[S]=5$ g/l; rózsaszín kötőjel $[S]=25$ g/l

18. táblázat: Példa az egyenes analízisre, ami bemutatja a kezdeti reakció sebességet (V) a 18. ábra adatai alapján

[S] (g/l)	Trendvonal tulajdonságai				V (g glukóz/ g enzim-perc)
	Első mérés		Második mérés		
	meredekség (g glukóz/ g enzim-s)	R ²	meredekség (g glukóz/ g enzim-s)	R ²	
0,5	0,00018	0,98	0,000181	0,91	0,011
2	0,00043	0,91	0,000425	0,95	0,026
5	0,000837	0,99	0,000843	0,99	0,051
25	0,001013	0,99			0,06

A cellulóz hidrolízis időprofiljából látható (18. ábra), hogy a növelt V_0 érték elérte a növekvő szubsztrát koncentrációt. Lineweaver-Burk kettős reciprok ábrázolást alkalmazva ($V_0^{-1} - [S]^{-1}$), a Michaelis-Menten modell értékeit ki lehetett számolni, melynek eredményei $K_s=2,57$ g/l és $V_{\max}=0,068$ g glükóz/g enzim- perc lettek. K_s hasonló értéket mutat mint amit Yeh és munkatársai (2010) mértek mikrokristályos pamut cellulóz szubsztráttal és *T. reesei* ATCC 26921 celluláz enzimmel.

Általánosságban elmondható, hogy a Michaelis-Menten kinetika használata a kísérleti eredmények tárgyalásakor megköveteli, hogy az enzim:szubsztrát arány $<0,15$ legyen, ami biztosítja, hogy a mechanisztikus modell alkalmazható (Bezerra, 2004, 2005) és a szubsztrát nem limitáló. Méréseim során az enzim:szubsztrát arány 0,024; 0,12; 0,3 és 1,2 voltak, és kizárólag a kezdeti szubsztrát koncentrációtól függtek, mivel az enzim koncentráció állandó volt (600 mg/l). Habár látszólag nem mindegyik felelt meg a kritériumoknak, megfelelő volt a korreláció a mérési eredmények és a Michaelis-Menten kinetika között. Ez az ellentmondás az enzim tulajdonságaival magyarázható. A Cellic HTec2 egy kereskedelmi forgalomban kapható készítmény és nem nagy tisztaságú celluláz. Az ilyen készítmények cellulázok és hemicellulázok keverékének tekinthetők (Samayam, 2010), habár a pontos összetevőjük és komponensek relatív aránya nem ismert (Barr, 2012). Így a használt enzimnek valójában csak egy része vesz részt a hidrolízisben. Következésképpen a valódi enzim-szubsztrát arány alacsonyabb volt a $<0,15$ küszöb értéknél még az alacsony kezdeti szubsztrát koncentrációknál (0,5-2 g/l) is, így a Michaelis-Menten elmélet érvényes volt a figyelembe vett kísérleti határokon belül és megfelelő becslést adott a hidrolízis folyamatára.

5.4.2. Cellulóz enzimatisz hidrolízis gátlásának eredményei [Bmim]Cl ionos folyadék jelenlétében

Ebben a mérési sorban az előző pontban említett karboxi-metil-cellulózhoz és Cellic® HTec2 enzimkészítményhez a lignocellulóz előkezelésére széles körben használt [Bmim]Cl ionos folyadékot is adtam, hogy megvizsgáljam annak hatását az enzimes hidrolízisre. Korábbi tanulmányokból az derült ki, hogy vizes puffer és ionos folyadék keverékét vizsgálva az ionos folyadék negatívan befolyásolhatja a cellulóz hidrolízisét (Kamiya, 2008; Turner, 2003). Kamiya és munkatársai (2008) úgy találták, hogy a hidrolízis *Trichoderma reesei*-ből származó cellulázzal, citrát pufferben teljesen megállt, mikor a reakcióelegy 40 v/v%-nál több [Emim]Dep-et tartalmazott, ami azt jelenti, hogy az ionos folyadék aránya meghatározó faktor.

Turner és munkatársai (2003) [Bmim]Cl ionos folyadékkal pedig úgy találták, hogy a magas Cl^- -ion koncentráció gátolja a hidrolízist, mert zavart okoz a cellulóz és az ionos folyadék között.

Irodalmi példákból tisztán látszik, hogy a cellulóz enzimatis hidrolízise érzékeny az ionos folyadékok jelenlétére. Azonban még mindig kérdéses, hogy az inhibíciós mechanizmusok közül (kompetitív, un-kompetitív, kevert, nem kompetitív) melyik felelős a reakciósebesség csökkenésért. Ezért végeztem enzim kinetikai méréseket.

A 19. ábra analízise Lineweaver-Burk kettős reciprok technika használatával (Lineweaver, 1934) (V^{-1} vs. $[S]^{-1}$ együtt a különböző inhibitor koncentrációkkal $[I]$, 50-250 mg [Bmim]Cl/l) megmutatta, hogy ez az inhibíciós folyamat a kompetitív típusba tartozik (Marangoni, 2003). Így, az elemzés értelmében az eltérés a kezdeti reakciósebességekben, melyet a Michaelis-Menten modell mutatott (nincs inhibíció) a 3. egyenlet által megalapozott mechanizmussal történt.

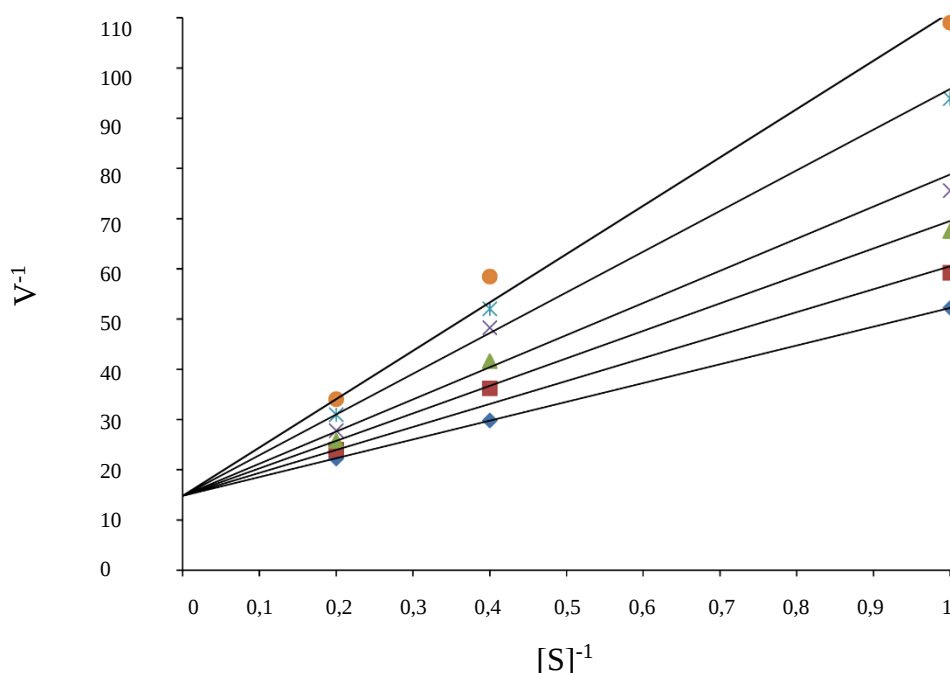
$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} \quad (3)$$

K_i és K'_i - enzim-gátló és (enzim-szubsztrát)-gátló megoszlási konstans (g/l)

$[I]$ - aktuális (kezdeti) inhibitor koncentráció (g/l)

$[S]$ - aktuális (kezdeti) szubsztrát koncentráció (g/l)

K_s - fél telítési koncentráció (g/l)



19. ábra: Enzim inhibíciós teszt kinetikai értékelésének eredményei cellulóz hidrolízise közben különböző kiindulási [Bmim]Cl ionos folyadék és szubsztrát koncentrációk esetén. Kék négyszög: [Bmim]Cl nélkül; piros kocka: 50 mg/l [Bmim]Cl; zöld háromszög: 100 mg/l [Bmim]Cl; lila kereszt: 150 mg/l [Bmim]Cl; kék csillag: 200 mg/l [Bmim]Cl; narancssárga pont: 250 mg/l [Bmim]Cl

Mikor elemeztem az adatokat (19. ábra) a katalízis paramétereinek a becslésére, megfigyeltem, hogy a $V_{\max}$ nem változik a kompetitív inhibíció jellemzője szerint, miközben a K_s -t befolyásolja az inhibitor koncentrációja ($[I]$) és az enzim-inhibitor disszociációs állandója (K_i) (3. egyenlet). Mivel a kísérleti eredmények kompetitív inhibíciót sugallnak, amit a [Bmim]Cl ionos folyadék okoz, ez azt jelenti, hogy az inhibitor versenyez az enzim szubsztrát kötő helyéért, és mialatt az enzim-inhibitor komplex alakul ki az enzim-szubsztrát helyett, az enzim nem tudja kifejteni katalitikus aktivitását. Összefoglalva, úgy tűnik, hogy a Cellic® HTec2 enzim gátlódik [Bmim]Cl ionos folyadék jelenlétében, még alacsony koncentráción is $[I]$. Ennek a típusú inhibíciónak az elnyomására megoldás lehet a nagyobb enzim valamint szubsztrát koncentráció, így növelve az enzim-szubsztrát kapcsolat létrejöttének valószínűségét az enzim-inhibitor helyett. Az enzim inhibíció kinetikai analízisének összefoglalásaképpen (36. ábra, 19. táblázat) a $K_i=0,163$ g/l értéket kaptam.

19. táblázat: Az illeszkedő trendvonalak jellemzői (36. ábra) a [Bmim]Cl koncentráció függvényében a maximális kezdeti reakciósebesség ($V_{\max}$) és enzim-inhibitor disszociációs állandó (K_i) becslésére a kompetitív inhibíciós modellben.

	[Bmim]Cl koncentráció (mg/l)				
	50	100	150	200	250
meredekség	45,71	54,71	63,99	81,04	96,27
tengelymetszet	14,82	14,82	14,82	14,82	14,82
R^2	0,98	0,97	0,94	0,99	0,99

Általában, növelve a $[I]/K_i$ hányadost, még inkább csökken az enzim affinitása a szubsztráthoz, ez okozza a K_s emelkedését. Például, ha a [Bmim]Cl koncentráció eléri a K_i értékét, akkor az megduplázza az eredeti K_s értékét a mechanisztikus modell kompetitív inhibíciós egyenlete alapján (3. egyenlet).

5.4.3. Celluláz enzim deaktiválása [Bmim]Cl ionos folyadék jelenlétében

Turner és munkatársai (2003) megállapították, hogy nem csak inhibíció, hanem celluláz deaktiváció is előfordulhat, mikor az enzimek kapcsolatba kerülnek az ionos folyadékkal az oldatban. Ahogy kikövetkeztették, az enzim denaturáció egy lehetséges eredmény, és ilyen esetben az ezt leküzdő módszerek talán képtelenek újra feltekerni, aktiválni a cellulázt. A deaktiváció (vagy irreverzibilis gátlás) az egyik legfőbb ismert jelenség a cellulóz hidrolízis sebességének csökkenésében (Bansal, 2009), mely limitálja a folyamat hatékonyságát.

Hogy megítéljem a Cellic® HTec2 enzimben lévő celluláz inaktiválódását, kísérletet végeztem, melyben az enzimet különböző ideig inkubáltam [Bmim]Cl ionos folyadékban, majd vizsgáltam a kezdeti reakció sebességeket, hogy megállapítsam a megmaradt enzim aktivitást. A 20. ábráról leolvasható, hogy a kezelés időtartama befolyásolja V_0 értékét, ezzel jelezve, hogy a celluláz érintkezése hígítatlan [Bmim]Cl-al – még rövid időn belül is – enzim aktivitás csökkenéshez vezet. Az

$$A = \frac{a_t}{a_0} = e^{-k_{de1}t} \quad (6)$$

A- relatív enzim aktivitás

a_t - mért aktivitás ionos folyadék jelenlétében (különös képpen 50 mg/l-el) miután az enzimet

különböző ideig (t) kezeltem hígítatlan ionos folyadékban

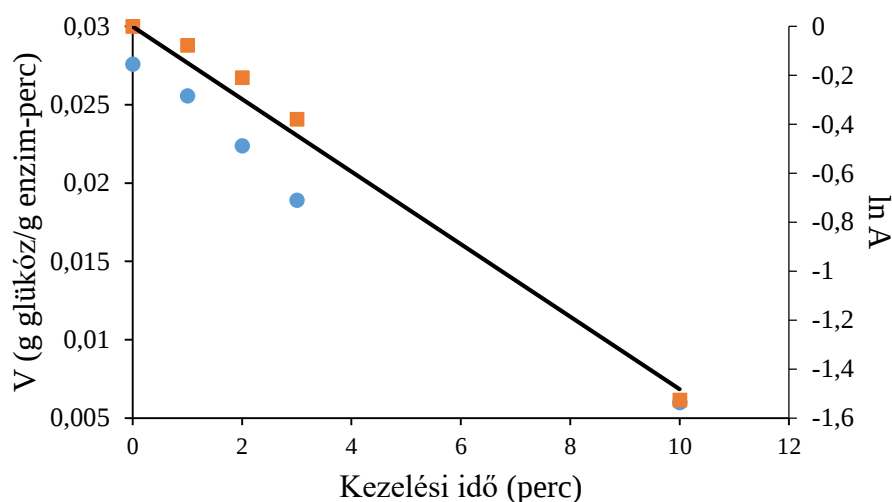
a_0 - mért aktivitás ionos folyadék jelenlétében (különös képpen 50 mg/l-el) megelőző enzim

inkubálás nélkül hígítatlan ionos folyadékban (t=0, alap aktivitás)

k_{de1} - celluláz deaktiváció elsőrendű sebességi állandója (min^{-1})

e- exponenciális együttható (2,718)

egyenlet alapján kinetikai vizsgálatot végeztem, a deaktivációs konstans meghatározására. A 20. ábra alsó részéhez egy jól illeszkedő egyenest lehet húzni, ezért egy első rendű deaktivációs kinetika igazolható (Lencki, 1992) és $k_{de1}=0,132/\text{perc}$ értéket állapítottam meg. Salvador és munkatársai (2010) hasonló eredményeket kaptak különböző inkubálási időkkel 10%-os [Bmim]Cl-ban. Habár a vizsgálatuk szerint a megmaradt enzim aktivitás közelebb volt a kiindulásihoz, még 40 perces ionos folyadékos kezeléskor is a csökkenés 13-14% volt, ami azt sugallja, hogy az inhibíció nagyrészt leginkább visszafordítható jellegű, és elsősorban különböző körülmények közötti termodinamikai víz aktivitás változásnak tulajdonítható. Az is világosan látszik, hogy az ionos folyadék koncentrációjának növelése hátrányos az enzim szempontjából (Xiao, 2012; Salvador, 2010). Engel és munkatársai (2010) Celluclast celluláz enzimmél figyeltek meg jelentős enzim aktivitás csökkenést 10%-os [Bmim]Cl tartalom esetében.



20. ábra: Enzim deaktivációs vizsgálat kinetikai értékelése, kék pont: kezdeti reakciósebesség; piros négyyszög: relatív enzim aktivitás természetes alapú logaritmusa

Az irodalmi adatokat is figyelembe véve úgy tűnik, hogy a celluláz enzim, még ha rövid ideig is kerül kapcsolatba hígítatlan ionos folyadékkal, akkor az enzim deaktiválódhat. Ez magyarázhatja, hogy a méréseim során miért csökkent a reakció sebesség - ami közel 25%-os enzim aktivitás csökkenést jelentett a kontrollhoz (a_0) képest - még akkor is, ha csak 1 percig volt inkubálva hígítatlan [Bmim]Cl-ban. Ez a jelenség akkor érdekes amikor *in situ* celluláz hidrolízist végzünk, „egy-edényes” folyamatot tervezünk. Ebben az elrendezésben a cellulóz nyersanyagot elő kell kezelni koncentrált ionos folyadékkal, hogy a poliszacharid részek oldását elősegítsük és így az enzimek munkáját könnyítsük. Ezután a hidrolízist végző enzimeket – melyek puffer oldatban vannak – ugyanabba a tartályba töltjük, ami az ionos folyadékban oldott cellulózt tartalmazza (Shi, 2013). Számos ionos folyadék, szerkezeti felépítésüktől függően, hidrofíl (a [Bmim]Cl is) és ezért bizonyos mértékben vízzel oldható (Huddleston, 2001). Ebben az esetben az ionos folyadékok többé-kevésbé egyenletesen eloszlanak a reakcióközegben, ami megteremti a lehetőségét, hogy a koncentrációjukat elég alacsony szinten tartsuk. Megfelelő hígítási faktort kell választani, mert a [Bmim]Cl még kis koncentrációban is akadályozhatja a hidrolízist. Ezen kívül befolyásolhatja a gátló hatást az oldás módja (Li, 2013), a keverés megválasztása és olyan celluláz alkalmazása, mely kellően ellenálló és ilyen körülmények között is működőképes (Nordwald, 2014; Raddadi, 2013), azaz halofil, ionos folyadéknak ellenálló celluláz (Gunny, 2014; Xu, 2016a). Valamint az enzimek immobilizálása (Xu, 2016b) javasolt, melyek talán jobban ellenállnak az ionos folyadékok negatív hatásainak. Más esetekben, mikor az ionos folyadék nem oldódik vízben, kétfázisú rendszer alakul ki (Kuroda, 2016), és a cellulóz bontás a határfelületen megy végbe, ahol az enzim nagyobb valószínűséggel találkozhat a koncentrált ionos folyadékkal, ez is veszélyt jelent a folyamatra. A cellulóz

előkezelés és az elválasztott hidrolízis alkalmazása esetében melyek a regenerált cellulózra támaszkodnak, az ionos folyadék maradékát amennyire lehetséges kimosással el kell távolítani, hogy elkerüljük az inhibíció létrejöttét (Li, 2013).

6. Összefoglalás

Munkám célja a lignocellulózból történő redukáló cukor kinyerésének intenzifikálása, az előkezelés és a hidrolízis lépések azonos reakcióközegben történő megvalósítása, majd az így kinyert cukor, mint alapanyag továbbhasznosítása és egy értékesebb terméké alakítása volt.

A vonatkozó irodalom áttekintése során kiderült, hogy az ionos folyadékok, ezek a sok esetben „zöld”, tervezhető tulajdonságú oldószerek kiválóan alkalmasak a lignocellulóz tartalmú anyagok előkezelésére: oldják a cellulózt és az előkezelés után kinyert amorf cellulóz a celluláz enzimek számára könnyen lebonthatóvá vált. A fénymikroszkóppal készült felvételeken jól nyomon követhető volt a feldolgozott anyag morfológiájában bekövetkező változás. Munkám során sikerült bizonyítanom, hogy az irodalmi adatokkal ellentétben (Salvador, 2010; Kamiya, 2008; Turner, 2003) ez a két lépés, az előkezelés és az enzimes bontás, összevonható és egy reakcióterben lejátszatható. 0,1 g tisztított cellulózt 0,5 g [Bmim]Cl ionos folyadékban előkezelttem 10 percen keresztül 100 °C-on. Az előkezelés végén 3,5 g puffert és 15-15 µl Cellic® CTec2 és Cellic® HTec2 enzimmészítményt adtam a reakcióelegyhez, így 58,1 % és 29,8 %-os glükóz hozamot értem el.

Munkámat kukorica szárából és leveléből készült őrlménnyel folytattam. Vizsgálataimba az 1-n-butil-3-metil-imidazolium-klorid ([Bmim]Cl) és acetát ([Bmim]Ac) ionos folyadékot vontam be, amitől azt vártam, hogy az enzimek aktivitását kevésbé csökkenti. Mindkét ionos folyadékkal sikerült előkezelnem a mintát, valamint megvalósítani az egy edényes előkezelést és enzimes hidrolízist. 0,5 g ionos folyadékban a mintát 5 %-ban oldva, a legjobb hozamot (32,3 %) a [Bmim]Cl és Cellic® HTec2 enzimmészítmény kombinációja esetén kaptam, míg 20 %-ban oldva a mintát az ionos folyadékban a legjobb eredményt (9,9 %) a [Bmim]Ac és Cellic® CTec2 enzimmészítménnyel értem el.

Az ionos folyadékon kívül a szalmát is bevontam a vizsgálódásaimba. 0,5 g ionos folyadékban a mintát 5 %-ban oldva, a legjobb hozamot (45,3 %) a [Bmim]Cl és Cellic® HTec2 enzimmészítmény kombinációja esetén értem el, míg 20 %-ban oldva a mintát az ionos folyadékban a legjobb eredményt (11,3 %) a [Bmim]Ac és Cellic® HTec2 enzimmészítménnyel mértem. A két alapanyagot összehasonlítva azt tapasztaltam, hogy kis koncentrációban előkezelve őket szalmából nagyobb hozammal nyerhető ki a redukáló cukor. Nagyobb koncentrációban előkezelve őket már nem ilyen egyértelmű a kép. Kukoricánál ugyanis a [Bmim]Cl ionos folyadékos előkezelés bizonyult hatékonyabbnak, míg szalmánál ugyanebben a koncentrációban a [Bmim]Ac volt hatékonyabb.

Miután sikerült a cukrot egy megújuló forrásból kinyernem, munkámat annak egyik lehetséges tovább hasznosításának vizsgálatával folytattam. Figyelmemet a felületaktív anyagokra fordítottam, mivel ezeket számos iparágban használják és egy részüket petrokémiai alapon állítják elő környezetszennyező módon. Enzimes észterezéssel történő előállításuk környezetbarát, ezért jó alternatívát nyújthat. Glükózt és palmitinsavat használtam modellanyagént. Méréseim során igazoltam, hogy [Bmim]PF₆-ban szignifikáns észter mennyiség érhető el. 70 °C-on, 48 óra után, 0,5 mmol/g glükóz, 0,15 mmol/g palmitinsav, 0,1% víz és 0,5 g CALB kiindulási reakcióeleggyel 71%-os konverziót értem el. A szubsztrátok oldhatósága elég magas volt a reakció hatékony lejárásához és az ionos folyadékot sikerült újrahasznosítani. Az enzimek alkalmazása jó alternatívája a kémiai szintézisnek, mert nem igényelnek magas hőmérsékletet vagy nyomást (Soetaert, 2010).

Mivel ionos folyadékok szinte korlátlan variációban állíthatók elő, fontos mindegyik esetében megvizsgálni a környezetre kifejtett hatásukat. Áruk és újra használhatóságuk miatt valószínűleg csak véletlenül fognak kijutni a környezetbe, de hogy felelősségteljesen tudjuk használni őket fontos vizsgálni a toxicitásukat és biológiai bonthatóságukat. Ezt a két jelenséget biológiai oxigén igény mérés segítségével vizsgáltam. Zárt edényben mértem az oxigén fogyást úgy hogy Polyseed liofilizált beoltókultúrához, az általam legnagyobb mértékben használt két ionos folyadékot ([Bmim]Cl, [Bmim]Ac) és plusz szénforrást adtam. Méréseim során azt állapítottam meg, hogy az általam használt ionos folyadékok 100 mg/l-es koncentrációban nem toxikusak a beoltókultúrára, valamint hogy az általam használt ionos folyadékok kation csoportjai aerob környezetben biológiai úton nem bomlanak le. Habár az irodalomban olyan adatokat találtam melyek szerint az ionos folyadékok μ M-os koncentrációban is veszélyesek (Montalbán, 2016; Ghanem, 2015; Pernak, 2003) ezek mind monokultúras vizsgálatok voltak. Mivel a környezetbe kijutva az ionos folyadék baktérium kultúrával találkozhat ezért célszerűbbnek találtam egy ilyen vizsgálat lefolytatását. Az eredményeim egybeesnek az újabb irodalmi adatokkal (Diaz, 2018).

Munkám zárásaképpen a [Bmim]Cl ionos folyadék hatását vizsgáltam Celic Htec2 celluláz enzimre, cellulóz hidrolízise közben. Sikerült megállapítanom, hogy [Bmim]Cl nélküli rendszerben az enzimatis reakció jól leírható a Michaelis-Menten kinetikával. Azonban, az ionos folyadék még kis koncentrációban is gátolta a folyamatot kompetitív inhibíció keresztül, amit a kinetikai értékelés is alátámasztott. Továbbá kiderült, hogy az enzim találkozása koncentrált ionos folyadékkal, mégha ez rövid ideig is tart, irreverzibilis inhibíciót eredményezhet, melyet a technológia tervezésnél figyelembe kell venni.

7. Tézisek

1. Bebizonyítottam, hogy az irodalmi adatokkal ellentétben (Salvador, 2010; Kamiya, 2008; Turner, 2003) a tisztított cellulóz ionos folyadékos előkezelése, majd enzimes hidrolízise egy reakciótérben lejátszatható, és Cellic® CTec2 enzimekészítménnyel közel 35%-os konverzió érhető el két órás hidrolízissel, mikor a tisztított cellulózt 4,76 %-os koncentrációban oldottam fel [Bmim]Cl-ban. Így a cellulózból történő redukáló cukor előállítási folyamatából egy műveleti lépés (az előkezelt cellulóz tisztítása az ionos folyadéktól) kihagyható (SP 1).
2. Lignocellulóz tartalmú biomassza (kukorica szárából és leveléből készült őrlemény, valamint szalma őrlemény) esetében igazoltam, hogy ionos folyadékos előkezelése, majd enzimes hidrolízise egy reakciótérben lejátszatható, és nem szükséges az előkezelt biomasszát megtisztítani az ionos folyadéktól. Kukorica szárából és leveléből készült őrlemény esetében 0,5 g [Bmim]Cl ionos folyadékban 100 mg-ot oldva (16,67 %) és két órás Cellic® HTec2 enzimekészítménnyel végzett hidrolízis után 13,82 mg redukáló cukor mennyiséget mértem, ami azt jelenti, hogy a kiindulási anyagmennyiség 13,8 %-át sikerült cukor formájában kinyernem. Szalma őrlemény esetében 125 mg-ot oldva 0,5 g [Bmim]Cl ionos folyadékban (20 %) és két órás Cellic® CTec2 enzimekészítménnyel végzett hidrolízis után 8,89 mg redukáló cukor mennyiséget mértem, ami azt jelenti, hogy a kiindulási anyagmennyiség 7,1 %-át sikerült cukor formájában kinyernem (SP 1).
3. Igazoltam, hogy ionos folyadékban a cukor-zsírsav észterezés jó hatásfokkal lejátszatható, ha 0,5 g [Bmim]PF₆ ionos folyadékban 0,5 mmol glükózt és 0,15 mmol palmitinsavat oldottam fel. A reakcióelegyhez 0,1% vizet adva és 0,5 g CALB enzimet használva 70 °C-on, 48 óra után 71%-os konverziót értem el (SP 2).
4. Biológiai oxigénigény méréssel kimutattam, hogy az általam a cellulóz előkezelésére használt ionos folyadékok ([Bmim]Cl, [Bmim]Ac) 100 mg/l-es koncentrációban nem toxikusak az aerob lebontó mikroorganizmusokra, valamint ez a baktérium kultúra nem bontja le az ionos folyadékok kationját (SP3).

5. Igazoltam, hogy [Bmim]Cl nélküli rendszerben Cellic® HTec2 celluláz enzim enzimatis reakciója jól leírható a Michaelis-Menten kinetikával. Az ionos folyadék a kinetikai értékelés szerint még kis koncentrációban is kompetitív inhibíció keresztül gátolta a folyamatot. Amennyiben a cellulóz előkezelést és enzimes hidrolízist ugyanabban a reakcióterben akarjuk végrehajtani, figyelni kell a kellő mértékű puffer hozzáadásra, hígításra (SP 3).

Irodalomjegyzék:

- Abels C., Thimm K., Wulforth H., Spiess A.C., Wessling M.** (2013) Membrane-based recovery of glucose from enzymatic hydrolysis of ionic liquid pretreated cellulose, *Bioresource Technology* **149**:58-64
- Arcens D., Grau E., Grelier S., Cramail H., Peruch F.** (2018) 6-O-glucose palmitate synthesis with lipase: Investigation of some key parameters, *Molecular Catalysis* **460**: 63-68
- Aimaretti N.R., Ybalo C.V., Rojas M.L., Pluo F.j., Yori J.C.** (2012) Production of bioethanol from carrot discards, *Bioresource Technology* **123**: 727-732
- Auxenfans T., Buchoux S., Djellab K., Avondo C., Husson E., Sarazin C.** (2012) Mild pretreatment and enzymatic saccharification of cellulose with recycled ionic liquids towards one-batch process, *Carbohydrate Polymers* **90**: 805-813
- Bahcegul E., Apaydin S., Haykir N. I., Tatli E., Bakir U.** (2012) Different ionic liquids favor different lignocellulosic biomass particle sizes during pretreatment to function efficiently, *Green Chemistry* **14**: 1896-1903
- Bansal P., Hall M., Realff M.J., Lee J.H., Bommarius A.S.** (2009) Modeling cellulose kinetics on lignocellulosic substrates, *Biotechnology Advances* **27**:833-848
- Bajpai P.** (2012) *Biotechnology for Pulp and Paper Processing Springer* pp:43 ISBN 978-1-4614-1408-7
- Barótfi I.** (2000) Környezettechnika *Mezőgazda Kiadó* 289-293 ISBN:9632860098
- Barr C.J., Mertens J.A., Schall C.A.** (2012) Critical cellulose and hemicellulase activities for hydrolysis of ionic liquid pretreated biomass, *Bioresource Technology* **104**:480-485
- Bezerra R.M.F., Dias A.A.** (2004) Discrimination among eight modified Michaelis-Menten kinetics models of cellulose hydrolysis with a large range of substrate/enzym ratios, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **112**:173-184
- Bezerra R.M.F., Dias A.A.** (2005) Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **126**:49-59
- Bhaumik P., Dhepe P.L.** (2015) Conversion of biomass into sugars *Royal Society of Chemistry* 1-53
- Bommarius, A. S., Riebel, B. R.** (2004) *Biocatalysis, Wiley VCH Verlag GmbH &Co. KGaA, Weinheim*
- Brandt A., Gräsvik J., Hallett J.P., Welton T.** (2013) Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids, *Green Chemistry* **15**:550-583

- Carrillo F., Lis M.J., Colom X., López-Mesas M., Valdeperas J.** (2005) Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: kinetic study, *Process Biochemistry* **40**:3360-3364
- Carpita N.C., Gibeaut D.M.** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth *The Plant Journal* **3**:1-30
- Cauglia F., Canepa P.** (2008) The enzymatic synthesis of glucosylmyristate as a reaction model for general considerations on 'sugar esters' production *Bioresource technology* **99**:4065-4072
- Chandra R., Bura R., Mabee W., Berlin A., Pan X., Saddler J.,** (2007) Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **108**: 67-93
- Chang V.S., Holtzapple M.T.** (2000) Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity *Applied Biochemistry and Biotechnology* **84**:5-37
- Chen H., Liu J., Chang X., Chen D., Xue Y., Liu P., Lin H., Han S.** (2017) A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals, *Fuel Processing Technology* **160**: 196-206
- Claus J., Sommer F.O., Kragl U.** (2018) Ionic liquids in biotechnology and beyond, *Solid State Ionics* **314**:119-128
- Costa S.P.F., Pinto P.C.A.G., Saraiva M.L.M.F.S., Rocha F.R.P., Santos J.R.P., Monteiro R.T.R.** (2015) The aquatic impact of ionic liquids on freshwater organisms, *Chemosphere* **139**:288-294
- Czerwicka M., Stolte S., Müller A., Siedlecka E.M., Gołębiowski M.** (2009) Identification of ionic liquid breakdown products in an advanced oxidation system, *Journal of Hazardous Materials* **171**:478-483
- Dadi A.P., Varanasi S., Schall C.A.** (2006) Enhancement of Cellulose Saccharification Kinetics Using an Ionic Liquid Pretreatment Step, *Biotechnology and Bioengineering* **95**:904-910
- Degn P., Pedersen L. H., Duus J. O., Zimmermann W.** (1999) Lipase-catalysed synthesis of glucose fatty acid esters in *tert*-butanol, *Biotechnology Letters* **21**:275-280
- Diaz E., Monsalvo V.M., Lopez J., Mena I.F., Palomar J., Rodriguez J.J., Mohedano A.F.** (2018) Assessment the ecotoxicity and inhibition of imidazolium ionic liquids by respiration inhibition assays, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **162**:29-34

- Docherty K.M., Dixon J.K., Kulpa C.F. Jr** (2007) Biodegradability of imidazolium and pyridinium ionic liquids by an activated sludge microbial community *Biodegradation* **18**:481-493
- Elgharbawy A.A., Alam M.Z., Moniruzzaman M., Goto M.** (2016) Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Biochemical Engineering Journal* **109**:252-267
- Elgharbawy A.A., Riyadi F.A., Alam Md.Z., Moniruzzaman M.** (2018) Ionic liquids as a potential solvent for lipase-catalysed reactions: A review, *Journal of Molecular Liquids* **251**: 150-166
- Engel P., Mladenov R., Wulflhorst H., Jager G., Spiess A.C.** (2010) Point by point analysis: how ionic liquid affects the enzymatic hydrolysis of native and modified cellulose, *Green Chemistry* **12**:1959-1966
- Fehér, E. Major, B., Bélafi-Bakó, K., Gubicza, L.** (2007) On the background of enhanced stability and reusability of enzymes in ionic liquids, *Biochemical Society Transactions*, **35**:1624-1627
- Fehér E.** (2008) Oldószerternökség alkalmazása izoamil-acetát enzimátikus előállítására (Doktori Értekezés, Pannon Egyetem)
- Fernández F.J.H., Bayo J. Pérez de los Ríos A., Vicente M.A., Bernal F.J., Medina J.Q.** (2015) Discovering less toxic ionic liquids by using the Microtox® toxicity test, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **116**:29-33
- Ferrer M., Soliveri J., Plou F.J., Cortés N.L., Duarte D.R., Christensen M., Patiño J.L.C., Ballesteros A.** (2005) Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties *Enzyme and Microbial Technology* **36**:391-398
- Fischer F., Happe M., Emery J., Fornage A., Schütz R.** (2013) Enzymatic synthesis of 6- and 6'-O-linoleyl- α -D-maltose: From solvent-free to binary ionic liquid reaction media, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **90**:98-106
- Ganske F., Bornscheuer U.T.** (2006) Growth of *Escherichia coli*, *Pichiapastoris* and *Bacillus cereus* in the presence of the ionic liquids [BMIM][BF₄] and [BMIM][PF₆] and organic solvents *Biotechnology Letters* **28**:465-469
- Garcia M.T., Gathergood N., Scammells P.J.** (2005) Biodegradable ionic liquids Part II. Effect of the anion and toxicology, *Green Chemistry* **7**:9-14
- Gathergood N., Garcia M.T., Scammells P.J.** (2004) Biodegradable ionic liquids Part I: Concept, preliminary targets and evaluation, *Green Chemistry* **6**:166-175

- Ghanem O.B., Mutalib M.I.A., El-Harbawi M., Gonfa G., Kait C.F., Alitheen N.B.M., Leveque J.M.** (2015) Effect of imidazolium-based ionic liquids on bacterial growth inhibition investigated via experimental and QSAR modelling structures, *Journal of Hazardous Materials* **297**:198-206
- Gorman-Lewis D.J., Fein J.B.** (2004) Experimental study of the adsorption of an ionic liquid onto bacteria and mineral surfaces *Environmental Science and Technology* **38**:2491-2495
- Grzonkowska A., Sosnowska A., Barycki M., Rybinska A., Puzyn T.** (2016) How the structure of ionic liquid affects its toxicity to *Vibrio fischeri*?, *Chemosphere* **159**:199-207
- Gumel A.M., Annuar M.S.M., Heidelberg T., Chisti Y.** (2011) Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters *Process Biochemistry* **46**:2079-2090
- Gunny A.A.N., Arbain D., Gumba R.E., Jong B.C., Jamal P.** (2014) Potential halophilic cellulases for in situ enzymatic saccharification of ionic liquids pretreated lignocelluloses, *Bioresource Technology* **155**:177-181
- Gupta A., Verma J.P.** (2015) Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **41**:550-567
- Gupta R., Gupta N., Rathi P.** (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**:763–781
- Guragain Y.N., De Coninck J., Husson F., Durand A., Rakshit S.K.** (2011) Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth, *Bioresource Technology* **102**:4416-4424
- Habulin M., Šabeder S., Knez Ž.** (2008) Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity *Journal of Supercritical Fluids* **45**:338-345
- Halász J., Hannus I., Kiricsi I.** (2007) Környezetvédelmi Technológia Szegedi Egyetemi Kiadó 347
- Harjani J.R., Farrell J., Garcia M.T., Singer R.D., Scammells P.J.** (2009) Further investigation of the biodegradability of imidazolium ionic liquids, *Green Chemistry* **11**:821-829
- Hayes D.J.** (2009) An examination of biorefining processes, catalysts and challenges, *Catalysis Today* **145**(1-2): 138-151
- Huddleston J.G., Visser A.E., Reichert W.M., Willauer H.D., Broker G.A., Rogers R.D.** (2001) Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation, *Green Chemistry* **3**:156-164

- Huisman M.M.H., Schol H.A., Voragen A.G.J.** (2000) Glucuronoarabinoxylans from maize kernel cell walls are more complex than those from sorghum kernel cell walls, *Carbohydrate Polymers* **43**: 269-279
- Humeau C., Girardin M., Rovel B., Miclo A.** (1998) Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate *Journal of Biotechnology* **63**:1-8
- Iguchi M., Aida T.M., Watanabe M., Smith R.L.,** (2013) Dissolution and recovery of cellulose from 1-butyl-3-methylimidazolium chloride in presence of water, *Carbohydrate Polymers* **92**:651-658
- Jastorff B., Störmann R., Ranke J., Mölter K., Stock F., Oberheitmann B., Hoffmann W., Hoffmann J., Nüchter M., Ondruschka B., Filser J.** (2003) How hazardous are ionic liquids? Structure-activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation *Green Chemistry* **5**:136-142
- Jegannathan K.R., Nielsen P.H.** (2013) Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review *Journal of Cleaner Production* **42**:228-240
- Johnson K.A., Goody R.S.** (2011) The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper, *Biochemistry* **50**:8264-8269
- Jordan A., Gathergood N.** (2015) Biodegradation of ionic liquids – a critical review, *Chemical Society Reviews* **44**:8200-8237
- Jönsson L.J., Martín C.,** (2016) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects, *Bioresource Technology* **199**:103-112
- Kalyani D., Lee K.M., Kim T.S., Li J., Dhiman S.S., Kang Y.C., Lee J.K.** (2013) Microbial consortia for saccharification of woody biomass and ethanol fermentation *Fuel* **107**:815-822
- Kamiya N., Matsushita Y., Hanaki M., Nakashima K., Narita M., Goto M., Takahashi H.** (2008) Enzymatic in situ saccharification of cellulose in aqueous-ionic liquid media *Biotechnology Letters* **30**:1037-1040
- Katsoura M.H., Polydera A.C., Tsironis L.D., Petraki M.P., Rajačić S.K., Tselepis A.D., Stamatis H.** (2009) Efficient enzymatic preparation of hydroxycinnamates in ionic liquids enhances their antioxidant effect on lipoproteins oxidative modification, *New Biotechnology* **26**:83-91
- Kemény S., Deák A.** (2002) Kísérletek tervezése és értékelése, *Műszaki könyvkiadó*
- Kramer M, Cruz JC, Pfromm PH, Rezac ME, Czermak P.** (2010) Enantioselective transesterification by *Candida antarctica* lipase B immobilized on fumed silica. *Journal of Biotechnology* **150**:80–86

- Kumar R., Singh S., Singh Om V.** (2008a) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **35**: 377-391
- Kumar R.A., Papaiconomou N., Lee J.M., Salminen J., Clark D.S., Prausnitz J.M.** (2008b) *In Vitro* Cytotoxicities of Ionic Liquids: Effect of Cation Rings, Functional Groups, and Anions *Environmental Toxicology* **24**:388-395
- Kuroda K., Miyamura K., Satria H., Takada K., Ninomiya K., Takahashi K.** (2016) Hydrolysis of cellulose using an acid and hydrophobic ionic liquid and subsequent separation of glucose aqueous solution from the ionic liquid and 5-(Hydroxymethyl)furfural, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **4**:3352-3356
- Lee SH, Dang DT, Ha SH, Chang W-J, Koo Y-M.** (2008b) Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid sugar ester using extremely supersaturated sugar solution in ionic liquids *Biotechnology and Bioengineering* **99**:1–8
- Lee S.H., Ha S.H., Hiep N.M., Chang W.J., Koo Y.M.** (2008a) Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid ester using ionic liquids mixtures *Journal of Biotechnology* **133**:486-489
- Lencki R.W., Arul J., Neufeld R.J.,** (1992) Effect of subunit dissociation, denaturation, aggregation, coagulation, and decomposition on enzyme inactivation kinetics: 1. First-order behavior, *Biotechnology and Bioengineering* **40**:1421-1426
- Li C., Cheng G., Balan V., Kent M.S., Ong M., Chundawat S.P.S., Sousa L.C., 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**:6928-6936
- Li C., Tanjore D., He W., Wong J., Gardner J.L., Sale K.L.** (2013) Scale-up and evaluation of high solid ionic liquid pretreatment and enzymatic hydrolysis of switchgrass, *Biotechnology for Biofuels* **26**:154
- Li L., Ji F., Wang j., Li Y., Bao Y.** (2015) Esterification degree of fructose laurate exerted by *Candida antarctica* lipase B in organic solvents, *Enzyme and Microbial Technology* **69**:46-53
- Liang J., Zeng W., Yao P., Wei Y.** (2012) Lipase-catalyzed regioselective synthesis of palmitoylglucose ester in ionic liquids *Advances in Biological Chemistry* **2**:226-232
- Lineweaver H., Burk D.** (1934) The determination of enzyme dissociation constants, *Journal of the American Chemical Society* **56**:658-666
- Liu H., Zhang X., Chen C., Du S., Dong Y.** (2015) Effect of imidazolium chloride ionic liquids and their toxicity to *Scenedesmus obliquus*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **122**:83-90

- Lozano P., Bernal B., Jara A.G., Belleville M-P.** (2014) Enzymatic membrane reactor for full saccharification of ionic liquid-pretreated microcrystalline cellulose, *Bioresource Technology* **151**:159-165
- Lozano P., Bernal B., Bernal J.M., Pucheault M., Vaultier M.** (2011) Stabilizing immobilized cellulase by ionic liquids for saccharification of cellulose solutions in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride, *Green Chemistry* **13**: 1406-1410
- Łuczak J., Hupka J., Thöming J., Jungnickel** (2008) Self-organization of imidazolium ionic liquids in aqueous solution, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **329**: 125-133
- Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S.** (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**:506-577
- MacFarlane D.R., Tachikawa N., Forsyth M., Pringle J.M., Howlett P.C., Elliott G.D., Davis Jr J.H., Watanabe M., Simon P., Angel C.A.** (2014) Energy application of ionic liquids, *Energy and Environmental Science* **7**:232-250
- Marangoni A.G.,** (2003) Enzyme Kinetics: A Modern Approach, *John Wiley & Sons* New Jersey, USA
- Martin C., Jönson L.J.** (2003) Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors, *Enzyme Microbial Technology* **32**: 385-395
- Martínez Á. T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M. J., Gutiérrez A., del Río José C.** (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin, *International Microbiology* **8**: 195-204
- Megaw J., Thompson T.P., Lafferty R.A., Gilmore B.F.** (2015) *Galleria mellonella* as a novel *in vivo* model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids, *Chemosphere* **139**:197-201
- Meier R., Drepper T., Svensson V., Jaeger K.E., Baumann U.** (2007) A Calcium-gated Lid and a Large β -Roll Sandwich Are Revealed by the Crystal Structure of Extracellular Lipase from *Serratia marcescens* *The Journal of Biological Chemistry* **43**:31477-31483
- Menon V., Rao M.** (2012) Trend sin bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, *Progress in Energy and Combustion Science* **38**: 522-550

- Montalbán M.G., Hidalgo J.M., Collado-González M., Baños F.G.D., Villora G.** (2016) Assessing chemical toxicity of ionic liquids on *Vibrio fischeri*: Correlation with structure and composition, *Chemosphere* **155**:405-414
- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M.** (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass *Bioresource Technology* **96**:673-686
- Nordwald E.M., Brunecky R., Himmel M.E., Beckham G.T., Kaar J.L.** (2014) Charge engineering of cellulases improves ionic liquid tolerance and reduces lignin inhibition, *Biotechnology and Bioengineering* **111**:1541-1549
- OECD Guideline for Testing of Chemicals** (1992)
- Orozco A., Ahmad M., Rooney D., Walker G.,** (2007) Dilute acid hydrolysis of cellulose and cellulosic bio-waste using a microwave reactor system, *Process Safety and Environmental Protection* **85**(5): 446-449
- Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T.** (1999) Review: the realm of microbial lipases in biotechnology *Biotechnology and Applied Biochemistry* **29**: 119-131
- Papamichael E.M., Stergiou P.Y., Foukis A., Kokkinou M., Theodorou L.G.,** (2012) Effective kinetic methods and tools in investigating the mechanism of action of specific hydrolases *Medicinal chemistry and drug design* **12**:235-74
- Passos H., Freire M.G., Coutinho J.A.P.** (2014) Ionic liquid solutions as extractive solvents for value-added compounds from biomass, *Green Chemistry* **16**:4786-4815
- Payal R.S., Bejagam K.K., Mondal A., Balasubramanian S.** (2015) Dissolution of Cellulose in Room Temperature Ionic Liquids: Anion Dependence, *The Journal of Physical Chemistry* **119**:1654-1659
- Pengilly C., García-Aparicio M.P., Diedericks D., Brienzo M., Görgens J.F.** (2015) Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by combinations of cellulase and endo-xylanase *Fuel* **154**: 352-360
- Pernak J., Sobaszekiewicz K., Mirska I.** (2003) Anti-microbial activities of ionic liquids *Green Chemistry* **5**:52-56
- Pham T.P.T., Cho C.W., Yun Y.S.** (2010) Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review, *Water Research* **44**:352-372
- Pollegioni L., Tonin F., Rosini E.** (2015) Lignin-degrading enzymes *Federation of European Biochemical Societies Journals* **282**: 1190-1213

- Raddadi N., Cherif A., Daffonchio D., Fava F.** (2013) Halo-alkalitolerant and thermostable cellulases with improved tolerance to ionic liquids and organic solvents from *Paenibacillus tarimensis* isolated from the Chott El Fejej, Sahara desert, Tunisia, *Bioresource Technology* **150**:121-128
- Ranke J., Mölter K., Stock F., Bottin-Weber U., Poczobutt J., Hoffmann J., Ondruschka B., Filser J., Jastorff B.** (2004) Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays *Ecotoxicology and Environmental Safety* **58**:396-404
- Reina L., Botto E., Mantero C., Moyna P., Menéndez P.** (2016) Production of second generation ethanol using *Eucalyptus dunnii* bark residues and ionic liquid pretreatment *Biomass and Bioenergy* **93**:116-121
- Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E., Miller R.** (2009) Lipases at interfaces: a review *Advances in Colloid and Interface Science* **147-148**:237-250
- Romero A., Santos A., Tojo J., Rodríguez A.** (2008) Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids *Journal of Hazardous Materials* **151**:268-273
- Ren K., Lamsal B.P.** (2017) Synthesis of some glucose-fatty acid esters by lipase from *Candida antarctica* and their emulsion functions, *Food Chemistry* **214**:556-563
- Salam M.A., Abdullah B., Ramli A., Mujtaba I.M.** (2016) Structural feature based computational approach of toxicity prediction of ionic liquids: Cationic and anionic effects on ionic liquids toxicity, *Journal of Molecular Liquids* **224**:393-400
- Salvador Â.C., Santos M.DA C., Saraiva J.A.** (2010) Effect of the ionic liquid [bmim]Cl and high pressure on the activity of cellulase, *Green Chemistry*, **12**:632-635
- Sathitsuksanoh N., Zhu Z., Zhang P. Y.-H.** (2012) Cellulose solvent-based pretreatment for corn stover and avicel: concentrated phosphoric acid versus ionic liquid [BMIM]Cl, *Cellulose* **19**:1161-1172
- Saher S., Saleem H., Asim A.M., Uroos M., Muhammad N.** (2018) Pyridinium based ionic liquid: A pretreatment solvent and reaction medium for catalytic conversion of cellulose to total reducing sugars (TRS), *Journal of Molecular Liquids* **272**:330-336
- de Silva J.A.C., Soares V.F., Lafuente R.F., Habert A.C., Freire D.M.G.** (2015) Enzymatic production and characterization of potential biolubricants from castor bean biodiesel *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **122**:323-329
- Samayam I.P., Schall C.A.** (2010) Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixtures, *Bioresource Technology* **101**:3561-3566

- Shi J., Gladden J.M, Sathitsuksanoh N., Kambam P., Sandoval L., Mitra D.** (2013) One-pot ionic liquid pretreatment and saccharification of switchgrass, *Green Chemistry* **15**:2579-2589
- Sindhu R., Binod P., Pandey A.** (2016) Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview *Bioresource Technology* **199**:76-82
- Singh S., Varanasi P., Singh P., Adams P.D., Auer M., Simmons B.A.** (2013) Understanding the impact of ionic liquid pretreatment on cellulose and lignin via thermochemical analysis *Biomass and Bioenergy* **54**:276-283
- Soetaert W., Vandamme E.J.** (2010) The scope and impact of industrial biotechnology In: Soetaert W., Vandamme E.J. (Eds.), *Industrial Biotechnology* WILEY-VCH Verlag GmbH and Co, Weinheim, pp 10 ISBN 978-3-527-31442-3
- Stepnowski P., Mrozik W., Nichthauser J.** (2007) Adsorption of Alkylimidazolium and Alkylpyridinium Ionic Liquids onto Natural Soils *Environmental Science and Technology* **41**:511-516
- Stergiou P.A, Foukis A., Filippou M., Koukouritaki M., Parapouli M., Theodorou L.G., Hatziloukas E., Afendra A., Pandey A., Papamichael E.M.** (2013) Advances in lipase-catalyzed esterification reactions *Biotechnology Advances* **31**:1846-1859
- Stolte S., Abdulkarim S., Arning J., Blomeyer-Nienstedt A.K., Bottin-Weber U., Matzke M., Ranke J., Jastorff B., Thoeming J.** (2007) Primary biodegradation of ionic liquid cations, identification of degradation product of 1-methyl-3-octylimidazolium chloride and electrochemical wastewater treatment of poorly biodegradable compounds, *Green Chemistry* **10**:214-224
- Sun Y., Cheng J.** (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review *Bioresource Technology* **83**:1-11
- Swatloski R. P., Spear S. K., Holbrey J. D., and Rogers R. D.** (2002) Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids, *JACS Communications* **124**: 4974-4975
- Tan H.T., Lee K.T.** (2012) Understanding the impact of ionic liquid pretreatment on biomass and enzymatic hydrolysis *Chemical Engineering Journal* **183**:448-458
- Tsarpali V., Dailianis S.** (2015) Toxicity of two imidazolium ionic liquids, [bmim][BF₄] and [omim][BF₄], to standard aquatic test organisms: Role of acetone in the induced toxicity, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **117**: 62-71
- Turner M.B., Spear S K., Huddleston J.G., Holbrey J.D., Rogers R.D.** (2003) Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*, *Green Chemistry* **5**:443-447

- Van Van Eylen D., Van Dongen F., Kabel M., de Bont J.** (2011) Corn fiber, cobs and stover: Enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment, *Bioresource Technology* **102**: 5995-6004
- Vaysse L., Ly A., Moulin G., Dubreucq E.** (2002) Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium *Enzyme and Microbial Technology* **31**:648–655
- Wang Y., Radosevich M., Hayes D., Labbé N.** (2010) Compatible ionic liquid-cellulase system for hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Biotechnology and Bioengineering* **108**: 1042-1048
- Weerachanchai P., Lee J.-M.** (2017) Recovery of lignin and ionic liquid by using organic solvents, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **49**:122-132
- Yang Z, Huang Z-L.** (2012) Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in ionic liquids *Catalysis Science and Technology* **2**:1767–1775
- Yeh A.I., Huang Y.C., Chen S.H.** (2010) Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose, *Carbohydrate Polymers* **79**:192-199
- Yoo C.G., Pu Y., Ragauskas** (2017) Ionic liquids: Promising green solvents for lignocellulosic biomass utilization, *Green and Sustainable Chemistry* **5**:5-11
- Yu J., Zhang J., Zhao A., Ma X.** (2008) Study of glucose ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp., *Catalysis Communications* **9**:1369-1374
- Yuan T.Q., Xu F., Sun R.C.** (2013) Role of lignin in a biorefinery: separation characterization and valorization, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **88**:346-352
- Zaks A., Klibanov A.M.** (1988) The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media *The Journal of Biological Chemistry* **263**:8017-8021
- Zhang Y.H.P., Lynd L.R.** (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems, *Biotechnology and Bioengineering* **88**:797-824
- Zhang Y., Xu J.L., Xu H.J., Yuan Z.H., Guo Y.** (2010) Cellulase deactivation based kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw, *Bioresource Technology* **101**:8261-8266
- Zhao H., Jones C.L., Baker G.A., Xia S., Olubajo O., Person V.N.** (2009) Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis *Journal of Biotechnology* **139**:47-54

Zhao K.H., Cai Y.Z., Lin X.S., Xiong J., Halling P.J., Yang Z. (2016) Enzymatic Synthesis of Glucose-Based Fatty Acid Esters in Bisolvent Systems Containing Ionic Liquids or Deep Eutectic Solvents, *Molecules* **21**:1294

Zhu S., Wu Y., Chen Q., Yu Z., Wang C., Jin S. (2006) Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: A mini-review, *Green Chemistry* **8**(4): 325-327

Xiao W., Yin W., Xia S., Ma P. (2012) The study of factors affecting the enzymatic hydrolysis of cellulose after ionic liquid pretreatment, *Carbohydrate Polymers* **87**:2019-2023

Xu J., Wang X., Liu X., Xia J., Zhang T., Xiong P. (2016a) Enzymatic in situ saccharification of lignocellulosic biomass in ionic liquids using an ionic liquid-tolerant cellulases, *Biomass and Bioenergy* **93**:180-186

Xu J., Sheng Z., Wang X., Liu X., Xia J., Xiong P. (2016b) Enhancement in ionic liquid tolerance of cellulose immobilized on PEGylated graphene oxide nanosheets: application in saccharification of lignocellulose, *Bioresource Technology* **200**:1060-1064

Xu J., Wu B., Hu L., Wu Z., Xu N., Dai B., He J. (2015) Enzymatic in situ saccharification of lignocellulose in a compatible ionic liquid-cellulase system *Chemical Engineering Journal* **267**:163-169

Internet 1: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Cellul%C3%B3z>

Internet 2: http://aet.mkk.szie.hu/tanweb/Fogalomtar/index_fogalom.htm

Internet 3:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/1butyl3methylimidazoliumchloride174677991790111?lang=hu®ion=HU>

Internet 4: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/39952?lang=hu®ion=HU>

Saját publikációk:

SP 1: Gábor Megyeri, Nándor Nemestóthy, Milan Polakovic, Katalin Bélafi-Bakó, László Gubicza (2015) Application of Ionic Liquids in the Utilization of the Agricultural Wastes: Towards the One-step Pre-treatment and Cellulose Hydrolysis, *Hungarian Journal of Industry and Chemistry* **43**:85-89

SP 2: Zvezdana Findrik, Gábor Megyeri, László Gubicza, Katalin Bélafi-Bakó, Nándor Nemestóthy, Martina Sudar (2016) Lipase catalyzed synthesis of glucose palmitate in ionic liquid, *Journal of Cleaner Production* **112**:1106-1111 (IF: 5,7)

SP 3: Nándor Nemestóthy, Gábor Megyeri, Péter Bakonyi, Patrik Lakatos, László Koók, Milan Palokovic, László Gubicza, Katalin Bélafi-Bakó (2017) Enzym kinetics approach to assess biocatalyst inhibition and deactivation caused by [bmim][Cl] ionic liquid during cellulose hydrolysis, *Bioresource Technology* **229**:190-195 (IF: 5,8)

Saját posztterek:

Gábor Megyeri, Nándor Nemestóthy, Katalin Bélafi-Bakó, László Gubicza, Zvezdana Findrik, Evaluation of different ionic liquids anions for the release of reducing sugars from agricultural wastes, *X Meeting of Young Chemical Engineers, 2014.02.20-21., Zágráb Horvátország*

Gábor Megyeri, Nándor Nemestóthy, Katalin Bélafi-Bakó, Tamás Rózsenszki, László Gubicza, BIOTRANSFORMATION OF AGRICULTURAL WASTES WITH ENZYMES IN IONIC LIQUIDS SOLVENT, *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája 2014.03.07., Szeged*

Saját előadások:

Megyeri Gábor, Gubicza László, Nemestóthy Nándor (2013) 1-n-butyl-3-methylimidazolium-klorid alkalmazása a cellulóz előkezelésében, *PhD hallgatók anyagtudományi napja XIII., Veszprém, Pannon Egyetem*

Megyeri Gábor, Bélafiné Bakó Katalin, Gubicza László (2013) Ionos folyadékok a mezőgazdasági hulladékok hasznosításában, *VEAB Ipari Biotechnológiai Munkabizottsága, VEAB Székház, Veszprém, 2013. október 1*

Megyeri Gábor, Nemestóthy Nándor, Bélafiné Bakó Katalin, Csanádi Zsófia, Gubicza László (2013) Ionos folyadékok a mezőgazdasági hulladékok hasznosításában: úton az egylépéses előkezelés és cellulóz hidrolízis felé, *Pannon Egyetem Műszaki Kémiai Napok*

Megyeri Gábor, Bélafiné Bakó Katalin, Nemestóthy Nándor (2014) Ionos folyadékok a mezőgazdasági hulladékok hasznosításában: úton az egylépéses előkezelés és cellulóz hidrolízis felé II, *Pannon Egyetem Műszaki Kémiai Napok*

Köszönetnyilvánítás:

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek, hogy a munkám megvalósulhasson.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Gubicza László egyetemi tanárnak és Dr. Nemestóthy Nándor egyetemi docensnek, hogy vállalták a témavezetést és segítették a munkámat. Köszönöm, hogy tudásukat és tapasztalataikat megosztották velem és irányt mutattak a dolgozat elkészítésében.

Hálával tartozom Bélafiné Dr. Bakó Katalin intézetigazgató egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget biztosított számomra a kísérletek elvégzésére.

Köszönöm továbbá Lövitusz Évának és Márkus Béláné-nak a munka közbeni segítséget és hogy segítettek eligazodni a laborokban, valamint a Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet valamennyi munkatársának, akik segítették a munkámat.

Végül szeretném megköszönni a családomnak, hogy végig mellettem álltak és támogattak.