

Lignocellulóz bontó enzimek előállítására és felhasználására

Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Juhász Tamás

Témavezető: Dr. Réczey Istvánné

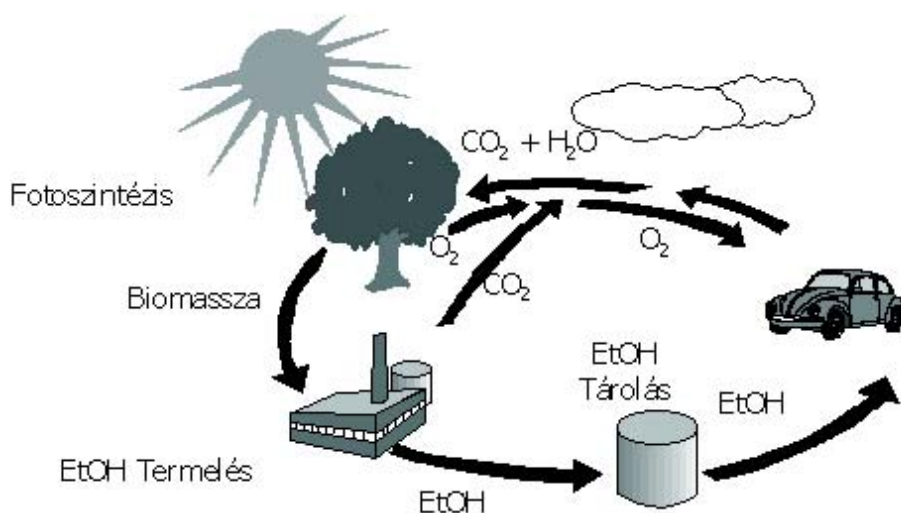


**Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem**

2005

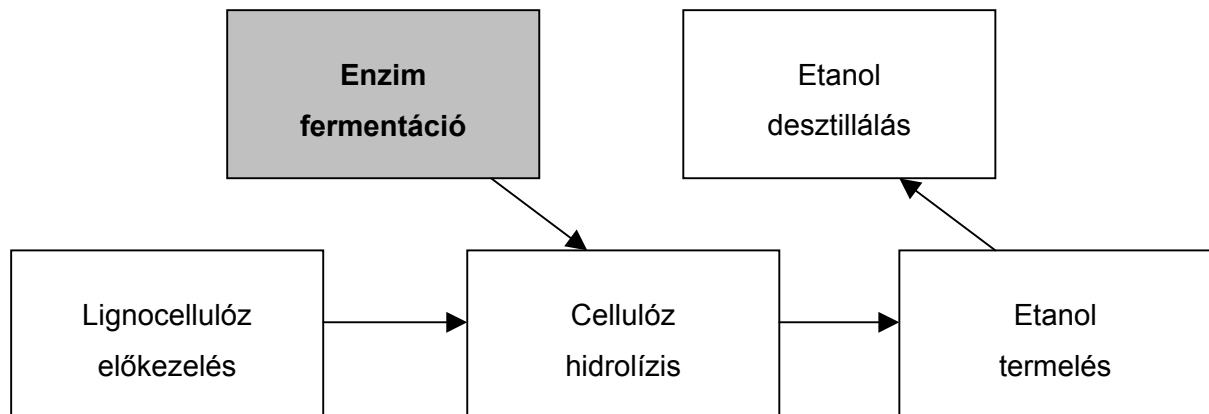
Bevezetés

Az utóbbi években a fokozódó üvegházhatás miatt a biomassza alapú alternatív üzemanyagok egyre nagyobb szerephez jutnak, melyek közül az egyik legjelentősebb az etanol. Ahogy az 1. ábrán is látható, a biomasszából előállított alkohol hatására nem növekszik a légkör szén-dioxid tartalma, mivel a kibocsátott szén-dioxid a növények fotoszintetizáló tevékenységének köszönhetően visszakerül a biomasszába. Az etanol alkalmazásának a környezeti előnyökön kívül több járulékos haszna is van. Például az etanol gyárak új munkahelyeket teremtenek és az országban megtermelt üzemanyag csökkenti az olaj importtól való függést.



1. ábra A zárt szén-dioxid ciklus

A lignocellulóz az etanol gyártás kitűnő alapanyaga lehet, mivel a lignocellulóz képezi a legnagyobb mennyiségű biomasszát a Földön. A lignocellulózok lebontása történhet celluláz enzimmel vagy savas hidrolízissel is (lásd 2. ábra). Az enzimes technológiának számos előnye van a savassal szemben, hátránya viszont, hogy drága celluláz enzim szükséges hozzá. Ezért olyan nyersanyagot érdemes választani az etanol fermentációra, amely jól hidrolizálható, továbbá a cellulóz magas hozammal történő lebontásához szükséges enzim is előállítható rajta.



2. ábra Etanol előállítás lignocellulózból

Amennyiben az enzim előállítása a felhasználás helyén, a hidrolízis szubsztrátján történik, az celluláz enzim felhasználását igénylő technológia egyszerűbbé és gazdaságosabbá tehető („on site” enzimtermelés). Cellulázt nem csak a biomassza lebontására, hanem számos egyéb technológia során is felhasználnak. Nagyobb mennyiségű enzimet alkalmaznak az élelmiszer-, sör-, papír- és textiliparban, továbbá a mezőgazdaságban és a kutatásban is.

A cellulóz hatékony lebontásához kiegyensúlyozott összetételű, magas hidrolízis potenciállal rendelkező cellulolítikus enzim komplex alkalmazása szükséges. A celluláz enzim komplex összetétele akkor a legkedvezőbb, ha a β -glükozidáz aktivitás/ FPA (Filter Paper Activity) aránya legalább 1,0-1,5 között van. Ezzel szemben a *Trichoderma reesei* RUT C30 cellulázánál, amely a kutatásban leginkább és általam is alkalmazott hipercellulolítikus fonalas gomba, ez az arány mindössze 0,5-0,6, így β -glükozidáz hozzáadása nélkül az enzim hidrolizáló képessége alacsony.

A munkám egyik célja egy olyan fermentációs módszer kifejlesztése volt, amellyel a *Trichoderma* fermentalevek β -glükozidáz aktivitása és a termelt enzim hidrolizáló képessége jelentősen növelhető. A β -glükozidáz enzim termelését egyik legjobban befolyásoló tényező a pH, ezért kísérleteim során egy olyan puffer rendszert kerestem, amely a rázatott lombikos fermentáció során közel állandó értéken tartja a pH-t illetve lehetőség szerint a β -glükozidáz aktivitását is növeli.

Doktori munkám másik célja olyan lignocellulóz szénforrások keresése volt, melyek felhasználhatók a hatékony enzimtermelésre illetve hidrolízisre, vagyis jól alkalmazhatók „on site” enzimtermelésre. A kifejlesztett fermentációs módszert kipróbáltam több gőzrobbantott lignocellulóz szénforráson (gőzrobbantott kukoricaszár, fenyő- és fűzfa) és a termelt enzimek hidrolizáló képességét hidrolízises kísérletekkel vizsgáltam.

Végül egy új β -glükozidáz fermentációs módszert vizsgáltam, melynek lényege, hogy *Trichoderma reesei* és *Aspergillus niger* együttes fermentációjával hulladék papír szénforráson β -glükozidáz enzim termelhető magas hozammal. A kofermentációval előállított enzim hozzá adagolható a *Trichoderma* fermentlevekhez, melynek következtében javul az enzim komplex hidrolizáló képessége.

Tézis pontok - új tudományos eredmények

1. A 0,1 M trisz-maleát puffer képes volt a *Trichoderma reesei* RUT C30 rázatott lombikos fermentációja során a pH-t közel állandó értéken tartani (pH 5,8-6,1; kezdeti pH: 6,0) Solka Floc, laktóz, glükóz; gőzrobbantott kukoricaszár, fenyő- és fűzfa szénforrás esetén.
2. A maleát tartalmú pufferek több mint 100%-al növelték a β -glükozidáz aktivitást Solka Floc, glükóz és laktóz szénforrásokon a nem pufferolt tenyészetekhez képest. A magasabb β -glükozidáz aktivitásnak köszönhetően a β -glükozidáz aktivitás/FPA arány elérte az enzim hidrolízis potenciálja szempontjából optimális 1,0-1,5 közötti értéket.
3. A gőzrobbantott kukoricaszár rendkívül jó szénforrásnak bizonyult. *Trichoderma reesei* RUT C30 rázatott lombikos fermentációja során gőzrobbantott kukoricaszár szénforráson 10-40%-al magasabb enzim aktivitásokat (FPA, endo- és exoglukanáz) értem el, mint a referenciának használt Solka Flocon. Habár a β -glükozidáz aktivitás mintegy 40%-al alacsonyabb volt előkezelt kukoricaszáron, mint a referencia szénorráson, amit valószínűleg az enzim ligninen történő adszorpciója okozott.
4. A gőzrobbantott kukoricaszár jó szubsztrátnak bizonyult az előkezelt szénforrásokon (gőzrobbantott kukoricaszár, fenyő- és fűzfa) termelt és két kereskedelmi enzimmel végrehajtott hidrolízis során. A gőzrobbantott kukorica száron termelt enzimmel („saját enzim”) a gőzrobbantott kukoricaszáron mint szubsztráton sikerült elérnem a legmagasabb glükóz hozamot.

Megállapítottam, hogy a legjobb hidrolízis eredmények bizonyos esetekben a „saját enzimmel” érhetőek el. Ezt támasztja alá egy másik kísérlet sorozat is, ahol kémiai előkezelésnek alávetett kukorica rost hidrolízise során a „saját enzimmel” szignifikánsan nagyobb cellulóz konverziót sikerül elérnem, mint kereskedelmi enzimmel. A megfigyelés az „on site” enzimtermelés egyik előnyét mutatja.

5. Megfigyeltem, hogy Solka Flocon, gőzrobbantott kukoricaszáron, fenyő- és fűzfán a mért endoglukanáz és mannanáz aktivitások között az acetil xilán észteráz aktivitásokhoz hasonlóan egyenes arányosság tapasztalható. Melynek alapján feltételeztem, hogy az enzimek koexpresszálódnak. Bár a kérdés eldöntésére további kísérletek szükségesek, a megfigyelés értékes lehet a mannanáz enzimmel kapcsolatos kutatások során, mivel erről az enzimről eddig nagyon kevés publikáció született.

6. Olcsó hulladék papír szénforráson *Trichoderma reesei* RUT C30 és *Aspergillus niger* BKMF 1305 együttes fermentációjával közel azonos β -glükózidáz aktivitást értem el mint az *Aspergillus* drágább glükóz szénforráson történő egyedi fermentációjával. A megtermelt enzim felhasználható a celluláz komplex β -glükózidáz aktivitásának növelésére.

Publikációs lista

Az értekezéshez az alábbi publikációkat használtam fel:

1. **Juhász, T.**, Szengyel, Zs., Szijártó, N., Réczey, K., The effect of pH on the cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30, *Appl. Biochem. Biotech.*, 2004, **113-116**, 201-211.
2. **Juhász, T.**, Egyházi, A., Réczey, K., β -Glucosidase production by *Trichoderma reesei*, *Appl. Biochem. Biotech.*, 2005, **121**, 243-254.
3. **Juhász, T.**, Szengyel, Zs., Réczey, K., Siika-aho, M., Viikari, L., Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources, *Proc. Biochem.*, 2005, *In press*.
4. Gáspár, M., **Juhász, T.**, Szengyel, Zs., Réczey, K., Fractionation and utilization of corn fiber carbohydrates, *Proc. Biochem.*, 2005, **40**, 1183-1188.
5. **Juhász, T.**, Kozma, K., Szengyel, Zs., Réczey, K., Production of beta-glucosidase by mixed culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30, *Food Technol. Biotechnol.*, 2003, **41**, 49-53.

Egyéb publikációk:

1. **Juhász, T.**, Székely, E., Simándi, B., Szengyel, Zs., Réczey, K., Recovery of a recombinant thermostable endoglucanase from *E. coli* using supercritical carbon dioxide cell disruption, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 2003, **17**, 131-134.
2. Palmarola-Adrados, B., **Juhász, T.**, Galbe, M., Zacchi, G., Hydrolysis of non-starch carbohydrates of wheat starch effluent for ethanol production, *Biotech. Prog.*, 2004, **20**, 474-479.

Előadások:

1. **Juhász T.**, Szijartó N., Szengyel Zs., Réczey K.: Szerves savak és a pH hatása *Trichoderma reesei* celluláz enzim termelésére, Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, 2003, (Előadás és magyar nyelvű cikk a proceedings-ben)
2. **Juhász T.**, Székely E., Szengyel Zs., Simándi B., Réczey K.: Thermostabil endoglükánáz enzim kinyerésének lehetősége szuperkritikus szén-dioxiddal történő sejtfeltárással, Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, 307. Tudományos Kollokvium, Budapest, 2002
3. **Juhász T.**, Szengyel Zs., Réczey K.: Cellulase and beta-glucosidase production with mixed fermentation, Power of Microbes in Industry and Environment Conference, Opatia, Horvátország, 2002
4. **Juhász T.**, Szengyel Zs., Réczey K.: Celluláz enzimek előállítása, Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, 2002
5. **Juhász T.**, Réczey K.: A bioetanol előállítása, környezetvédelmi szerepe, felhasználási és gazdasági lehetőségei, VII. Nemzetközi Környezetvédelmi Szakmai Diákkonferencia, Mezőtúr, 2001

Poszterek:

1. **Juhász T.**, Egyházi A., Réczey K.: Towards understanding the β -glucosidase production by *Trichoderma reesei*, 26th Symposium on Biotechnology For Fuels and Chemicals, Chattanooga, USA, 2004
2. Gáspár M., Benkő Zs., **Juhász T.**, Réczey K., Marosi Gy., Dogossy G., László E.: Reducing water absorption in compostable starch-based plastics I., 26th Symposium on Biotechnology For Fuels and Chemicals, Chattanooga, USA, 2004
3. **Juhász T.**, Réczey K.: Cellulase enzyme production by cofermentation of two *Trichoderma* strains, Narotech 2003 – Messe Erfurt, Erfurt, Németország, 2003

4. **Juhász T.**, Szijártó N., Szengyel Zs., Réczey K.: The effect of pH on the cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30, 25th Symposium on Biotechnology For Fuels and Chemicals, Breckenridge, USA, 2003
5. Adrados B. P., **Juhász T.**, Galbe M., Zacchi G.: Investigation of hemicellulose-containing starch factory by-products for ethanol production, 24th Symposium on Biotechnology For Fuels and Chemicals, Getlinburg, USA, 2002
6. Szijártó N., **Juhász T.**, Szengyel Zs., Réczey K.: Cellulase enzyme production on a novel fermentation substrate: old corrugated cardboard, 24th Symposium on Biotechnology For Fuels and Chemicals, Getlinburg, USA, 2002

