

OTKA 49849 NI
Szakmai Zárójelentés

**Fenntartható fejlődés és fogyasztás tiszta technológiákkal
valamint megújuló nyersanyagokkal és energiákkal**

1. résztema:

Membrános elválasztó műveletek kutatása környezetvédelmi céllal

2.résztema:

**Szilárd anyagok szuperkritikus fluid extrakciójának vizsgálata, és a
művelet anyagátadásának modellezése**

3. résztema:

**Cellulázok és kísérő enzimek hatásának kísérletes és matematikai
tanulmányozása**

Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék
(Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem)

2005, január 1. – 2008. június 30.

1. rész téma:

Membrános elválasztó műveletek kutatása környezetvédelmi céllal

A sokféle membránművelet közül a pervaporációt és a membránszűrést vizsgáltuk kísérleti és elméleti módszerekkel. Célunk az volt, hogy a kísérleti és elméleti kutatások alapján mérnöki szempontból hasznos modellezési algoritmusokat állapítsunk meg, illetve a műveletek alkalmazhatósági területeit, korlátait és lehetőségeit megállapítsuk.

Munkánk során együttműködtünk a másik két tématerületet kutató csoporttal.

1.1. Pervaporáció

A pervaporáció napjainkban már széles körben alkalmazott technológia speciális elválasztási feladatokra, pl. víztelenítés,

- biner és terner elegyek pervaporációja,
- oldószerek visszanyerése. regenerálása,
- szennyvíztisztítás során különleges vegyületek visszanyerése,
- szennyvízkezelés,
- stb.

A membrános elválasztó műveleteket a fenntartható fejlődés szolgálatába állítható újrahasznosító eljárásaként tanulmányoztuk.

A kutatás első lépéseként metodológiát dolgoztunk ki a már korábban leírt és továbbfejlesztett modell alapján¹. A metodológia lényege, hogy kísérleti adatok alapján megbízható, mérnöki számításokra alkalmas, professzionális szoftverkörnyezetben számoló eljárás és paramétereinek megállapítására adjunk módszert.

1.1.1. Metodológia pervaporáció modellezésére

A pervaporáció precíz modellezése professzionális folyamatszimulátor környezetben, nagy gyakorlati jelentőségű. A pervaporáció művelete, mint egy hibrid folyamat aktív része, megbízható szimulációt igényel. A pervaporáció folyamatszimulátor környezetbe való illesztésének feltétele egy megbízható leíró modell és az ahhoz tartozó adatbázis létrehozása. A pervaporáció modellezésére már számos modell készült, de a modellválasztásnál fontos az általánosíthatóság és az egyszerű alkalmazhatóság. Az általunk ajánlott modell az oldódás-diffúzió jelenség leírásán alapul, és alkalmazhatóságához meg kell határozni a modell paramétereit. Ez viszonylag egyszerű méréseket igényel. A modell alkalmazhatóságát egyszerűen kiterjeszthejük tetszőleges

¹ P. Mizsey, K. Koczka, A. Deák, Zs. Fonyó, A pervaporáció szimulációja az oldódás-diffúziós modell, Magyar Kémikusok Lapja, 7 (2005) 239-242.

komponensszámú elegyre. Ehhez ajánlunk módszertant jelen cikkünkben, illetve bemutatjuk a módszertani lépések gyakorlati kivitelezését.

A módszertan

A hibrid elválasztási eljárásokban a pervaporációval növelhető a rendszer teljesítménye, illetve környezetvédelmi szempontból előnyös és energiahatékony rendszerek építhetők ki [1.1,1.2]. Ilyen tervezések kezdeti lépéseihöz, a folyamatszimulációs szoftverek gyors, hatékony és a műveleti egységek szempontjából tetszőlegesen változtatható háttérrel adnak. Célunk tehát a pervaporáció folyamatszimulátorba történő illesztése. Ehhez szükséges a modell paramétereinek megállapítása, mely méréseken és azok kiértékelt adatain (fluxus, szelektivitás [1.3], permeance [1.4], PSI, termékösszetétel, stb.) alapul. Ezek a mérésekből és modellezésekből származó, a pervaporációt leíró megbízható jellemzőket a folyamatszimulátor környezetben kiegészítjük a szimulációs szoftver (Aspen Plus[©], ChemCAD[©] stb.) fizikai-kémiai adatbankjának információival. Az előbbieket együttesen szükségesek a rugalmasan alkalmazható szimulációs modul létrehozásához.

Az általunk kidolgozott módszertan lépései követik a rendszermodellezés elméletét:

- (1) az adott feladathoz megfelelő pervaporációs membrán kiválasztása;
- (2) egy adott egyszerű, jól karakterizálható (kétkomponensű) pervaporációs rendszer tulajdonságainak vizsgálata; izoterm mérések kivitelezése adott ipari membránon történő transzport; parciális fluxus és permeátum összetétel mérése;
- (3) a mérési eredmények modellezése; a kiválasztott oldódás-diffúziós szemi-empirikus modell paramétereinek meghatározása;
- (4) a modellparaméterek kettős érvényesítése a folyamatszimulátorba beépített pervaporációs modullal történő ellenőrzéssel.

A membrán kiválasztása

A pervaporációs feladathoz a tapasztalatok illetve a gyártó ajánlata alapján kiválasztjuk a megfelelő membránt. A továbbiakban a membrán és az elválasztandó elegy egy rendszert képeznek. A membrán ugyanúgy része a továbbiakban a pervaporációs rendszernek, mint bármelyik elegykomponens, hiszen fizikai-kémiai kölcsönhatás lép fel az elegy komponense(i) és a membrán anyaga közt. Amennyiben az elválasztási rendszer bármelyik elemét kicseréljük, akkor az már egy új, megváltozott rendszernek tekintendő, és el kell végezni az alábbiakban részletezett vizsgálatát.

Megbízható mérési adatok

Kísérleti tervet készítettünk, mely [1.5] alapján a végrehajtott mérésekből egyrészt az adott kompozit membrán permeabilitása, és elválasztóképessége megbízhatóan mérhető. Erre azért van szükség, mert a gyártó az anizotróp [1.6] pervaporációs membránt előzetesen teszteli, azonban csak egyetlen adott mérési rendszerben, amelyből számított adatok (áramsűrűség, visszatartás) az alkalmazási rendszerben már nem pontosak, így pervaporáció modellezéséhez nem használhatók fel (lsd. 1 pont).

A pervaporációs modul megköveteli a beállított paraméterek szerinti tartomány lefedését (hőmérséklet, permeát oldali nyomás, betáplálási koncentráció intervallum). A kísérlettervezés során ezen tartományok pontos kijelölése, melyeken belül a feltételezett modellt érvényesnek tekintjük, elsődleges szempont. A szimuláció szempontjából a víz-etanol rendszer érdekes területe az egyensúlyi görbe azeotrop összetétel körüli (-8 m/m% -+5m/m%) magasabb etanoltartalmú szakasza. Ezen intervallumban a desztilláció energia-, és költségigénye rohamosan megnő, illetve az azeotrop összetétel felett pedig csak hozzáadott (turner azeotropot képző) komponensekkel lehetséges az elválasztás, alkohol abszolútizálás.

Az általunk vizsgált víz-etanol-PERVAP2210 (Sulzer GmBH.) rendszer már alaposan ismert és vizsgált. Ez lehetőséget nyújt az általunk javasolt módszertan modell elemének összehasonlítására korábbi modellezési eredményekkel. Mivel a membránt a pervaporációs rendszer elemének tekintjük, az összehasonlításnak (pl. aktiválási energia) azt figyelembe kell vennie.

A kísérleteket izoterm körülmények között, egy P-28 CM Celfa multifunkciós kísérleti készülékben hajtottuk végre. Az alkalmazott pervaporációs membrán, Pervap2210, PVA aktív rétegű, azaz hidrofil, PAN porózus támasztórétegű, kompozit membrán. Aktív felülete a készülékben 28 cm². Minden méréshez min. 1 óra vizes-etanolos közegben duzzasztott membránt szereltünk a készülékbe. A kísérleti faktorok szintjeit az 1.1. táblázat tartalmazza.

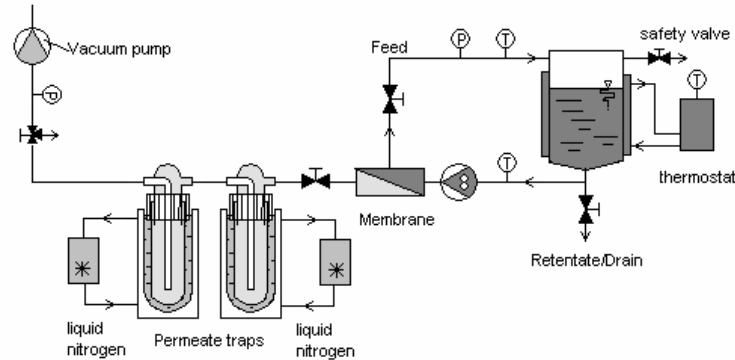
1.1. táblázat víz-etanol-PERVAP2210 rendszer kísérleti tervének faktorai és beállításai

Faktorok	hőmérséklet T [°C]	betáplálási koncentráció x_F [m/m% EtOH]
Faktorok értékei	40, 60, 80, 90	0,5–14

Állandó paraméterek:	
permeát oldali nyomás p_p [mbar]	2,63
betáplálás oldali nyomás p_f [bar]	3

A kísérleti terv tehát 2 faktort tartalmaz, a hőmérsékletet és a betáplálási koncentrációt is négy-négy szinten. A kísérletek végrehajtása során középponti méréseket is végeztünk.

A koncentráció polarizáció hatását elhanyagoljuk a modellben, mivel a Pe és Re számra vonatkozó áramlási számítások alapján a P-28-as készülékben (1. ábra) víz-etanol-PERVAP2210 rendszer esetén a koncentráció polarizáció modulus $c_i/c_{i0} \approx 1$ a kevésbé oldható komponensre (etanol) nézve.

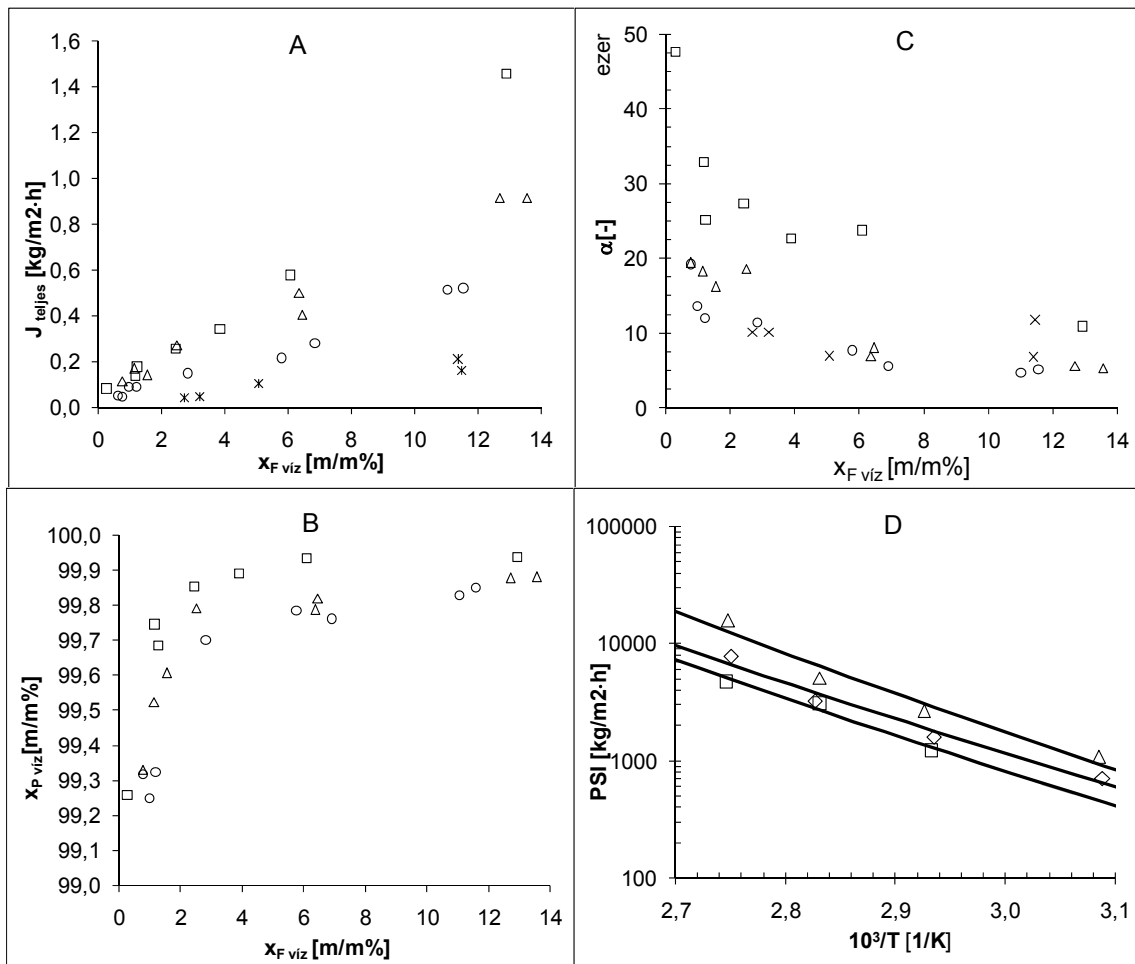


1.1. ábra A pervaporációs kísérleti berendezés sematikus ábrája; $A=28\text{cm}^2$; $V_F=500\text{cm}^3$

A pervaporációs szeparációs index az 1. ábrán látható kísérleti készülék elválasztóképességének hőmérséklettől való függését jelzi.

$$PSI \left[\frac{\text{kg}}{\text{m}^2 \cdot \text{h}} \right] = J_i (1 - \alpha) \quad (1.1)$$

A pervaporációs modul víz-etanol-PERVAP2210 rendszer kiértékelt adatai az 1.2. ábrán láthatóak. A fluxusok (1.2A ábra) a várakozásnak megfelelően viselkednek a hőmérséklet és a betáplálási összetétel függvényében. A vizsgálat célja az azeotrop összetétel feletti etanoltartalmú elegy esetén, tehát $x_{F_{\text{víz}}} < 5 \text{ m/m}\%$ és az etanol abszolútizálás céltartománya $x_{F_{\text{víz}}} < 0.5 \text{ m/m}\%$ esetén történő pervaporációs teljesítmény leírása. A nevezett összetételi tartományokban a permeát víztartalom (1.2B ábra) erőteljes esést mutat, mivel a betáplálási vízkoncentráció olyannyira kicsi, hogy a membrán aktív felülete mintegy elnyeli az elegy víz mennyiségét. A szelektivitási faktor [1.3] (1.2C ábra) is ennek megfelelően alakul. A PSI normalizált értékei (természetes logaritmus) az Arrhenius típusú hőmérsékletfüggést mutatnak.



1.2. ábra A víz-etanol-PERVAP2210 rendszerrel végzett kísérletek eredményei a betáplálási vízkoncentráció függvényében; A: teljes fluxus B: permeát víztartalom [m/m%], C: szeparációs faktor, D: Pervaporation Separation Index; az adatok csoportosítása: \times $T=50^\circ\text{C}$, \circ $T=70^\circ\text{C}$, Δ $T=80^\circ\text{C}$, \square $T=90^\circ\text{C}$ jelzés szerint

A mérési eredmények modellezése

A Rautenbach féle szemi-empirikus modell [1.7], az oldódás-diffúziós modellek csoportjába tartozik. Fick I. diffúziós törvényéből származtatva vezeti le a pervaporáció során lejátszódó transzportot. A modell a pervaporációs folyamat hajtóerejét, a koncentráció-gradienst, nyomáskülönbségben kifejezve írja le, lehetővé téve ezzel a nehéz mérés technikát igénylő adszorpciós mérések kihagyását. A modell egyenlete (1.1) komponensenként két paramétert, \bar{D}_{i0} transzportkoefficiens és E_i aktiválási energia együtthatót illetve membránként egy paramétert, Q_0 permeabilitási együtthatót

tartalmazza. A transzport koefficiens gyakorlatilag független a helytől, tehát a membrán aktív rétegében a koncentrációtól, viszont hőmérsékletfüggése a következő Arrhenius típusú egyenlettel írható le (1):

$$\bar{D}_{i0} = \bar{D}_{i0}^* \cdot \exp\left(\frac{E_i}{R} \cdot \left(\frac{1}{T^*} - \frac{1}{T}\right)\right) \quad i = 1, \dots, n \quad (1.2)$$

Amelyben $T^* = 293K$ hőmérséklet, a minimális áramsűrűsége vonatkoztatott referencia pont. Az exponenciális függés miatt szükséges hogy a kísérleteket legalább három izoterm görbével jellemezzük. A \bar{D}_{i0}^* relatív transzport együttható szintén referencia pont, a minimális fluxus értékét jellemzi T^* hőmérsékleten.

A parciális fluxus egyenlete (1.2) tartalmazza a nyomásgradienst a membrán betáplálási és permeátum oldala között, illetve a membránra jellemző permeabilitási tényezőt Q_0 , amely a porózus támasztóréteg teljes diffúziós ellenállását jelzi.

$$J_i = \frac{1}{1 + \frac{1}{Q_0 \cdot p_{i0} \cdot \gamma_i}} \cdot \frac{\bar{D}_{i0}}{\gamma_i} \cdot \left(\frac{p_{iF} - p_{iP}}{p_{i0}}\right) \quad i = 1, \dots, n \quad (1.3)$$

Ez utóbbi értéke, feltételezéseink szerint $Q_0 \approx \infty$, hiszen a sűrű aktív rétegről történő deszorpció után a komponensek a támasztóréteg nagy pórusátmérőjében, fizikai-kémiai kölcsönhatástól mentesen gyakorlatilag akadálytalanul haladhatnak.

A gőz-folyadék egyensúlyt számító (VLE) modell megválasztása nagy jelentőséggel bír. Az alkalmazható modellek csoportjából kizárjuk a hőmérsékletfüggést nem tartalmazókat (pl. Margules), hiszen az alkalmazott Rautenbach féle modell [1.7], a pervaporációhoz hasonlóan, egyértelműen hőmérsékletfüggő. A kísérletek során ezt a függést is vizsgáljuk, a betáplálási oldalon különböző hőmérsékleteket állítunk be. A membrán két oldalán szereplő aktivitási koefficienseket azonos modellel számítjuk, majd mértani átlagukat vesszük.

A gőz-folyadék egyensúlyt számító modellek nagyon érzékenyek a szélsőséges körülmények leírására. A permeátoldali kis nyomás lehetővé teszi, hogy a deszorbeálódó gőz halmazállapotú elegyet tökéletes gáznak tekintsük, melynek nyomása a tiszta komponens tenziójával egyenlő. Ennek számítása során azonban a VLE modellek

jelentősen eltérnek. Az általunk választott rendszerre a WILSON modell alkalmasabbnak bizonyult a gőz-folyadék egyensúly leírására UNIQUAC modellel összevetve.

Az izoterm, kis membránfelületen végzett mérések a szimuláció során alapul szolgálnak nagyobb membránfelületű modulok leírására. Ezért szükséges a hőmérleg-egyenlet felírása a kísérleti rendszerre. Ezt a (1.4) egyenlet formájában tettük meg. Ezzel a Rautenbach-féle modellt kiegészítettük, továbbfejlesztettük [8].

Mivel a kis térfogatú ($V = 500\text{cm}^3$) készülékben a hőmérsékletesés nem követhető nyomon közvetlen méréssel, a hőmérsékletesést a komponensek fajhőjéből és a parciális fluxusból számítjuk, a (4) egyenlet szerint.

$$\frac{c_p \cdot F \cdot \Delta T}{A} = \sum_{i=1}^n \lambda_i \cdot J_i \quad (1.4)$$

A pervaporációs modul paramétereinek becslése szélsőérték-keresési problémára vezethető vissza. A mért és modellezett eredmények normalizált eltérésnégyzeteinek minimumát keressük. A modellezést GAMS[©], matematikai optimalizáló CONOPT beépített eljárásprogramjával végeztük. Az algoritmus a bemenő nyers mérési adatokból számolja, az összetételeknek megfelelő nyomásértékeket, a hőmérséklettől függő tenziókat, az aktivitási koefficiens számító modellek alapján a megfelelő γ_i értékeket. Ezek alapján meghatározza a célfüggvény minimumát, \overline{D}_{i0}^* és E_i, Q_0 azaz a modellparaméterek értékeit. Az NLP feladat célfüggvénye a már említett eltérésnégyzet. A gyorsabb és pontosabb illesztés érdekében a célfüggvény kiegészítésre került pozitív/negatív deviációs együtthatók bevezetésével. Ezzel a célfüggvény a mért adatokat (víz fluxus $\text{mmol}/(0.0028 \text{ m}^2 \cdot \text{h})$) és permeátum víztartalom ($\text{m}/\text{m}\%$) két tizedes pontossággal határozza meg. A modellezett paramétereket az 1.2. táblázat tartalmazza. Az 1.3. ábrán láthatók a modellezés eredményei, párhuzamosan mindhárom hőmérsékleten. A mért és modellezett görbék jó illeszkedést mutatnak.

1.2. táblázat A víz-etanol-PERVAP2210 rendszer RAutanbach féle modell (2-4) meghatározott paramétereit

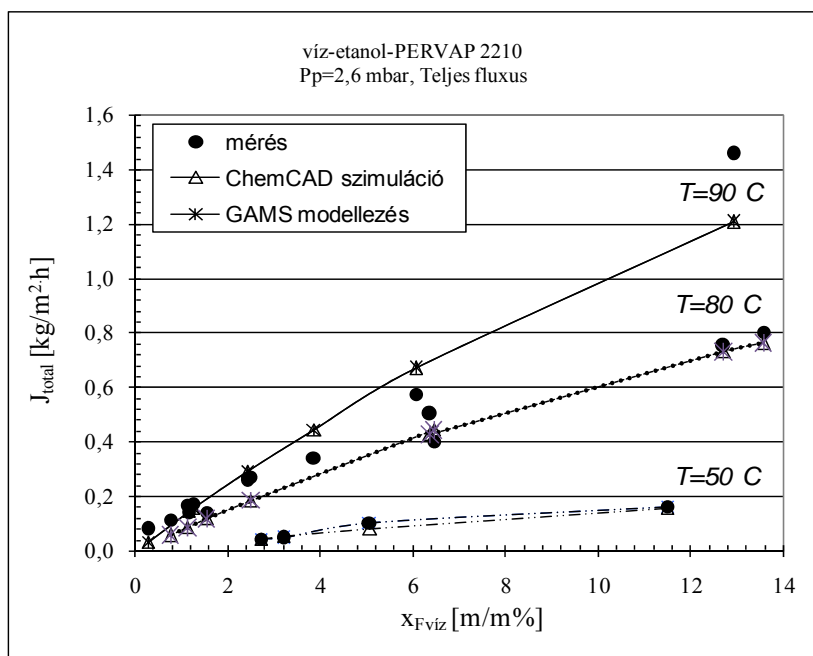
		<i>PERVAP2210</i>	<i>víz</i>	<i>etanol</i>
Q_0	$kmol/(m^2 \cdot h \cdot bar)$	0.1	//	//
\overline{D}_{i0}^*	$kmol/(m^2 \cdot h)$	//	3.47×10^{-3}	3.22×10^{-6}
E_i	$kJ/kmol$	//	$5.02 \times 10^{+4}$	$2.42 \times 10^{+4}$

Az egyenleteket általánosítva tetszőleges komponensszámú elegyre közöljük ezzel jelezve, hogy a módszertan kiterjeszhető más rendszereken végzett mérésekre, nagyobb komponensszámú elegyekre.

Modellezési kísérletek

A ChemCAD© professzionális folyamatszimulátor részeként általunk írott pervaporációs modult vizsgáltuk. A modulban a fentiekben meghatározott paramétereket használtuk (2. táblázat). A modellparamétereken kívül a felhasználó által változtatható értékek a következők: hőmérséklet, membránfelület, a membránfelület beosztásának érzékenysége, permeátum oldali nyomás és komponensek minősége. A komponensek fizikai-kémiai hátterét a program saját adatbázisa és számítási algoritmusai szolgáltatják. A modul, a modellezésben meghatározott Rautenbach féle modell (1.2-1.3) paramétereit alapján izoterm vagy adiabatikus módban számítja a kimenő áramok jellemzőit (parciális fluxus, összetétel).

Így a ChemCAD modellezési kísérletekkel kétszeresen ellenőrizzük és érvényesítjük a pervaporációs modell és a fentiekben meghatározott paramétereinek érvényességét és alkalmazhatóságát. A mért pontokat, a GAMS ill. ChemCAD programokkal modellezett és meghatározott izotermákat a kiválasztott víz-etanol-PERVAP2210 rendszer esetére közöljük az 1.2. ábrán. A mért és modellezett adatok nem térnek el egymástól, a fent említett célfüggvénynek köszönhetően. A mérési adatoktól való eltérés sem szignifikáns, a relatív szórás 2% körüli érték.



1.3. ábra A mérés, modellezés és szimuláció izotermái víz-etanol-PERVAP2210 rendszer esetén 3 hőmérsékleten

Összefoglalás

A bemutatott módszertan alkalmas pervaporációs rendszerek modellezési háttérének kidolgozására [9]. A módszert a víz-etanol-PERVAP2210 pervaporációs rendszer gyakorlati példáján keresztül szemléltettük. A rendszert kísérleti terv alapján vizsgáltuk, $0.5 m/m\% < x_{Fvöz} < 14 m/m\%$ betáplálási víztartalmú elegyek esetén, több hőmérsékleten. A mérésekből az általunk továbbfejlesztett Rautenbach féle modell paramétereit a modell paraméterillesztését NLP feladatként oldottuk meg. A kísérleteket a ChemCAD[©] szimulációs szoftver felhasználói membrán moduljában az kiindulási eredményekkel való összevetéssel teszteltük. A jó egyezés a módszertan és a professzionális folyamatszimulátor részeként írott modul alkalmazhatóságát igazolta.

Felhasznált irodalom

- [1.1] B. González and I. Uribe, Mathematical modeling of the pervaporative separation of methanol-methylterbutyl ether mixtures, Ind. Eng. Chem. Res., 40 (2001) 1720-1731.

- [1.2] B. González, I. Ortiz, Modelling and simulation of a hybrid process (pervaporation-distillation) for the separation azeotropic mixtures of alcohol-ether, J. Chem. Technol. Biot., 77 (2001) 29-42.
- [1.3] Bélafiné Bakó K.: Membrános műveletek, egyetemi jegyzet, Veszprémi Egyetemi Kiadó, (2002)
- [1.4] J. G. WIJMANS: Process performance=membrane properties+operating conditions (letter to the editor), J Membrane Sci., 220 (2003) 1-3.
- [1.5] Kemény S., Deák A., Kísérletek tervezése és értékelése, Műegyetemi Kiadó, Budapest, (1998)
- [1.6] Richard W. Baker szerkesztő, Membrane Technology and Applications, Second Edition, John Wiley & Sons, (2004)
- [1.7] R.Y.M. Huang (editor), R.C. Rautenbach, U. Herion, Meyer-Blumentoth, Pervaporation membrane separation processes, Membrane Science and Technology Series 1, Chapter 3 pp. 181-191., Elsevier, 1990
- [1.8] P. Mizsey, K. Koczka, A. Deák, Zs. Fonyó, A pervaporáció szimulációja az oldódás-diffúziós modell, Magyar Kémikusok Lapja, 7 (2005) 239-242.
- [1.9] A. Lovász, P. Mizsey and Zs. Fonyo, Methodology for parameter estimation of modelling of pervaporation in flowsheeting environment, Chem. Eng. J., 133 (2007) 219-227.

1.1.2 A metodológia kidolgozása biner és terner elegyek pervaporációjának modellezésére

Az 1.1.1 pontban leírt metodológiát kiterjesztettük terner elegyek vizsgálatára, melyhez vizsgáltuk a biner elegyeket is. Etanol - víz, i-propanol - víz, biner és etanol - i-propanol - víz elegyeket vizsgáltunk.

A vizsgálatot terner és biner elegyek kísérleti vizsgálatával kezdtük. A vizsgálat során kapott eredményeket az 1.1.1 pontban leírt metodológia alapján dolgoztuk fel. Ennek során megállapítottuk, hogy

- a leginkább permeálódó komponens paraméterei mind a biner mind a terner mérésekből is megállapítható,
- a kompozit membránok támasztórétegének ellenállása gyakorlatilag elhanyagolható².

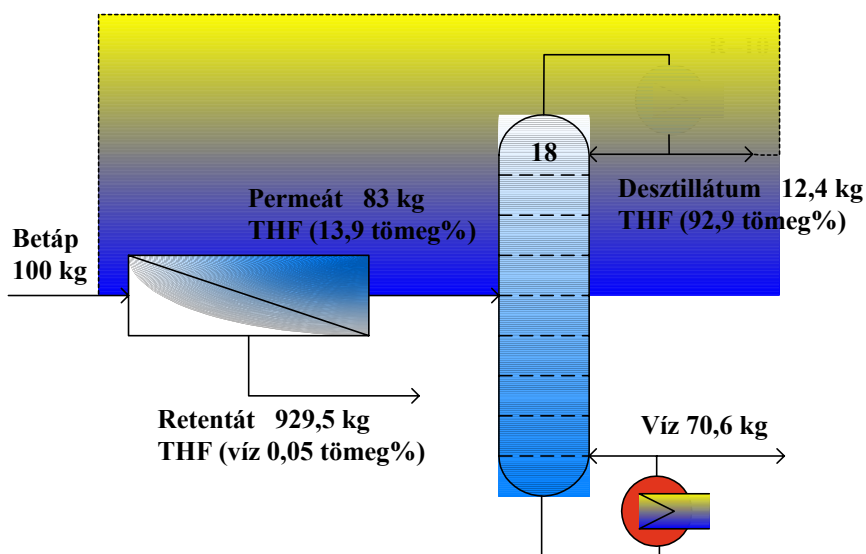
² Lovász, A., Mizsey, P.: Methodology for modelling of pervaporation: binary and ternary mixture cases, Membrane Science and Technology conferences of Visegrad Countries, PERMEA, p80 (oral lecture), ISBN 978-963-9319-691, 2007

1.1.3 Pervaporáción alapuló új hibrid eljárás ipari oldószer-visszanyerésére a fenntartható fejlődés érdekében

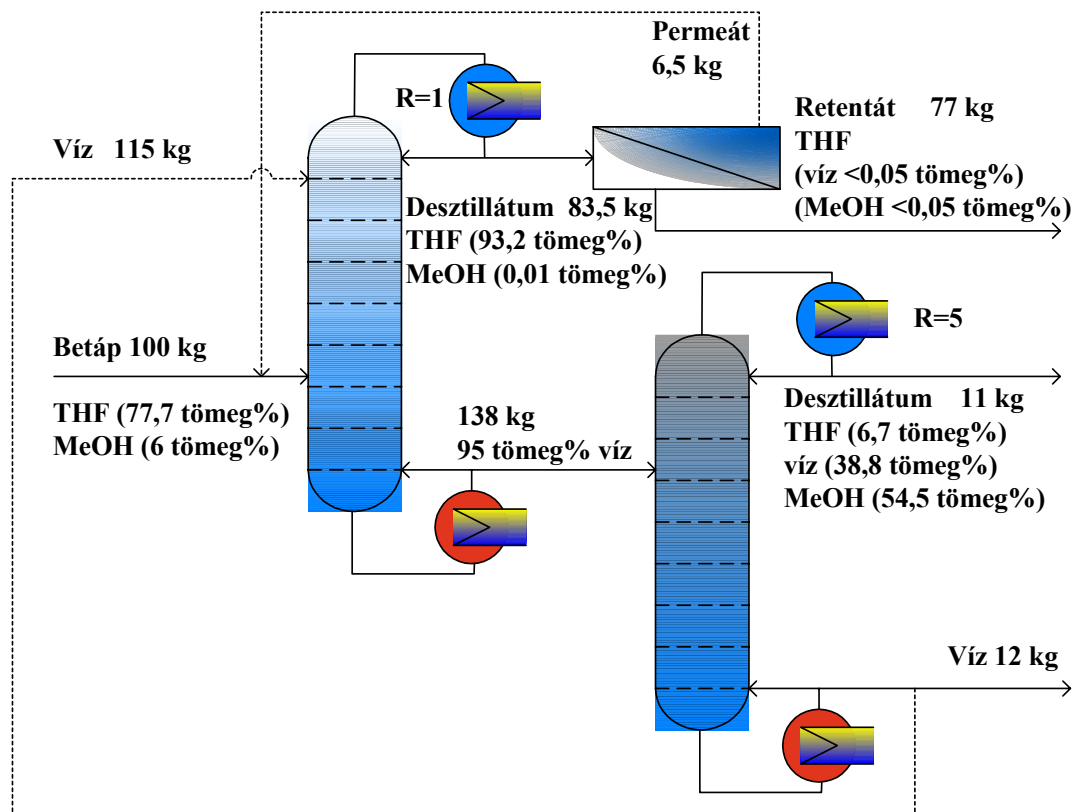
A szerves oldószerek visszanyerése kiemelten fontos területe a környezetvédelemnek, mellyel hozzájárulunk a fenntartható fejlődés megvalósításához.

Gyógyszergyári tetrahidrofurán (THF) regenerálását vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a jelenlegi technológia komoly THF veszteséggel dolgozik, és ennek megszüntetése kiemelten fontos.

Új, pervaporáción alapuló hibrid elválasztási technológiákat dolgoztunk ki, melyek alkalmaznak még desztillációt ill. extraktív desztillációt is (1.4, 1.5 ábrák).



1.4 ábra, Pervaporáción alapuló THF regenerálási új hibrid eljárás



1.5 ábra, Pervaporáción alapuló THF regenerálási új hibrid eljárás, metanol szennyezés esetére

Az új hibrid eljárásokkal a THF regenerálás THF vesztesége a régi eljárás veszteségének kb. 1/6-ára csökkenthető. Hasonló tendenciát mutatnak a költségparaméterek is³.

2.1 A membránszűrés alkalmazhatósága, kétlépéses membránszűrési technikák

A membránszűrést elsősorban a technológiai hulladékvizek kezelésének eseteire vizsgáltuk. Csurgalékvizekre, melyek kémiai oxigénigénye (KOI) viszonylag alacsony, és magas KOI-ű gyógyszergyári hulladékvizekre vizsgáltuk meg.

A vizsgálat során megállapítottuk, hogy mind a nanoszűrés mind a fordított ozmózis jól alkalmazható a széles KOI spektrumon⁴.

A téma kutatása során megállapítottuk, hogy a magas KOI-vel rendelkező hulladékvizeket kétlépésben kell membránszűrésnek alávetni, mert egy lépés még nem okoz elegendő visszatartás, a permeátumént kapott tisztított hulladékvíz még nem csatornázható.

³ Koczka, K., Manczinger, J., Mizsey, P., Fonyo, Z.: Novel hybrid separation processes based on pervaporation for the regeneration of tetrahydrofuran, Chemical Engineering and Processing 46, 239-245, 2007

⁴ Edit Cséfalvay, Péter M. Imre, Péter Mizsey,: Applicability of Nanofiltration and Reverse Osmosis for the Treatment of Wastewater of Different Origin, Cent. Eur. J. Chem. 6(2), 2008, 277–283, 2008

Kétlépéses technika alkalmazása esetén célszerűbb nanoszűrést első lépésnek alkalmazni, és második lépésnek pedig fordított ozmózist⁴.

2.2 Membránszűrés matematikai modellezése

Nanoszűrő és fordított ozmózis membránok viselkedését vizsgáltuk különböző összetételű rézoldatok membránszűrése esetén. A kísérleteket laboratóriumi membrán tesztberendezésen végeztük el izoterm (25°C) körülmények között, szakaszos üzemmódban. Minden kísérletet 80%-os permeációig végeztünk. Az alkalmazott siklap membránon keresztáramú szűrést valósítottunk meg. A kísérletek során mértük a permeát fluxusát, vezetőképességét, pH-ját és a rézkoncentrációját. A kísérletek során mért fluxus értékeket semi-empirikus egyenletek segítségével modelleztük: az oldódás-diffúziós modell segítségével az idő függvényében, illetve az ellenállásmodell segítségével a vízvisszanyerési ráta függvényében. A modell eredményeit összevetettük a kísérleti eredményekkel, és azt tapasztaltuk, hogy az ellenállásmodell a mért értékekkel jobb egyezést mutat.

Bevezetés

Napjainkban a növekvő vízfelhasználás és az egyre növekvő szennyvíz mennyisége arra késztet bennünket, hogy a víztisztítási módszerek hatékonyságát növeljük, illetve a lehető legtöbb ipari eljárásnál a felhasznált vizet visszaforgassuk a technológiába, így csökkentve a vízfelhasználást. Számos ipari eljárás nagy vízigénnyel rendelkezik. Sok esetben a keletkező kimeneti technológiai vizek, igaz kis koncentrációban, de értékes anyagokat is tartalmazhatnak, amelyek kinyerése nemcsak környezetvédelmi, hanem gazdasági szempontból is jelentős. Így van ez a nehézfémeket tartalmazó technológiai vizek esetében is. Több eljárás is létezik a nehézfémek kinyerésére, például adszorpció, csapadékképzés, komplexképzés, ioncsere, bepárlás, illetve membránszűrés.

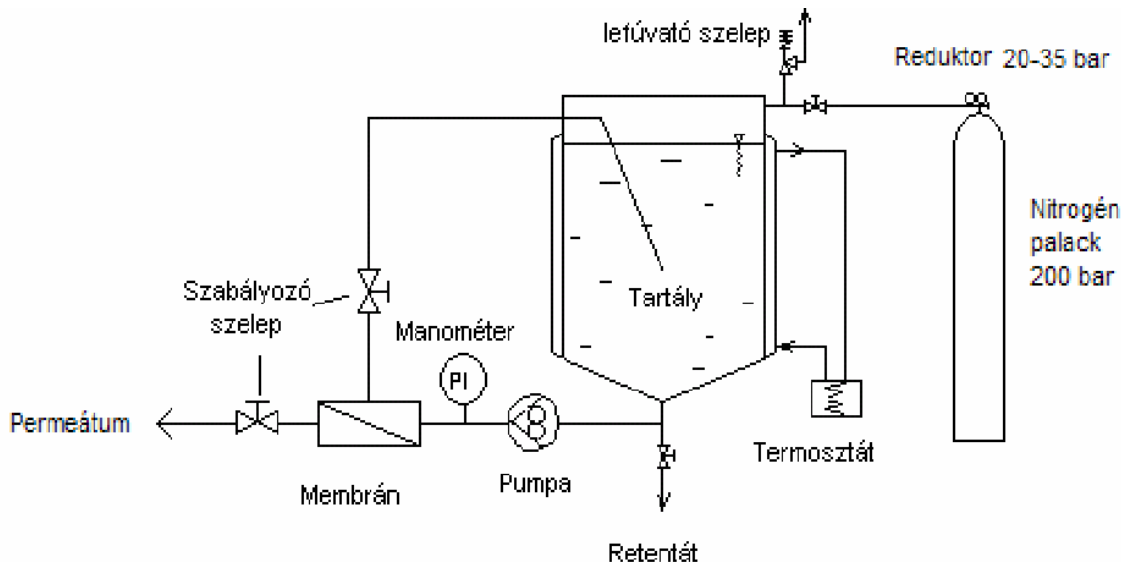
Mindinkább nagyobb hangsúlyt kap a környezetbarát tisztítási technológiák alkalmazása a víztisztítás területén. Ezek közé sorolható a membrántechnológia is, mivel alkalmazásával egyéb vegyi anyag hozzáadása és jelentősebb energia befektetése nélkül lehet tiszta vizet előállítani. A víztisztítók tervezéséhez viszont elengedhetetlen az eljárás működésének, matematikai leírásának ismerete. A membránon keresztüli transzport leírására több modell is létezik, mint például az oldódás-diffúziós modell [2.1], pórus modell [2.2], és az ellenállásmodellek [2.3], [2.4].

Ebben a tanulmányban nanoszűrő és fordított ozmózis membránokat használtunk réz(II) tartalmú oldatok membránszűrésére, és azt vizsgáltuk, hogy ezek a műveletek alkalmasak-e réztartalmú oldatok szűrésére. Továbbá a membránon áthaladó permeát fluxusát modelleztük az oldódás-diffúziós modell segítségével az idő függvényében, illetve az ellenállás modellel a vízvisszanyerési ráta függvényében.

Kísérletek

A kísérleti berendezés

Az alkalmazott kísérleti berendezés sematikus rajzát mutatja a 2.1. ábra. A készülék egy szakaszos üzemű membrán tesztberendezés (CM-CELFA Membrantechnik AG P-28), amely cross-flow üzemmódban működtethető. A kísérletekhez analitikai tisztaságú réz-szulfát-5-hidrátot használtunk.



2.1. ábra Az alkalmazott membrán tesztberendezés sematikus rajza

A szűrőoldatot a tartályba töltjük, melynek térfogata $0,5 \text{ dm}^3$. A tartály termosztálható, így a mérések azonos hőmérsékleten végezhetők el. A membránszűréshez szükséges hajtóerőt (nyomáskülönbség) külső palackból, inert gáz befűvásával, egy reduktor segítségével hozzuk létre. A betáplált oldatot egy pumpa segítségével cirkuláltatjuk, így a membránnal való érintkezés után a visszamaradó töményebb oldat visszakérül a tartályba. A membránon áthaladó permeát folyamatosan távozik a rendszerből. A membrán permeát oldala atmoszférikus nyomáson van. Az alkalmazott membrán minden esetben 28 cm^2 felületű siklapmembrán. Kísérleteinkhez SE fordított ozmózis membránt (Sterlitech Corporation) és MPF44 nanoszűrő membránt (Koch Membrane Systems, Inc.) használtunk.

2.1. Táblázat SE és MPF44 membránok alkalmazhatósági tartományai

Paraméter	SE	MPF44
Tipikus működési nyomás (10^5 Pa)	30	30
Tipikus működési hőmérséklet ($^{\circ}\text{C}$)	25	30
Alkalmazható pH tartomány	2-11	2-10
Tipikus visszatartás 1 g/l NaCl oldatra (%)	98,9	25

Szűrési eljárás

A membránokat minden alkalmazott túlnyomás értéknél desztillált vízzel kondicionáltuk, hogy elérjük a kívánt fluxust, és egyben meghatározzuk a 2.2. egyenletben szereplő A' konstanst, valamint kimérjük a membránellenállást (R_m). A kísérleteket állandó (25°C) hőmérsékleten végeztük el $15 \cdot 10^5 - 35 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ nyomástartományban. Minden kísérlet során mértük a permeát fluxusát, vezetőképességét, pH-ját és réztartalmát. A kísérleteket szakaszos üzemmódban végeztük el, azaz a tartályba betöltöttük a $0,5 \text{ dm}^3$ szűrőoldatot, majd a tartály lezárása után beállítottuk a kívánt nyomásértéket, és megnyitottuk a permeát elvezető szelepet. A permeátot adott térfogatonként gyűjtöttük, amely elegendő volt az analitikai elemzéshez. A kísérleteket minden esetben addig folytattuk, amíg a permeát mennyisége 80%-a volt a kiindulási oldatnak (vízviszanyerési ráta=80%). A betáplált oldatok koncentrációja $0,5\text{-}2 \text{ kg/m}^3$ rézre(II) vonatkozóan. A szűrőoldatokat analitikai tisztaságú $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -ból állítottuk elő. A nehézfémre vonatkozó koncentráció

tartományt úgy választottuk meg, hogy az egy textileket galvanizáló üzem tipikus öblítő lé koncentrációjának feleljen meg.

Analitikai módszerek

A permeát hőmérsékletét, vezetőképességét és pH-ját egy WTW 340i pH/vezetőképesség-mérővel mértük. A rézkoncentráció meghatározását atomabszorpcióval végeztük egy Perkin Elmer 3100 típusú AAS készülékkel 324,8 nm-es hullámhosszon. A permeát viszkozitását Höppler-viszkoziméterrel mértük.

Semi-empirikus modellek, modellezés értékelése

A fluxus időfüggésének modellezése

A membránon keresztüli anyagtranszport leírható az oldódás-diffúziós modellel [2]. Ez alapján a víz, mint permeálódo komponens fluxus az alábbi egyenlet szerint írható le.

$$J_w = D_w \cdot K_w^L \cdot c_{w,f} \cdot v_w \cdot \frac{(\Delta p - \Delta \pi)}{l \cdot R \cdot T} \quad (2.1)$$

ahol J_w víz fluxusa ($\text{kg}/\text{m}^2\text{s}$); D_w (m^2/s) a víz diffúziós együtthatója a membránban; K_w^L (-) a víz membrán felületére vonatkozó adszorpciós együtthatója; $c_{w,f}$ (kg/m^3) a víz koncentrációja a betáplálási oldalon; v_w a víz moláris térfogata (m^3/mol); Δp (Pa) a transzmembrán nyomás; $\Delta \pi$ (Pa) az ozmotikus nyomáskülönbség a betáplálási és permeát oldal között; l a membrán aktív rétegének vastagsága; R a gázállandó ($8.314 \text{ J/K}\cdot\text{mol}$) és T (K) a hőmérséklet.

Ez az egyenlet folyamatos szűrésre vonatkozik. Mivel a kísérleteket szakaszos üzemen végeztük el, így fontos a fluxus időfüggésének megállapítása. A (2.1) egyenletet tekintve szakaszos szűrés esetén a betáplálási oldali vízkoncentráció és az ozmotikus nyomáskülönbség változik az időben, így ezen paraméterek időfüggésének meghatározása elengedhetetlen a modellezéshez. Mivel a vizsgált rézoldatok híg oldatok, a víz diffúziós- és szorpciós együtthatói állandónak tekinthetők. A kísérleteket állandó nyomáson, illetve hőmérsékleten végeztük, így a (2.1) egyenletben szereplő állandók összevonhatók. Az előző megfontolások alapján a (2.1) egyenletet az alábbi egyszerű formát ölti:

$$J_w = A' \cdot c_{w,f} \cdot (\Delta p - \Delta \pi) \quad (2.2)$$

Az A' konstans értékének meghatározásához desztillált vizet szűrtünk különböző nyomásokon, és mértük a tiszta víz fluxusát (PWF=Pure Water Flux). Mivel a betáplált oldat tiszta víz, ezért a betáplálási oldali vízkoncentráció állandó, az ozmotikus nyomáskülönbség pedig nulla. Így a (2.2) egyenletből kiszámítható az A' konstans értéke. A mérések kiértékeléséhez a STATISTICA szoftvert használtuk.

SE (RO) membrán

Az SE RO membránon végzett desztillált vizes kísérletek azt mutatták, hogy az A' konstans független az időtől és a víz visszanyerési rátától, viszont függ az alkalmazott nyomástól. Így az RO kísérletek modellezésekor az egyes nyomásokon desztillált vízzel végzett kísérletekből számított A' értékeket használtuk.

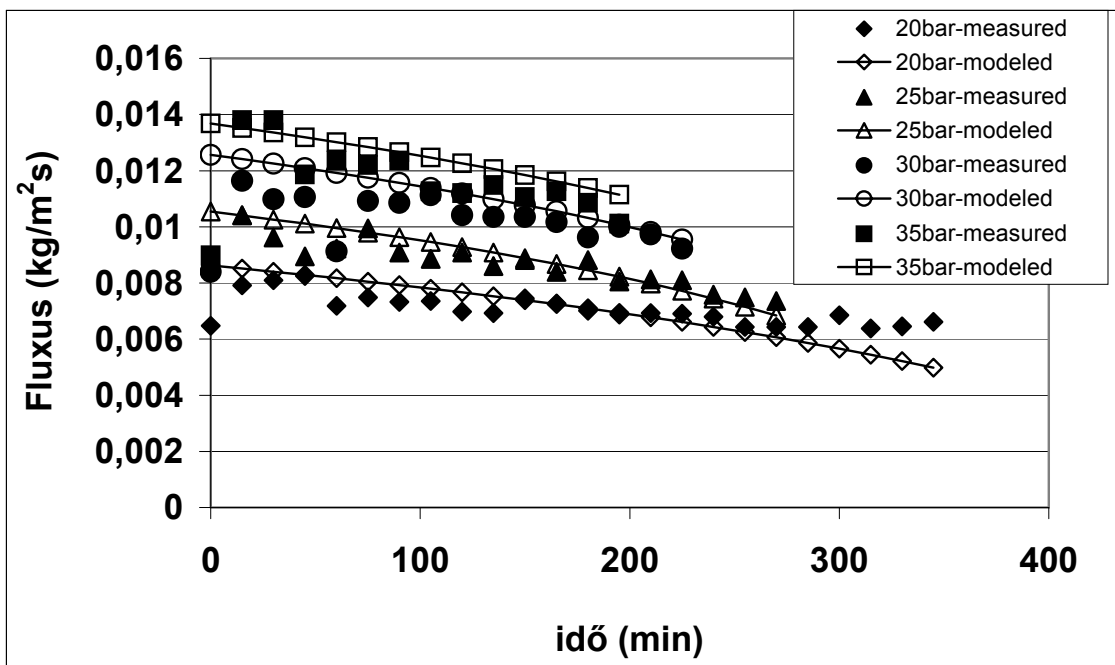
A kísérletek során a permeátok rézkoncentrációjának meghatározása után az anyag és komponensmérés alapján számolható volt a betáplálási oldalon maradt víz koncentrációja, illetve az ozmotikus nyomáskülönbség. Ezeket a mérési idő függvényében ábrázolva a STATISTICA szoftver segítségével a köztük lévő összefüggés megállapítható volt. A $c_{w,f}$ -t ábrázolva az időben negatív exponenciális összefüggést találtunk, míg a $\Delta \pi$ esetén pozitív exponenciális összefüggés adódott. Az illesztett egyenletek a következők:

$$\Delta \pi = \text{const} \cdot \exp(0.0001 \cdot t) \quad (2.3)$$

$$c_{w,f} = \text{const}_1 \cdot \exp(-\text{const}_2 \cdot t) \quad (2.4)$$

ahol t az idő szekundumban, $\Delta \pi$ az ozmotikus nyomáskülönbség (Pa) és $c_{w,f}$ a víz koncentrációja a betáplálási oldalon (kg/m^3).

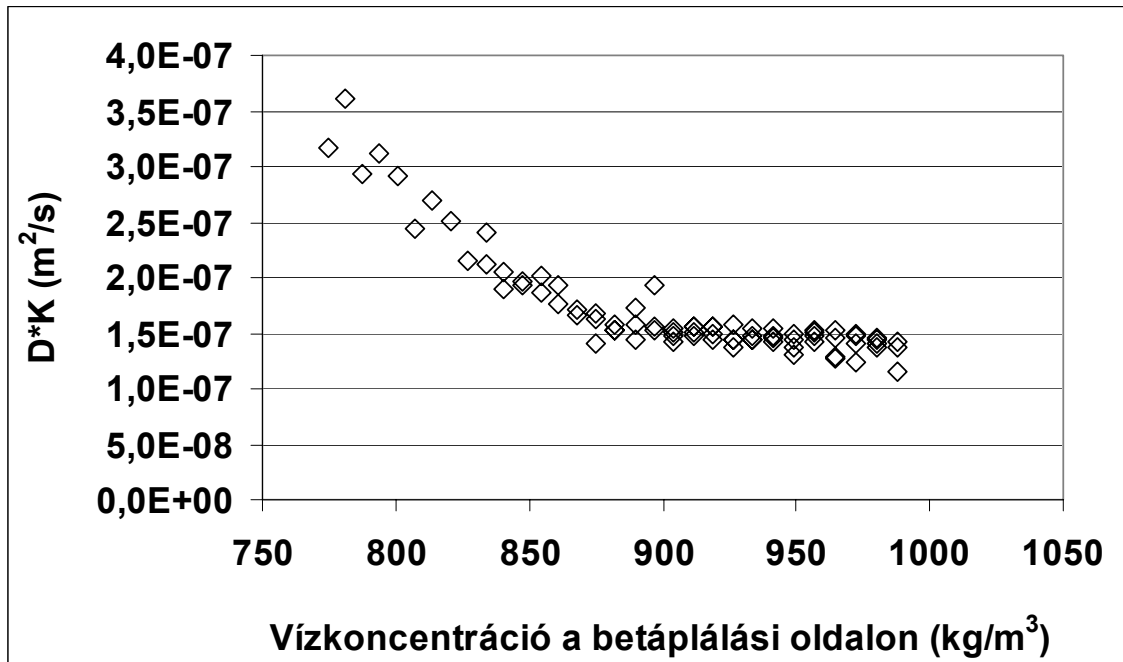
A 2.2 ábra mutatja az RO mérések és modellezések eredményeit a különböző nyomásokon. A kiindulási oldat koncentrációja rézre vonatkozóan minden esetben 2 kg/m^3 volt. A fekete szimbólumok jelölik a mérési eredményeket, az üres szimbólumok vonallal összekötve jelölik a modellezés eredményeit. Az ábráról látható, hogy magasabb nyomáson a modell jobb egyezést mutat a mérési eredményekkel.



2.2. ábra: Mért és modellezett fluxusok 2 kg/m^3 kiindulási rézkoncentráció esetén, különböző nyomásokon az SE RO membránra vonatkozóan

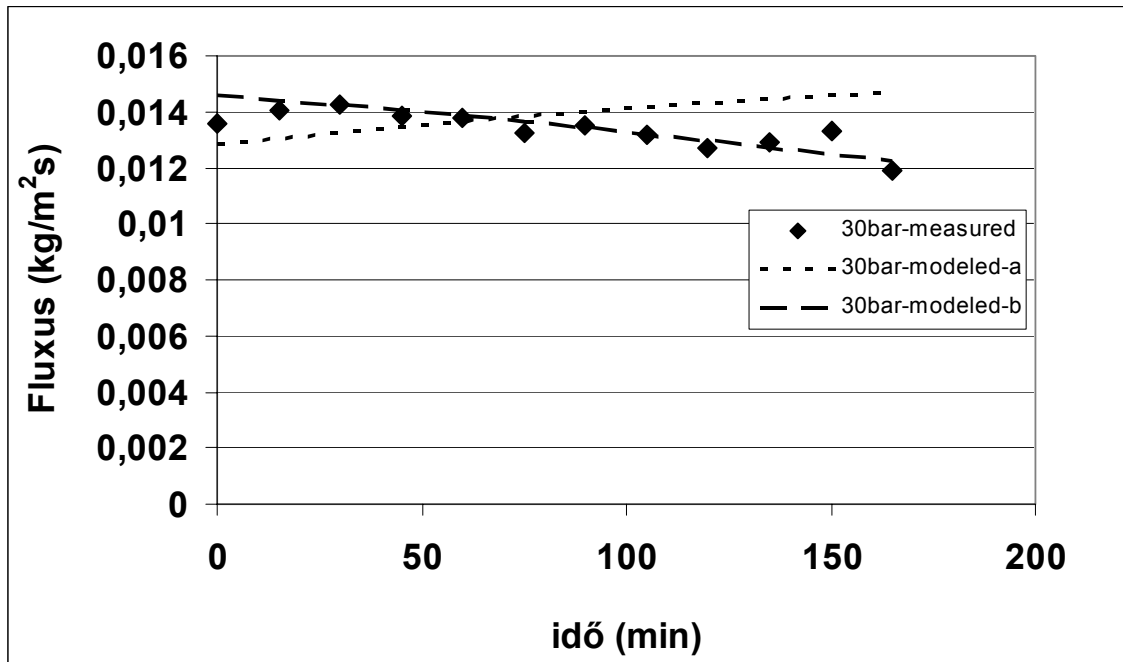
MPF44 (NF) membrán

Hasonlóan az előző alponthoz, először desztillált vízzel végeztünk kísérleteket az A' konstans értékének megállapítása céljából. A kapott konstanssal elvégezve a modellezést azt tapasztaltuk, hogy a modell jóval alulbecsli a mérési eredményeket. Ebből arra következtettünk, hogy nanoszűrő membrán esetén a korábbi feltételezésünk, mely szerint a víz diffúziós- és szorpciós együtthatói állandó, ebben az esetben nem helyénvaló. Az NF mérésekből a diffúziós- és szorpciós együtthatók szorzatát kiszámítva, és azt ábrázolva betáplálási oldal vízkoncentrációjának függvényében látható lett a együtthatók és a vízkoncentráció kapcsolata. Ezt mutatja a 2.3 ábra



2.3. ábra: MPF44 membránon végzett kísérletekből számolt $D_w \cdot K_w^L$ értékek a betáplálási oldal vízkoncentrációjának függvényében.

A 2.3 ábra alapján két feltételezéssel éltünk: az első, hogy $D_w \cdot K_w^L$ szorzata exponenciálisan függ a betáplálási oldal vízkoncentrációjától, azaz a fenti pontseregbe egy exponenciálist illesztettünk, és ezt használtuk fel a fluxus modellezésekor. Ezt az esetet jelöli a „modelled-a” feliratú görbe a 2.4. ábrán. A másik feltételezés szerint a $D_w \cdot K_w^L$ szorzat híg oldatok ($c_{w,f} = \sim 875-1000 \text{ kg/m}^3$) esetén állandó, csak egy adott koncentráció felett függ csak a koncentrációtól, mégpedig lineárisan. Azaz, ha híg oldatot szűrünk szakaszos műveletben, akkor adott ideig a betáplálási oldalon maradt oldat még mindig híg marad, viszont a szűrést tovább folytatva az oldat betöményedik, ami után már nem tekinthető híg oldatnak, kvázi, a diffúziós koefficiens koncentrációfüggése számottevő lesz. Hasonló módon a szorpciós koefficiensre is igaz lehet ez a feltételezés. Ezt az esetet jelöli a „modelled-b” feliratú görbe a 2.4 ábrán.



2.4. ábra Mért és modellezett fluxusok 2 kg/m³ kiindulási rézkoncentráció esetén, 30 bar transzmembrán nyomáson az MPF44 NF membránra vonatkozóan

A két feltételezés közül nagyobb a valószínűsége annak, hogy a második az igaz, mivel a „modeled-b” jelű görbe sokkal jobban illeszkedik a mérési pontokra.

A fluxus modellezése a vízvisszanyerési ráta függvényében

Habár az előző pontban láttuk, hogy a fluxus modellezése az időben lehetséges, további modellezéseket végezhetünk a vízvisszanyerési ráta függvényében, lévén, hogy szakaszos műveletről van szó. Ez a lehetőség direkt információt adhat a szűrési folyamat állapotáról és a koncentráció alakulásáról. A vízvisszanyerési ráta függvényében történő modellezéshez a Rautenbach-féle ellenállás modellt alkalmaztuk, amely a (2.5) egyenlettel írható le.

$$J = \frac{\Delta p - \Delta \pi}{\eta(R_f + R_m)} \quad (2.5)$$

Az egyenlet szerint a fluxus egyenesen arányos a transzmembrán nyomás és az ozmotikus nyomáskülönbség különbségével, és fordítottan arányos a permeát viszkozitásával (η) és az ellenállásokkal. R_m a membránellenállás (1/m) és R_f az ún. eltömődési ellenállás (1/m). A kísérletek során a fluxus a (2.6) egyenlet alapján számítható.

$$J = \frac{1}{A} \cdot \frac{dV_p}{dt} \quad (2.6)$$

ahol A (m²) a membrán felülete, V_p (m³) a permeát térfogata és t (s) a mérési idő.

Amint az a (2.6) egyenletből látható a permeát térfogata időben változik. Ha a vízvisszanyerési rátát úgy definiáljuk, mint a permeát térfogata viszonyítva konstans betáplálási térfogatra, akkor látható, hogy a vízvisszanyerési ráta is függ az időtől. Ily módon az időfüggés átkonvertálható a víz vízvisszanyerési rátától való függéssé. A módosított ellenállásmodell kimondja, hogy a fluxus függ az ozmotikus nyomáskülönbségtől, amely közvetett módon, de függ a permeát térfogatától. Az eltömődési ellenállás nő, ha

a betáplálási oldalon egyre töményebb az oldat. Mindezen megfontolások lehetővé teszik, hogy kísérletek során kapott fluxusokat a vízviszanyerési ráta függvényében modellezzük.

A modellezéshez szükséges paraméterek meghatározása

A membránellenállás meghatározása

Mind az RO, mind pedig az NF membrán ellenállását desztillált vízzel mértük ki. A kísérleti berendezés tartályába 0,5 dm³ desztillált vizet töltöttünk, majd beállítottuk a kívánt nyomást, és mértük a permeát térfogatát a kitermelés függvényében. Desztillált víz esetén az ozmotikus nyomáskülönbség nulla, és eltömődési ellenállás sincs, ezért a (2.5) egyenlet az alábbi egyszerűbb formában írható fel:

$$J_D = \frac{\Delta p}{\eta \cdot R_m} \quad (2.7)$$

J_D -t mértük, a nyomáskülönbséget mi állítottuk be, a víz viszkozitása pedig táblázatból kiolvasható. Így R_m értéke számítható. Különböző hajtóerő esetén különböző membránellenállás értékeket kaptunk, de a különbség nem volt számottevő. A célból, hogy a fluxus modellezésénél minimalizáljuk a hibát, a kapott R_m értékek közül a legkisebbet használtuk fel.

Az eltömődési ellenállás vízviszanyerési rátától való függésének meghatározása

Ha feltétezzük, hogy nincs eltömődés, akkor a (2.5) egyenletet alkalmazva a kapott fluxus értékek jóval magasabbak a mért fluxus értékeknél. Ez igazolja azt, hogy a szakaszos membránszűrés esetén eltömődési ellenállással kell számolni. Az eltömődési ellenállásokat minden egyes mérési pontra iteratív módon határoztuk meg, majd a kapott R_f értékeket ábráztoltuk a vízviszanyerési ráta függvényében, hogy lássuk a köztük lévő kapcsolatot. A kiértékeléshez a STATISTICA szoftvert használtuk. Rézszulfát oldatok szűrése esetén R_f hatványfüggvény szerint függ a vízviszanyerési rátától.

$$R_f = const \cdot 10^{14} \cdot \left(\frac{V_P}{V_F} \right)^{0.1} \quad (2.8)$$

ahol V_P (m³) a permeát térfogata és V_F (m³) a konstans kiindulási térfogat. RO fluxusok modellezésénél a konstans értéke minden alkalmazott nyomáson 1, míg NF mérések esetén 1 és 1.6 között változik a nyomás függvényében.

A permeát viszkozitásának meghatározása

A permeát viszkozitását Höppler-féle viszkoziméterrel mértük. A permeátok viszkozitása 25°C-on jelentéktelen mértékben tért csak el a 25°C-os víz viszkozitásától, ezért a modellezésnél ez utóbbival számoltunk.

Az ozmotikus nyomáskülönbség vízviszanyerési rátától való függésének meghatározása

Minden egyes kísérlet esetén a permeátokat adott térfogatonként gyűjtöttük, hogy elegendő legyen az analitikai méréshez. Így a permeátokat négy részletben gyűjtöttük, és meghatároztuk azok réz koncentrációját. A kísérletek során mértük a permeát pH-ját, és mivel az a kísérletek során végig állandó volt, arra a következtésre jutottunk, hogy a membrán azonos anyagmennyiségben tartotta vissza, illetve engedte át a réz- és a szulfát ionokat. A mért permeát koncentrációkból a retentát koncentrációját a komponensmérleg alapján számoltuk.

$$c_R = \frac{c_F \cdot V_F - c_P \cdot V_P}{V_F - V_P} \quad (2.9)$$

ahol c_R a retentát, c_F a kiindulási oldat, c_P a permeát koncentrációja mol/m³-ben. Az oldott anyag koncentrációjának ismeretében a van't Hoff törvény alapján kiszámolhatjuk az ozmotikus nyomáskülönbséget.

$$\Delta\pi = \pi_R - \pi_P = (c_{R,CuSO_4} - c_{P,CuSO_4}) \cdot R \cdot T \quad (2.10)$$

ahol R a gázállandó és T a hőmérséklet K-ben. Mivel minden kísérlethez négy koncentrációnk, abból pedig négy ozmotikus nyomáskülönbség értékünk volt, meghatározhattuk az ozmotikus nyomáskülönbség vízviszanyerési rátától való függését. A kiértékeléshez a STATISTICA programot használtuk, és az alábbi összefüggést tapasztaltuk.

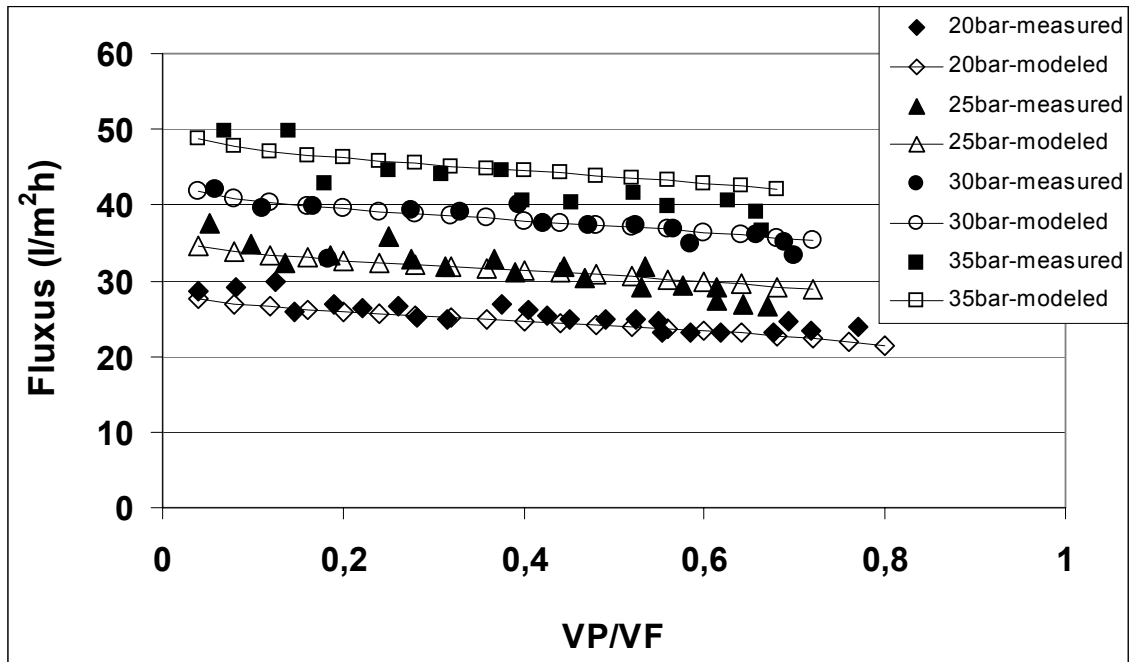
$$\Delta\pi = const_1 \cdot c_{F,CuSO_4} \cdot \exp\left(const_2 \cdot \frac{V_P}{V_F}\right) \quad (2.11)$$

SE (RO) membrán

Az RO membránnal végzett kísérletek modellezésekor az ozmotikus nyomáskülönbség számítására az alábbi empirikus összefüggést használtuk.

$$\Delta\pi = 1451.67 \cdot c_{F,CuSO_4} \cdot \exp\left(2.5 \cdot \frac{V_P}{V_F}\right) \quad (2.11.a)$$

Ahogy már említettük, az eltömődési ellenállás a (2.8) egyenlet alapján számoltuk, amelyben a konstans értéke 1. A 2.5 ábra mutatja a mért és a modellezett fluxusokat SE RO membránra vonatkozóan, 2 kg/m³ kiindulási rézkoncentrációk esetén a különböző nyomásokra. A fekete szimbólumok jelölik a mérési eredményeket, az üres szimbólumok vonallal összekötve jelölik a modellezés eredményeit. Az ábráról látható, hogy a modell jól leírja a mérési eredményeket.



2.5. ábra: Mért és modellezett fluxusok 2 kg/m³ kiindulási rézkoncentráció esetén különböző nyomásokon SE RO membránra vonatkozóan a vízviszanyerési ráta függvényében

MPF44 (NF) membrán

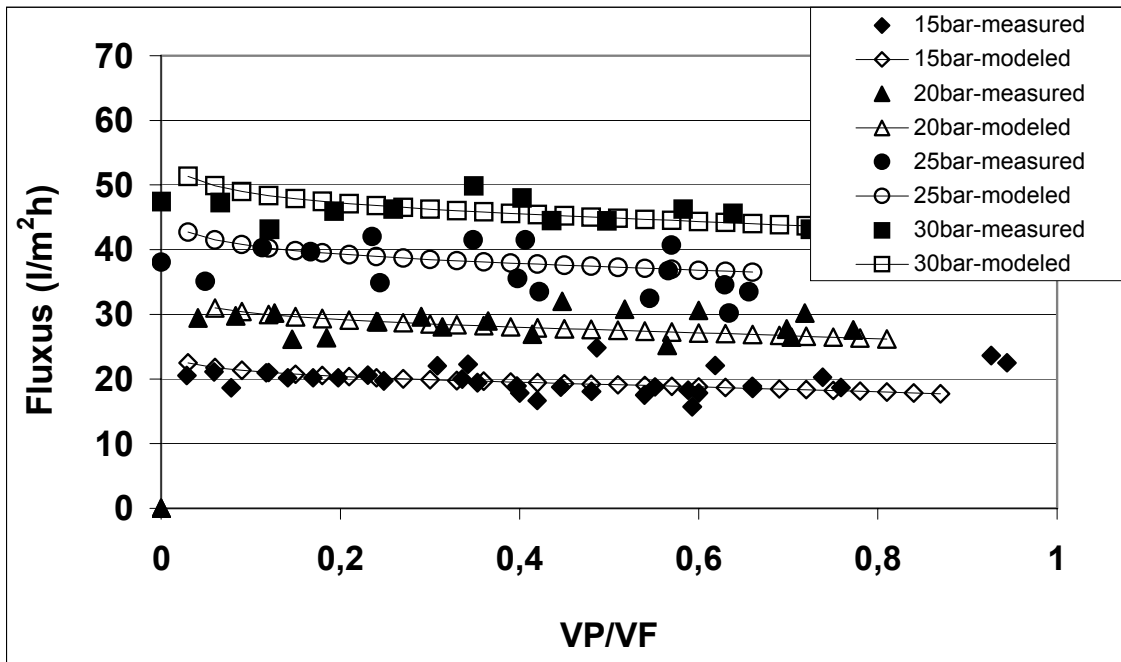
Az NF mérések esetén is az ellenállás modellt használtuk a permeát fluxusok modellezésére, de a modellezés egy kicsit komplikáltabb, mint az RO membrán esetén, mivel több kiindulási rézkoncentrációt is megvizsgáltunk.

Az ozmotikus nyomáskülönbség a vízviszanyerési ráta függvényében a (11) egyenletnek megfelelően alakul:

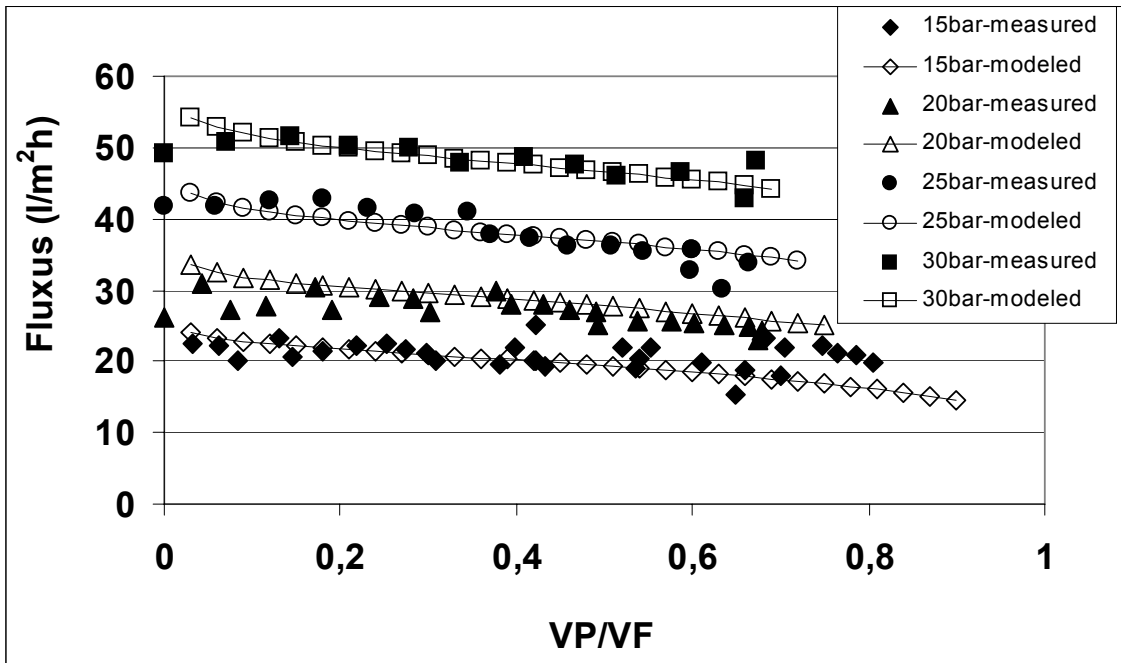
$$\Delta\pi = 1573.388 \cdot c_{F,CuSO_4} \cdot \exp\left(2.5 \cdot \frac{V_P}{V_F}\right) \quad (2.11.b)$$

Mivel a kísérleteket különböző koncentrációjú kiindulási oldatokkal végeztük, ezért a (2.8) egyenletnek különböző konstansai lesznek. Ezek a konstansok 1 és 1,6 között változnak a nyomás függvényében. A jelenség magyarázata az lehet, hogy magasabb nyomáson a permeát fluxus magasabb, és szakaszos szűrés esetén kevesebb idő szükséges ugyanakkora vízkinyerés eléréséhez. Így kevesebb idő marad az eltömődés kialakulására.

A 2.6 ábra mutatja a mért és modellezett fluxusokat a vízviszanyerési ráta függvényében a 0,5 kg/m³, a 2.7 ábra pedig 2 kg/m³ kiindulási rézkoncentrációk esetén MPF44 (NF) membránra vonatkozóan. Mindkét ábrán a fekete szimbólumok a mért fluxusokat, míg az üres szimbólumok vonallal összekötve a modellezett fluxusokat jelölik. Mindkét ábra jól mutatja, hogy a mérési pontok kicsit szórnak a modellezett értékek körül, de összességében az ellenállás modell jól leírja a kísérleteinket.



2.6. ábra: Mért és modellezett fluxusok 0,5 kg/m³ kiindulási rézkoncentráció esetén különböző nyomásokon MPF44 NF membránra vonatkozóan a vízviszanyerési ráta függvényében



2.7. ábra: Mért és modellezett fluxusok 2 kg/m³ kiindulási rézkoncentráció esetén különböző nyomásokon MPF44 NF membránra vonatkozóan a vízviszanyerési ráta függvényében

Következtetések

Rézoldatok szakaszos membránszűrését végeztük el nanoszűrő és fordított ozmózis membránokon, majd a mérési eredményeket modelleztük. Az oldódás-diffúziós modell egyszerűsített változatát (lásd (2.2) egyenlet)

alkalmaztuk a fluxus időbeli függésének modellezésére. Feltételezésünk, mely szerint a (2.2) egyenlet A' konstansa időben állandó, és a koncentrációtól független, az SE RO membránon végzett kísérleteknél beigazolódott. Az MPF44 NF membránon végzett kísérleteknél viszont azt tapasztaltuk, hogy A' értéke függ a betáplálás oldali víz koncentrációjától. Ez esetben az a feltételezésünk látszott beigazolódni, mely szerint NF membránon végzett kísérletek esetén A' értéke híg oldatok esetén (víztartalom $\approx 875\text{-}1000\text{ kg/m}^3$) állandó, viszont a szakaszos szűrés előrehaladtával, azaz a betáplálás oldali víz koncentrációjának csökkenésével, lineárisan nő. A modellezéshez szükséges volt továbbá a betáplálás oldali víz koncentrációjának, illetve az ozmotikus nyomáskülönbségnek időfüggését is meghatározni, amelyeknél exponenciális összefüggést kaptunk. Ezen megfontolások alapján a mért és a semi-empirikus modellel számolt fluxusok jó egyezést mutattak.

Habár a fluxus időbeli modellezése kielégítőnek bizonyult, méréseinket az ellenállás modellel is modelleztük a vízviszanyerési ráta függvényében. A kísérletek előtt desztillált víz szűrésével meghatároztuk a membránellenállást. A kapott értékek kismértékű szórása miatt a legalacsonyabb R_m értéket használtuk fel a fluxus modellezésekor. A semi-empirikus modellezés ez esetben azt jelentette, hogy a kísérleteinkből megállapítottuk az ozmotikus nyomáskülönbség, illetve az eltömődési ellenállás és a vízviszanyerési ráta kapcsolatát, majd ezeket az egyenleteket (2.8, 2.11a, 2.11b) használtuk fel az ellenállás modellben. Megállapítottuk, hogy $\Delta\pi$ a vízviszanyerési ráta függvényében exponenciálisan nő, míg R_f hatványfüggvény szerint változik.

Összefoglalásként elmondható, hogy a vízviszanyerési ráta függvényében történő semi-empirikus modellezés jobb egyezést mutat a mérési eredményekkel, így ez a modell nagyobb biztonsággal alkalmazható szakaszos membránszűrés modellezésére.

Jelölésjegyzék

J_w	Víz fluxusa ($\text{kg/m}^2\text{s}$)
D_w	Víz diffúziós koefficiense (m^2/s)
K_w^L	Víz szorpciós koefficiense (-)
c_{wf}	Vízkoncentráció a betáplálási oldalon (kg/m^3)
v_w	Víz moláris térfogata (m^3/mol)
l	Membrán vastagsága (m)
R	Egyetemes gázállandó ($\text{J/K}\cdot\text{mol}$)
T	Hőmérséklet (K)
Δp	Transzmembrán nyomás (Pa)
$\Delta\pi$	Ozmotikus nyomáskülönbség (Pa)
A'	Konstans
t	Idő (s)
J	Permeát fluxus ($\text{m}^3/\text{m}^2\text{s}$)
η	Permeát viszkozitás ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
R_f	Eltömődési ellenállás (1/m)
R_m	Membránellenállás (1/m)
A	Membrán effektív felülete (m^2)
V_P	Permeát térfogat (m^3)
V_F	Kiindulási térfogat (m^3)
J_D	Desztillált víz fluxusa ($\text{m}^3/\text{m}^2\text{s}$)
c_R	Retentát koncentráció (mol/m^3)
c_P	Permeát koncentráció (mol/m^3)
π_R	Retentát ozmotikus nyomása (Pa)
π_P	Permeát ozmotikus nyomása (Pa)
V_P/V_F	Vízviszanyerési ráta (-)

Irodalomjegyzék

- 2.1. Wijmans, J.G. and R.W. Baker, *The solution-diffusion model: a review*. 1995. **107**(1-2): p. 1.
- 2.2. Baker W., R., *Membrane Technology and Applications*. 2004, Menlo Park, California: Wiley.
- 2.3. Schäfer, A.L., A.G. Fane, and T.D. Waite, *Principles and Applications*. 2005, Amsterdam.
- 2.4. Mulder, M.H.V. and D.N.a.S.A.S. Richard, *Chapter 2 Polarization phenomena and membrane fouling*, in *Membrane Science and Technology*. 1995, Elsevier. p. 45-84.

1.3 Együttműködés a másik két kutatócsoporttal

1.3.1 Membránműveletek és az extrakció összekapcsolása

Kísérletet tettünk a szuperkritikus extrakció és a membránműveletek összekapcsolására. Ennek keretében kukoricacsíra etanolos Soxhlet extrakciós műveletének mindkét termékét vizsgáltuk, azaz olajos-etanolos-vizes elegyek membránszűrését végeztük etanol visszaszűrés céljából. Ezek a kísérletek szolgálhattak volna alapul a félüzemi szuperkritikus extraháló készüléken végzett további kísérletekhez.

Az irodalomban javarészt biodízel előállításával foglalkozó cikkek fordulnak elő, amelyben növényi olajok szuperkritikus állapotú metanollal történő átészterezését illetve a konkrét esetre pervaporációt [3.1,3.2] javasolnak a rendszer elválasztására.

Azonban a pervaporálható elegy olajtartalma nem haladhatja meg az 1 wt%-ot, a membrán teljes eltömődésének veszélye nélkül. Esetünkben a kevés etanolt, ~ tartalmazó olajos fázis ~70—80 wt% olajat tartalmazott, míg az alkoholos fázis sem kevesebb, mint 7 wt%-at. Ezért ultraszűrés kísérleteket végeztünk 1 bar, 5 bar és 10 bar nyomáson, 100, 20, 10 Hgmm permeát oldali nyomáson és 20°C illetve 40°C hőmérsékleten, inert közegként N₂ gáz biztosította a betáplálási tér nyomását.

Az üledéket is tartalmazó retentátum elegyeket előzetesen szűrőpapíron szűrtük, a kisebb porusméretű ultraszűrő membrán valószínűsíthető eltömődésének elkerülése érdekében. A kísérleteket a CM-Celfa P28 típusú multifunkciós membránberendezéssel végeztük, a választott modellhez szükséges permeátum-viszkozitást Höppler, golyós viszkoziméterrel mértük, sűrűséget piknométerrel.

Két típusú membránnal kísérleteztünk: Sterlitech UF GH 1kDa; Sterlitech JW 30kDa vágási értékkel. Mindkettőn etanol-víz és kevés olaj elegye lett volna a permeátum, azonban a kísérleteket mindössze egy esetben sikerült, a próbaleggel reprodukálni. Ennek oka, hogy amennyiben az áramoltatott keverés ment a készülékben, az elegy felhabosodott (elégett az olaj). Ha nem kevertettük a rendszert, eltömődött a membrán, viszont hűtött és nem kevert rendszerrel olyan kis mennyiségű permeátum (és olajos) terméket kaptunk, amelyből semmiképpen nem lehetett következtetéseket levonni nagyobb méretű membrános berendezés működésére vonatkozóan.

Irodalomjegyzék:

- 3.1. Ferreira, L., M. Kaminski, et al. (2001). "Development of a new tool for the selection of pervaporation membranes for the separation of fusel oils from ethanol/water mixtures." Journal of Membrane Science **182**(1-2): 215-226.
- 3.2. Vauclair, C., H. Tarjus, et al. (1997). "Permselective properties of PVA-PAA blended membrane used for dehydration of fusel oil by pervaporation." Journal of Membrane Science **125**(2): 293-301.
- 3.3. Tsui, E. M. and M. Cheryan (2007). "Membrane processing of xanthophylls in ethanol extracts of corn." Journal of Food Engineering **83**(4): 590-595.

1.3.2 Bioetanol gyártás membránművelettel

A bioetanol gyártás része a tiszta alkohol kinyerése. Ehhez együttműködünk az Iskola másik csoportjával és pervaporációt is alkalmazó gazdaságos hibrid elválasztási eljárást dolgozunk ki.

A dr. Réczey Katalin vezette kutatócsoport robbantott kukoricaszárból illetve cukoroldatból pékélesztővel fermentált alapanyagot kaptunk. Az anyagokat előzetesen szűrtük, majd egyfokozatú desztillációval töményítettük, mivel az eredeti kiindulási minták mindössze 3-7 g/L etanol tartalmaztak, amely a pervaporációs hajtóerő létrehozásához alacsony érték. A minták továbbá metanolt és etil-acetátot tartalmaznak kisebb mennyiségben. A mintákat kísérleti terv alapján feldolgoztuk. A korábbi modell, víz-etanol kísérletekre illesztett Rautenbach féle modellparaméterekkel a fermentált minták pervaporációs eredményeit szimuláltuk. A kísérletek azonos körülmények között hajtottuk végre, az összehasonlíthatóság érdekében; tehát organofil PERVAP 4060 membránon (Varga Balázs diplomamunka;) három hőmérsékleten és négy betáplálási összetétellel. A szimulációt a ChemCAD felhasználó által beépített membrán modulban, a modellkísérletekre illesztett paraméterekkel végeztük. Eredményként az találtuk, hogy a binér modellkísérletekből jó megbízhatósággal lehet következtetni a valós fermentált elegy binér jellemzőire.

A fenti két téma kutatása már a projekt utolsó évében, hónapjaiban történt. Nem sikerült az eredményeket teljesen kiaknázni, ill., értékelni. A tématerület folytatása ígéretes. Remélhetőleg sikerül ezeket egy újabb projekt keretében folytatnunk.

2. Résztema:

Szilárd Anyagok Szuperkritikus Fluid Extrakciójának Vizsgálata, és a Művelet Anyagátadásának Modellezése

2.1. Laboratóriumi kísérletek

2.1.1. Illóolajok kinyerése hagyományos vízgőz-desztillációval.

Munkánk során különböző illóolaj és zsíros-olaj tartalmú növényi mintákat vizsgáltunk. A jelentős illóolaj-tartalmú növények (fűszerkömény, fodormenta, borsmenta) illóolaj-tartalmát szuperkritikus extrakcióval és hagyományos vízgőz-desztillációs eljárással nyertük ki.

2.1.2. Növényi hatóanyagok kinyerése hagyományos oldószeres extrakcióval (etil-alkohol, *n*-hexán).

A vizsgált növények oldhatóanyag-tartalmát minden minta esetén meghatároztuk laboratóriumi Soxhlet-extrakcióval (MSZ ISO 659: 1998), különböző polaritású oldószereket alkalmazva (*n*-hexán vagy *n*-pentán, etil-alkohol).

2.1.3. Különböző növények laboratóriumi méretű szuperkritikus fluid extrakciója szén-dioxiddal. A vizsgálatok célja a minta előkészítés, valamint az extrakciós és szeparációs körülmények, hozamra és összetételre gyakorolt hatásának megállapítása.

Az előkészítés valamint a szeparációs körülmények hatását félüzemi méretben vizsgáltuk. A szemcseméret, a szárazanyag-tartalom valamint az olajtartalom hatását kb. 40 paprika minta szuperkritikus extrakciója során vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a szemcseméret csökkentése, azaz a minták hatékonyabb őrlése (a jellemző szemcseméret 0,2 – 0,7 mm), nagymértékben növeli az extrakciós hatékonyságát. A nedvességtartalomnak 7 – 18% tartományban nincs hatása az extrakciós hozamra. Ugyanakkor a 18%-nál nagyobb nedvességtartalom, a hatékonyság csökkenését eredményezi. Az olajtartalom növekedésének, 5 - 10% tartományban hatékonyság növelő hatását bizonyítottuk, míg a 10 % feletti további olajtartalom növekedés szignifikáns hatékonyság növekedést nem eredményezett.

Ugyancsak paprika minta esetén az egyes szeparátor nyomását (160-240 bar) és hőmérsékletét (35-55°C) változtattuk kísérletterv szerint, vizsgálva a kapszaicin- és a színezéktartalom megoszlását a két szeparátor között. Azt tapasztaltuk, hogy a szuperkritikus szén-dioxidban rosszabbul oldható színanyagok az első szeparátorban, míg a jobb oldhatósággal rendelkező kapszaicin származékok a második szeparátorban dúsulnak fel. A legjobb elválasztást akkor értük el, amikor az első szeparátorban 240 bar nyomást és 55 °C hőmérsékletet alkalmaztunk.

A kukoricacsíra minták esetén az olajtartalom egy részét hidegen préseléssel nyertük ki az extrakció előtt. Munkánk során préseletlen (~46 % olajtartalom), egyszer-préselt (~22 % olajtartalom) és kétszer-préselt (~10 % olajtartalom) kukoricacsíra minták extrakcióját is elvégeztük. Az extrakciós görbék jellege azonos volt, azonban nagyobb olajtartalmú mintáknál a szükséges extrakciós idő is nagyobb volt.

2.1.4. Az extraktumok széleskörű analitikai vizsgálata (TLC, GC, GC-MS, HPLC), az illóolaj és más nem illó komponensek (terpének, szteroidok, karotinoidok, zsírsavak) összehasonlítása.

Borsmenta (*Mentha piperita* L.), fodormenta (*Mentha spicata* L.), fűszerkömény (*Carum carvi* L.) illóolajtartalmát szuperkritikus extrakcióval és vízgőz-desztillációval nyertük ki.

Az illóolajok analitika vizsgálatát GC illetve GC-MS módszerrel végeztük. A növényekre jellemző, azonosított fő komponensek: limonén, karvon, mentol, pinén, szabinén, dihidrokarveol. Megállapítottuk, hogy a szuperkritikus extraktor második szeparátorából és a vízgőz-desztillációval kinyert olaj optikai forgatása eltérhet, az alkalmazott extrakciós technika és a növény származási helyétől függően. Az egyes enantiomerek eloszlását királis GC módszerrel határoztuk meg limonén és karvon esetén.

A szuperkritikus extrakciós kísérletek során kapott extraktumok beltartalmi értékeinek analitikai vizsgálata TLC, GC, GC-MS és HPLC módszerekkel történt. A nem illó komponensek közül kvalitatív és kvantitatív módszerekkel analizáltuk a fenolokat, flavonoidokat, karotinoidokat, szizosterolokat, tokoferolokat, diterpéneket, szeszkviterpéneket, zsírsavösszetételt.

Paprika minta esetén por minták, és olaj minták teljes színezék és kapszaicin tartalmának (spektrofotometria, HPLC), valamint az említett anyagok komponensek szerinti megoszlásának (HPLC) meghatározását végeztük el.

2.2 Félüzemi kísérletek

2.2.1. Félüzemi szuperkritikus fluid extrakciós kísérleteket 5 dm^3 térfogatú extraktorban. Az extrakciós és szeparációs körülményeket (nyomás, hőmérséklet) kísérlet tervezés alapján választjuk meg.

A félüzemi szuperkritikus extrakció mérésnél a szilárd anyagot az 5 dm^3 térfogatú extraktorba helyeztük. A tartályból a CO_2 -ot hűtött vezetéken keresztül adagolószivattyúval az extraktorba tápláltuk, miközben az extraktor köpenyében lévő csökígyón keresztül a megfelelő hőmérsékletet elérte.

A szilárd anyag ágyon végighaladva az oldószer kioldja az adott nyomáson és hőmérsékleten oldható komponenseket. Az oldatot az extraktorból nyomáscsökkentő szelepen és hőcserélőn keresztül a szeparátorokba vezettük, ahol kiváltak az oldatban lévő komponensek. Az extrakciót addig folytattuk, amíg a hozam változása óránként 0,1-0,05 % alá nem csökkent.

Munkánk során préseletlen, egyszer és kétszer préselt kukoricacsíra, paprika, réti legyezőfű, paradicsomtörköly, csillagfűrt, tökmag, szőlőmag, körömvirág, homoktövis, barátcserje mintákat vizsgáltunk.

További, hazánkban termesztett fűszer- és gyógynövény (körömvirág, homoktövis, barátcserje és paprika) minták szuperkritikus extrakciója során az extrakciós körülményeket kísérletterv alapján változtattuk. A körömvirág, homoktövis és barátcserje vizsgálata során a változtatott extrakciós paraméterek a nyomás és a hőmérséklet voltak, míg paprika minták esetén a szeparátor-nyomásokat változtatva nyertünk eltérő termék összetételt (karotin, kapszaicin).

Homoktövis minta esetén az extrakciós nyomás és hőmérséklet hatását vizsgáltuk a teljes hozamra, valamint a szitoszterin-, urzolsav-, színezék- és tokoferoltartalomra 3^2 kísérlet terv szerint. A legkedvezőbb hozamokat 460 bar felett és 60 °C körül értük el.

A *Vitex agnus castus* szuperkritikus extrakcióját az előbbiekhöz hasonlóan végeztük el, a nyomást és a hőmérsékletet változtatva kísérletterv szerint, vizsgálva a teljes, valamint a rotundifurán, β -szitoszterin, β -amirin, valamint a kaszticin hozamot. Legkedvezőbb eredményeket 450 bar nyomáson és 45 °C-on kaptuk.

2.2.2. A szuperkritikus extrakció és a membrán szeparáció műveletek összekapcsolása, a nagyértékű biológiai hatóanyagok további dúsítása.

Kísérletet tettünk a szuperkritikus extrakció és a membránműveletek összekapcsolására. Ennek keretében kukoricacsíra etanolos Soxhlet extrakciós műveletének mindkét termékét vizsgáltuk, azaz olajos-etanolos-vizes elegyek membránszűrését végeztük etanol visszanyerés céljából. Ezek a kísérletek szolgálhattak volna alapul a félüzemi szuperkritikus extraháló készüléken végzett további kísérletekhez.

Az irodalomban javarészt biodízel előállításal foglalkozó cikkek fordulnak elő, amelyben növényi olajok szuperkritikus állapotú metanollal történő átészterezését illetve a konkrét esetre pervaporációt [1,2] javasolnak a rendszer elválasztására.

Azonban a pervaporálható elegy olajtartalma nem haladhatja meg az 1 wt%-ot, a membrán teljes eltömődésének veszélye nélkül. Esetünkben a kevés etanol, ~ tartalmazó olajos fázis ~70—80 wt% olajat tartalmazott, míg az alkoholos fázis sem kevesebb, mint 7 wt%-at. Ezért ultraszűrés kísérleteket végeztünk 1 bar, 5 bar és 10 bar nyomáson, 100, 20, 10 Hgmm permeát oldali nyomáson és 20°C illetve 40°C hőmérsékleten, inert közegként N_2 gáz biztosította a betáplálási tér nyomását.

Az üledéket is tartalmazó retentátum elegyeket előzetesen szűrőpapíron szűrtük, a kisebb porusméretű ultraszűrő membrán valószínűsíthető eltömődésének elkerülése érdekében. A kísérleteket a CM-Celfa P28 típusú multifunkciós membránberendezéssel végeztük, a választott modellhez szükséges permeátum-viszkozitást Höppler, golyós viszkoziméterrel mértük, sűrűséget piknométerrel.

Két típusú membránnal kísérleteztünk: Sterlitech UF GH 1kDa; Sterlitech JW 30kDa vágási értékkel. Mindkettőn etanol-víz és kevés olaj elegye lett volna a permeátum, azonban a kísérleteket mindössze egy esetben sikerült, a próbaleggel reprodukálni. Ennek oka, hogy amennyiben az áramoltatott keverés ment a készülékben, az elegy felhabosodott (elégett az olaj). Ha nem kevertettük a rendszert, eltömődött a membrán, viszont hűtött és nem kevert rendszernél olyan kis mennyiségű permeátum (és olajos) terméket kaptunk, amelyből semmiképpen nem lehetett következtetéseket levonni nagyobb méretű membrános berendezés működésére vonatkozóan.

Irodalomjegyzék:

3.4. Ferreira, L., M. Kaminski, et al. (2001). "Development of a new tool for the selection of pervaporation membranes for the separation of fusel oils from ethanol/water mixtures." *Journal of Membrane Science* **182**(1-2): 215-226.

3.5. Vauclair, C., H. Tarjus, et al. (1997). "Permeable properties of PVA-PAA blended membrane used for dehydration of fusel oil by pervaporation." Journal of Membrane Science **125**(2): 293-301.

3.6. Tsui, E. M. and M. Cheryan (2007). "Membrane processing of xanthophylls in ethanol extracts of corn." Journal of Food Engineering **83**(4): 590-595.

2.3. Matematikai modellezés

2.3.1. *Különböző matematikai modellek alkalmazása az extrakciós eljárásra. A kiindulási anyagok (nedvességtartalom, oldható komponensek kezdeti koncentrációja), valamint a töltet (szemcseméret eloszlás, fajlagos felület, fajlagos hézagterefogat, porozitás) jellemzőinek kísérleti meghatározása. A modell paraméterek meghatározása a laboratóriumi és a félüzemi kísérletek értékelése alapján.*

Az egyszerű kísérletekből meghatározott paraméterek (kezdeti koncentráció, fajlagos hézagterefogat, szilárd anyag sűrűsége) ismeretében végeztük el a különböző növények szuperkritikus extrakciójának számítógépes leírását, amelyre egy, kis oldhatóanyag tartalmú növények extrakciójának leírására alkalmas, egyszerű elsőrendű kinetikán alapuló modellt, és egy összetettebb, olajtartalomtól függetlenül alkalmazható, modellt (Sovová modell) választottunk. Az anyagátadási tényező értékét a szilárd vázanyagban a modell segítségével határoztuk meg. A mintákat rendszerint az extrakció előtt megdaráltuk, hogy növeljük az anyagátadó felületet. A minták nedvességtartalmát a kiindulási és a szuperkritikus kísérletek maradékából egyaránt meghatároztuk (ISO 665: 2000).

Egyszerűsített modell:

A szuperkritikus extrakció hozam görbéket ábrázolva az extrakciós idő függvényében minden esetben hasonló alakú görbét nyerünk. A görbék egy kezdeti, közelítőleg lineáris emelkedő szakasszal és a végső hozam által meghatározott vízszintes vonalhoz aszimptotikusan görbülő szakasszal jellemezhetőek. Az első, lineáris rész a végrehajtott extrakció körülményei között fennálló egyensúlyi állapotokra jellemző oldékonysággal arányos. A második részhez tartozó görbét az extrakció végén a szilárd fázisban történő diffúzió határozza meg. Ekkor az extrakció sebessége (görbe meredekség) gyorsan csökkent, mivel az oldható anyag a belső zárt sejtekből nehezebben nyerhető ki.

Ha a belső diffúzió a sebesség-meghatározó részfolyamat, célszerű a mérlegegyenletet a szilárd anyagra felírni. Feltételezve, hogy az extrakció sebessége arányos a vázanyagban maradt oldható anyag koncentrációjával (lineáris modell).

Az extrakciós hozamot a kezdeti szárazanyagra (m_s kg drog) szokták vonatkoztatni, és mivel az extraktum mennyiségét szokták mérni, Y -nal jelölik (az angol „yield” szóból):

$$Y = Y_v(1 - e^{-kt}) = x_0(1 - e^{-kt}) \quad (1)$$

ahol Y a t idő alatt a fluid fázissal kihozott anyag mennyisége (kg/kg), Y_v az oldható anyag teljes mennyisége (végtelen idejű extrakcióval elérhető hozam) (kg/kg), k a sebességi vagy anyagátadási koefficiens (1/s), t az extrakció ideje (s) x_0 a kezdeti koncentráció a szilárd vázanyagban (kg/kg).

A kísérleti eredmények matematikai leírása a (1) egyenletet használtuk. Az eredményekre legjobban illeszthető, nem-lineáris egyenletekből meghatároztuk az anyagátadásra jellemző Y_v és k paramétereket. A görbeillesztést a Statistica 7.1 programmal végeztük.

Sovová modell

A szuperkritikus extrakció számítógépes modellezését Sovová munkái nyomán továbbfejlesztettük. Ez a modell rendkívül sok paramétertől függ. A zsíros-olajos magvak (kukoricacsíra, tökmag, szőlőmag, csillagfűrt stb.) szuperkritikus extrakciós vizsgálata során, a paramétereket egyszerű kísérletekből (fajlagos hézagterfogat, kezdeti koncentráció, szilárd anyag sűrűsége, szemcseméret), empirikus egyenletekből (szén-dioxid sűrűsége, az adott nyomáshoz és hőmérsékletéhez tartozó telítési koncentráció, fajlagos felület, diffúziós tényező, anyagátadási tényező a fluid fázisban), valamint görbeillesztéssel (S dimenziómentes modellparaméter, valamint a felületen lévő könnyen oldható anyaghányad) határoztuk meg.

A minták kezdeti koncentrációját (x_0) n-pentánnal, teljes kimerülésig folytatott laboratóriumi Soxhlet-extrakcióval végeztük el (MSZ ISO 659:1998).

A szilárd töltet sűrűségét (ρ_s) Hofsäss-féle légpiknométerrel határoztuk meg. A halomsűrűség (δ) és a tényleges anyagsűrűség ismeretében, a töltött oszlopban a fajlagos hézagterfogat (ε) az alábbi képlettel számítható.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\delta}{\rho_s} \quad (2)$$

A fajlagos felületet (a_p) a szemese átmérőből számítottuk. A szemcseméret eloszlás jellemzésére a Rosin-Rammler-Bennet (RRB) eloszlást választottuk. A növényi anyagok extrakciójának leírására az RRB modellt elsőként mi alkalmaztuk.

Az RRB modell szerint a szitamaradvány (adott d lyuk átmérőjű szitán fennmaradó hányad) a következő függvénnyel írható le.

$$R = 100 \exp \left[- \left(\frac{d}{d_0} \right)^n \right] \quad (3)$$

ahol:

R a szitamaradvány-összeg (%) ami a szitálási eredményekből számítható,

d szemcseméret (mm),

d_0 a jellemző szemcseméret (mm), amelyhez $R=36,8\%$ szitamaradék tartozik,

n az egyenletességi tényező (-).

Az egyenletességi tényező (n), valamint a jellemző szemcseméret (d_0) ismeretében a „felületi-térfogati” átlagos átmérő (d_{sv}) az alábbi képlettel számítható:

$$d_{sv} = \frac{1}{\frac{1}{d_0} \Gamma \left(1 - \frac{1}{n} \right)} \quad (4)$$

A „felületi-térfogati” átlagos átmérő ismeretében a fajlagos felületet az alábbi képletet alkalmazva határoztuk meg:

$$a_p = \frac{6}{d_{sv}} (1 - \varepsilon) \quad (5)$$

A szén-dioxid sűrűségét (ρ_f) az extrakció nyomásán és hőmérsékletén a Bender állapotegyenletből számítottuk.

Az adott nyomáshoz és hőmérsékletéhez tartozó telítési koncentrációt (y^*) egy empirikus egyenletből vagy a hozam görbék kezdeti meredekségéből becsültük.

A Sovová modell a dimenziómentes koncentráció (X) és hozam (Y) értékeket az alábbi egyenletekkel írja le, attól függően, hogy az extrakció melyik szakaszában vagyunk.

Az anyagmérleg alapján a koncentrációból az extrakciós görbe az alábbi egyenletekkel számolható:

$$X = 1 - Q\mathcal{G}\exp(-QZ) \quad \text{ha } \mathcal{G} < \frac{q}{Q} \quad (6)$$

$$X = 1 - q\exp[-Q(Z - Z_k)] \quad \text{ha } \frac{q}{Q} \leq \mathcal{G} < \mathcal{G}_k \text{ és } Z > Z_k \quad (7)$$

$$X = \left\{ 1 + \left[\frac{\exp\left(S\left[\mathcal{G} - \frac{q}{Q}\right]\right)}{1 - q}\right] \exp(-SZ) \right\}^{-1} \quad \text{ha } \mathcal{G} \geq \mathcal{G}_k \text{ vagy } \frac{q}{Q} \leq \mathcal{G} < \mathcal{G}_k \text{ és } Z \leq Z_k \quad (8)$$

$$\frac{Y}{x_0} = \mathcal{G}[1 - \exp(-Q)] \quad \text{ha } \mathcal{G} < \frac{q}{Q} \quad (9)$$

$$\frac{Y}{x_0} = \mathcal{G} - \frac{q}{Q}\exp[Q(Z_k - 1)] \quad \text{ha } \frac{q}{Q} \leq \mathcal{G} < \mathcal{G}_k \quad (10)$$

$$\frac{Y}{x_0} = 1 - \frac{1}{S} \ln \left\{ 1 + [\exp(S) - 1] \exp \left[S \left(\frac{q}{Q} - \mathcal{G} \right) \right] (1 - q) \right\} \quad \text{ha } \mathcal{G} \geq \mathcal{G}_k \quad (11)$$

Ahol \mathcal{G} a dimenziómentes idő, \mathcal{G}_k azt a dimenziómentes időpillanatot mutatja, amikor az oszlop teljes hosszában elfogy a felületről az oldható anyag, Z dimenziómentes helykoordináta Z_k az extraktorban lévő határvonalat jelenti, amely elválasztja a két különböző állapotban lévő extrakciós szakaszt (van oldhatóanyag a külső felületen, vagy kezdeti állapotban van).

$$Z_k = \frac{1}{S} \ln \left[1 + \frac{1}{q} \left\{ \exp \left[S \left(\mathcal{G} - \frac{q}{Q} \right) \right] - 1 \right\} \right] \quad (12)$$

$$\mathcal{G}_k = \frac{q}{Q} + \frac{1}{S} \ln \{ 1 - q[1 - \exp(S)] \} \quad (13)$$

$$\tau = \frac{m_s x_0}{\dot{m}_f y^*} \quad (14)$$

$$Q = \frac{m_s k_f a_p \rho_f}{\dot{m}_f (1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (15)$$

$$S = \frac{m_s k_s a_p x_0}{\dot{m}_f (1 - \varepsilon) y^*} \quad (16)$$

Ahol m_s a bemért szilárd száraz vázanyag mennyiségét, míg \dot{m}_f az oldószer térfogatáramát jelöli.

Számítógépes program segítségével (Visual Basic, Solver) a Sovová modellt illesztettük a kísérleti hozam és koncentráció értékekre.

A Sovová modell a Q , S , dimenziómentes modellparaméterektől, és a felületen lévő oldható anyaghányadtól (q) valamint a minimális extrakciós időtől (τ) függ. Az oldhatóság ismeretében a minimális extrakciós idő (τ) a fenti (14) képlettel számítható.

Ha becslést adunk a szén-dioxid fluid fázisban lévő anyagátadási tényezőjére (k_f), a Q dimenziómentes modellparaméter rögzíthető. Az anyagátadási tényezőt a fluid fázisban (k_f) a Sherwood összefüggés segítségével határoztuk meg, az alábbi módon:

Empirikus egyenletek segítségével meghatároztuk a Diffúziós tényezőt (D) (az extrakt jellemző molekuláira szén-dioxidban), a viszkozitást (η), valamint a sűrűséget a fluid fázisban (ρ_f). Ezen adatok ismeretében, a Sherwood összefüggést felhasználva az anyagátadási tényező számítható a fluid fázisban (k_f).

Sherwood összefüggés:

$$Sh = 0,135 Re^{0,5} Sc^{0,33} \quad (17)$$

Sherwood szám (Sh):

$$Sh = \frac{k_f \cdot d_{sv}}{D} \quad (18)$$

Reynolds szám (Re):

$$Re = \frac{u \cdot d_{sv} \cdot \rho_f}{\eta} \quad (19)$$

Scmidt szám (Sc):

$$Sc = \frac{\eta}{\rho_f \cdot D} \quad (20)$$

A maradék két paramétert (S , q) illesztendő paraméternek tekintettük. Az S modell paraméter ismeretében az anyagátadási tényező a szilárd fázisban (k_s) az alábbi képlettel számítható.

$$k_s = \frac{S \dot{m}_f (1 - \varepsilon) y^*}{m_s a_p x_0} \quad (21)$$

2.3.2. A laboratóriumi és félüzemi kísérleteken alapuló modell igazolása további kísérletekkel. A vázanyagban maradt oldható komponensek koncentrációjának meghatározása különböző extrakciós idők esetén (pl.: az oldható komponensek 25 %, 50 %, 75 %-ának extrakciója után). A vázanyagban maradt koncentráció görbék összevetése a modell paraméterek alapján számítottakkal.

Paprika és kukoricacsíra minta esetén, a laboratóriumi és félüzemi kísérleteken alapuló, szuperkritikus extrakció matematikai leírására alkalmas modellt további kísérletekkel is igazoltuk. A kísérletek során a töltetet, szűrővászonnal 10 egyenlő részre osztva, helyeztük el az extraktorban. Ezután eltérő extrakciós idő elteltével megszakítva az extrakciós kísérletet, elvégeztük a vázanyagban maradt oldható komponensek koncentrációjának meghatározását laboratóriumi Soxhlet-extrakcióval, *n*-hexán oldószert alkalmazva. Az ilyen kísérletek esetén a Sovová modell alkalmasságát és jó illeszkedését nem csak a hozam görbére, de a vázanyagban maradt olaj koncentrációprofiljának leírására is bizonyítottuk az

oldható komponensek kb. 25, 50 és 75%-ának extrakciója után. Ismereteink szerint a hozam és a maradék koncentrációprofil együttes leírását a szakirodalomban eddig még nem vizsgálták.

Paprika minta esetén a hozam mellett, analitikai módszereket (spektrofotometria, HPLC) alkalmazva, a maradék összes színezék, és összes kapszaicin tartalmát is meghatároztuk az extraktor magasság függvényében különböző extrakciós idő esetén. Az olaj, a kapszaicin és a színezék koncentráció lefutásában eltolódást tapasztaltunk melynek oka az egyes komponensek oldhatóság különbségből adódó versengéssel magyarázható.

A modell alkalmasságát növényi anyagok extrakcióján kívül, kémiai anyagok (enantiomerek) hordozóról történő extrakciójának leírására is bizonyítottuk.

2.3.3. Az összefüggések felkutatása a működési (nyomás, hőmérséklet, oldószer áram, extrakciós idő) és a modell paraméterek között.

Különböző növényeken vizsgáltuk az extrakciós körülmények (nyomás, oldószer áram, extrakciós idő, extraktor méret) hatását a Sovová modell paramétereire.

A nyomás vizsgálatát körömvirág mintán végeztük el, a nyomást 250 és 450 bar nyomás között változtatva. Azt tapasztaltuk, hogy 350 bar alatt a nyomás növekedésének jelentős hatása van a végső hozamra, míg 350 bar felett az extrakciós görbék között jelentős különbség nem volt tapasztalható. Általában elmondható, hogy a nyomás növekedésével az oldhatóság, és ebből adódóan ez extrakciós görbék kezdeti meredeksége nőtt. Az azonos extrakciós hatásfok eléréséhez szükséges extrakciós idő, a nyomás növekedésével enyhén csökkent.

Az oldószer áram hatását kukoricacsíra minta szuperkritikus extrakcióján vizsgáltuk. Az extrakciót 4, 7 és 11 kg/h oldószer (szén-dioxid) áram alkalmazása mellett végeztük el. Nagyobb oldószer áram alkalmazása mellett, a fluid fázisra jellemző anyagátadási tényező (k_f) értéke nagyobb volt, így azonos extrakciós hatásfok eléréséhez rövidebb extrakciós időszükséges.

Paprika extrakciója során méretnövelési kísérleteket végeztünk, hogy megállapítsuk, milyen hatással van az extrakciós méret a Sovová modell paramétereire. Azonos mintán, azonos extrakciós körülményeket alkalmazva végeztünk kísérleteket 5 és egy 80 dm³ extrakciós térfogatú készülékben. A paraméterek összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy a felületen lévő könnyen oldható anyaghányadra jellemző paraméter (q) az extraktor méret növekedésével csökkent. Mivel a kiindulási minta azonos volt, ez úgy értelmezhető, hogy a nagyobb extrakciós berendezésben, a töltet szerkezet miatt, a felületen lévő anyaghányadnak csak egy része könnyen hozzáférhető az oldószer számára (csatornák kialakulása). Ennek következményeként az extrakciós térfogat növekedése, rontja az extrakciós hatásfokot, azaz azonos hozam eléréséhez hosszabb ideig kell folytatni az extrakciót.

Paprika és kukoricacsíra mintát, azonos körülmények között, de eltérő ideig extraháltunk. Azt tapasztaltuk, hogy a modellparaméterek függetlenek az alkalmazott extrakciós időtől, azaz azonos modellparamétereket alkalmazva leírható a különböző ideig folytatott extrakció hozam görbéje, és az eltérő időpontokban megszakított extrakciós kísérletek koncentráció profilja az extraktor magasság függvényében egyaránt.

A 3. rész téma:

Cellulázok és kísérő enzimek hatásának kísérletes és matematikai tanulmányozása

Téma	Cellulázok és kísérő enzimek hatásának kísérletes és matematikai tanulmányozása
Kutatócsoport	Non-food Kutatócsoport, BME
Készítette	Réczey Istvánné, Dienes Dóra
Dátum	2008. június 30.

3.1 Feladatok

A „Cellulázok és kísérő enzimek hatásának kísérletes és matematikai tanulmányozása” résztémában a következő feladatok kerültek megvalósításra.

- **Potenciális nyersanyagok felmérése és összetételük meghatározása**
 - A magyarországi mezőgazdasági lignocellulóz melléktermékek technológiai potenciáljának felmérése.
 - Standard analitikai módszer kidolgozása a technológia szempontjából fontos biomassza-komponensek (cellulóz, hemicellulóz, lignin, hamu és extraktanyagok) meghatározására.
 - Potenciális lignocellulóz nyersanyagok összetételének meghatározása.
- **Nyersanyagok előkezelési lehetőségeinek vizsgálata**
 - Lignocellulóz nyersanyagok mikrobiológiai bonthatóságát javító egyes kémiai előkezelések nyersanyag összetételre gyakorolt hatásának vizsgálata celluláz termelésre alkalmas szénforrás előállítására céljából.
- **Celluláz enzim termelése előkezelt lignocellulóz szénforrásokon**
 - A fermentációs paraméterek enzimtermelésre gyakorolt hatásának vizsgálata rázatott lombikokban, ill. laboratóriumi fermentorban *Trichoderma reesei* Rut C30 fonalas gomba törzzsel végzett enzimfermentációkban.
 - Az előkezelt nyersanyagok összehasonlítása a celluláztermelés szempontjából.
- **Előállított cellulázok jellemzése**
 - Az előállított celluláz enzimek biokémiai vizsgálata. Összehasonlítás kereskedelmi forgalomban lévő celluláz enzimekkel specifikus aktivitásuk, komponens-összetételük, ill. adszorpciós tulajdonságaik alapján.
 - Az enzimek kinetikai vizsgálata.
- **Előkezelt lignocellulózok hidrolízise a termelt cellulázokkal**
 - A termelt enzimek hidrolízis kapacitásának vizsgálata az előkezelt lignocellulózokon kereskedelmi enzimekkel összehasonlítva.
 - Az adott szubsztrát hidrolizálhatóságának vizsgálata azonos szubsztráton fermentált és kereskedelmi enzimekkel.
- **Matematikai modell felállítása az enzimes hidrolízisre**
 - Az előkezelt lignocellulóz hidrolízisének modellezése.
 - A hiányzó modell paraméterek meghatározása nem-lineáris illesztéssel.
 - A modell validálása: a felírt modellel végzett becslések igazolása kísérleti úton.

3.2 Bevezető

Az alkoholok közül az etil-alkohol (etanol) motorikus célú felhasználása a világon sokfelé elterjedt. Az etil-alkohol előállítása nagy cukor- (cukorrépa, édescirok, melasz), keményítő- (burgonya, kukorica, rozs, búza, zab, rizs, árpa) vagy cellulóz tartalmú növényi biomasszából (fahulladék, gabonaszalma stb.) történhet fermentáció vagy hidrolízis és fermentáció kombinációja utáni folyamatos desztillációval. Bár a különböző eredetű irodalmak ellentmondásos adatokat tartalmaznak, hozzávetőlegesen cukorrépa-ból és cukorcirokból 3000-3500 l/ha, kukoricából 2000-2500 l/ha, burgonyából mintegy 2000 l/ha, kalászos gabonákból 1000-2000 l/ha alkohol állítható elő. Brazíliában a cukornádból, az USA-ban kukoricából állítanak elő igen nagy mennyiségben etanolt.

A második generációs bioetanol előállítás alapanyagai, a lignocellulózok komplex struktúrával rendelkeznek, több kémiaiilag eltérő komponensből épülnek fel. Az etanol előállítás potenciális nyersanyagai a poliszacharidok, melyek a lignocellulózok legfontosabb építőkövei. A cellulóz és a különféle hemicellulózok

a teljes lignocellulóz száraz tömegének 50-75%-át teszik ki. A harmadik fő komponens, a lignin nem poliszacharid makromolekula, mely étetéssel energiaforrásként hasznosítható. Az egyéb, kísérő komponensek az extraktanyagok, fehérjék, szervesetlen anyagok. A lignocellulózokban a vízdoldható komponensek és a keményítő mennyisége elhanyagolható.

Az egyes lignocellulóz nyersanyagok hasznosíthatóságának vizsgálatához szükséges azok kémiai összetételének meghatározása. A rutin elemzési módszer kifejlesztése során az alapul vett ún. Hågglund analízist (Klason lignin meghatározás) módosítottuk, nagyszámú minta elemzésére alkalmas mérést dolgoztunk ki.

A lignocellulóz biomasszában jelenlevő cellulóz konverziója mind kémiai, mind enzimes katalízis útján megvalósítható. Kísérleteink során az enzimes lebontást vizsgáltuk, melyet a komplex struktúra megbontása miatt egy előkezelési lépés kell, hogy megelőzzön. Az enzimes technológia egyik sarkallatos pontja az enzimtermelés optimalizálása, minél hatékonyabb celluláz/hemicelluláz komplex előállítás. Ez okból vizsgáltuk a különböző fermentációs paraméterek mellett, különböző előkezelt mezőgazdasági hulladék szénforrásokon termelt enzimek hidrolitikus hatékonyságát.

3.3 Anyagok és módszerek

3.3.1 Nyersanyagok

Hazánkban a megújuló növényi biomassza mennyisége szárazanyagban kifejezve a fő- és melléktermékekkel együtt 55-58 millió tonna. Energetikai célra - megfelelő körülmények között - 6-8 millió tonna szerves anyag lenne hasznosítható (minimálisan pedig 3-4 millió t) a 25-26 millió t mezőgazdasági, valamint 1-2 millió t erdőgazdasági melléktermékből.

Az üzemanyag-alkohol előállítására vonatkozó kísérleteinkben nagy mennyiségben keletkező mezőgazdasági lignocellulóz melléktermékek alkalmazhatóságát vizsgáltuk.

A 3.1 és 3.2 táblázatban Magyarországra vonatkozó irodalmi adatokat tüntettünk fel egységnyi termőterületről betakarítható biomassza és az évente termelődő mezőgazdasági melléktermékek mennyiségéről. A 3.3 táblázatban egyes gabonanövények bioetanol kihozatalára vonatkozó irodalmi adatok láthatók, melyek meglehetősen óvatos számítások eredményei, hiszen pl. kukorica esetén a feltüntetett üzemanyag hozam másfélszerese realisabb érték.

3.1. táblázat 1 hektár területről betakarítható biomassza [1]

Nyersanyag típusa	Éves biomassza-termelődés hektáronként t/év
Tülevelű fa	1,5 – 2,0
Lombhullató fa	2,5 – 3,0
Gabonaszalma	3,5 – 4,0
Len	2,5 – 3,0
Kender	6,0 - 8,0
Ipari fű	10,0 – 15,0

3.2. táblázat Magyarországi mezőgazdasági melléktermékek mennyisége [2]

Melléktermék	Éves biomassza-termelődés M t/év
Szalma (bálás)	4,5 - 7,5
Kukoricaszár	10,0 - 13,0
Kukorica csutka	1,0 - 1,2
Napraforgószár	0,4 - 1,0
Nyessedék venyige	1,0 - 1,5
Fa hulladék	1,0 - 1,5

3.3. táblázat Gabonanövények bioetanol kihozatala [3]

Alapanyag	Hozam, t/ha nyers		Üzemanyag hozam, l/ha
	szemtermés	teljes	
Búza	5	6,5	1767
Kukorica	7	17	2115

Kukoricaszár

Magyarország összes mezőgazdasági eredetű növényi biomassza produktumának több mint negyedrésze gabonaszalma és kukoricaszár. Utóbbi éves termelt mennyisége Magyarországon 10-13 millió t (a tarlón maradó levéllel, csuhéval, csutkával együtt), ez 2006-ban kb. 15-16 millió t volt (8,3 millió t kukoricatermés mellett), 2007-ben azonban 7-8 millió t (4,0 millió t szemtermés mellett) (3.1. ábra). A kukoricaszár elhelyezésének jelenleg legelterjedtebb módja a beszántás, mely a vetésterület kb. 90-95%-án történik. A beszántás szükségességét illetően ellentmondó álláspontok alakultak ki, egyes vélemények szerint e célra a kukoricaszár kb. 40%-a „hasznosítható”. Ez esetben a pentózhatás elkerülése érdekében a talajba nagy mennyiségű nitrogénműtrágyát is ki kell juttatni, ami jelentős mértékben növeli a költségeket.

A gabonaszalmák 15%-át, a kukoricaszár tömegének pedig még 10%-át sem (4-6%) hasznosítjuk takarmányozási célra. Az országos átlagként figyelembe vehető ha-ként 6 t betakarított kukorica-szemtermés esetén Magyarországon a visszamaradó növényi részek aránya és szárazanyagban kifejezett mennyisége tetemes (kb. 1,5-szerese, azaz kb. 9 t).

3.4. táblázat A kukoricaszem betakarítása után a tarlón maradó növényi szárazanyag [4]

Megnevezés	%
Szár + címer	33
Levél	31
Csuhé	14
Csutka	17
Szem	5

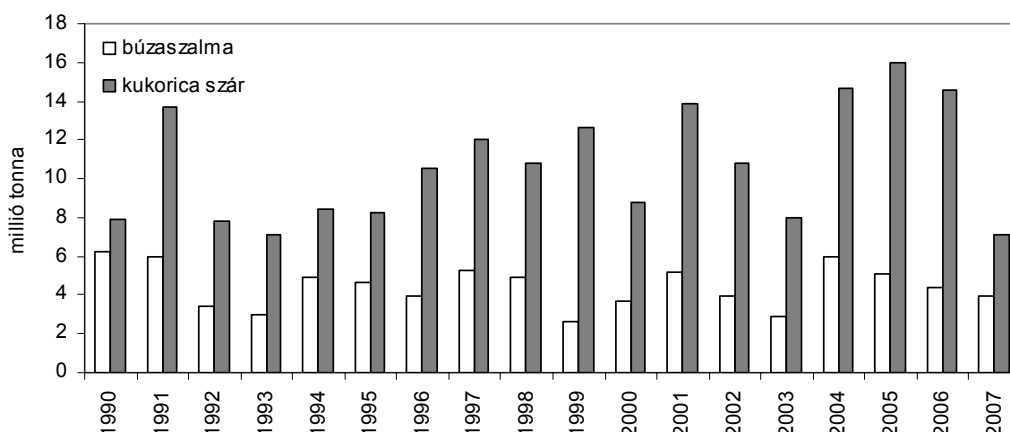
Búzaszalma

A szalma összetételére általában a sok rost, valamint a kevés fehérje-, zsír-, oldható szénhidrát- és ásványianyag-tartalom jellemző. Takarmányozásra a tavaszi gabonaszalmákat (zab-, tavaszi árpa-, köles-, tavaszi búzaszalma) használják fel, az őszieket túlnyomó arányban csak alomnak, mivel az őszi vetésű növények szalmáinak takarmányértéke kisebb, mint a tavasziaké.

Az őszelet vetett növények szalmájából legtöbbet tesz ki a búza (80%) és a rozs szalmája. A búzaszalma táplálóanyagainak emészthetősége elmarad a többi gabonaszalmától a nagy rosttartalma miatt, éves termelt mennyisége Magyarországon 2006-ban 4-4,5 millió t (4,4 millió t búza mellett), 2007-ben kb. 4 millió t (4,0 millió t szemtermés mellett) (3.1. ábra). A statisztikai adatok szerint a gazdaságok a szalmának csak kb. 60%-át takarítják be valamilyen formában, a többi beszántásra kerül, a tarlón elégetés ma már nem engedélyezett.

3.5. táblázat Gabonaszalmák éves hasznosítása [4]

	Búzaszalma		Árpastralma		Tavaszi szalmák		Összesen	
	ezer t	%	ezer t	%	ezer t	%	ezer t	%
Takarmányként	259	7	178	37	273	67	710	15
Alomként	3263	87	296	65	137	33	3696	80
Ipari felhasználás	234	6	1	-	-	-	235	5
Összesen	3756	100	475	100	410	100	4641	100



3.1. ábra Búzaszalma és kukoricaszár magyarországi éves termelődésének becsült mennyisége a KSH gabonatermés adatai alapján

Szeszgyári törköly

A szeszgyári törköly a gabona keményítőtartalmának élesztők és enzimek segítségével alkohollá és széndioxiddá történő fermentálása után visszamaradó anyag. Az alkoholt a fermentációs folyamat lefolyását követően desztillálással nyerik ki, a visszamaradó anyagot pedig szárítják. A gabonatorköly színe a világossárgától a sötétbarnaig változik. Ezt elsősorban az alapanyag fajtája, az alkalmazott technológia, illetve annak betartása befolyásolja. A sötétebb szín a szárítás során alkalmazott magas hőmérsékletre utal. A kukorica kb. 61% keményítőt, 3,8% olajat, 8% fehérjét, 11,2% rostot és 16% vizet tartalmaz. Az etanolgyártás során a keményítő etil-alkohollá alakul, a szemtermés többi alkotórésze pedig melléktermékként marad vissza. A gyártás során 1 t kukoricából megközelítőleg 0,3 t szárított gabonatorköly keletkezik.

3.3.2 Modell szubsztrátok

Solka Floc

A Solka Floc márkanévű kereskedelmi termék mechanikai kezelést követő extrakcióval részben hemicellulóz-, nagymértékben ligninmentesített, fehérített lucfenyő cellulóz. A kezelés lépései során a cellulóz is valamelyest degradálódik. Gyakran használják celluláz-termelésnél szénforrásként, adszorpciós és szinergizmus-vizsgálatoknál [5]. Cellulóz-tartalma 80-90% (CrI=kb. 0,7, DP=700-3000).

Avicel

Az adszorpciós kísérletekben tiszta cellulóz szubsztrátként Avicel PH 102 (cellulóz I polimorf) mikrokristályos cellulózt használtunk. Az Avicel kereskedelemben forgalmazott, savval részlegesen hidrolizált, semlegesített, mosott fa cellulóz [6]. A sav elsősorban az amorf régiókat hidrolizálja, ezért az Avicel egy megnövekedett kristályosságú cellulóz (CrI=0,5-0,8, DP=200-300).

3.3.3 Kereskedelmi enzimek

Celluclast 1.5 L

Trichoderma reesei eredetű celluláz enzimek készítmény (Novozymes AB, Dánia), mely a cellulóz lebomlását katalizálja, emellett viszkozitáscsökkentő hatása is van, cellulózt tartalmazó szubsztrátok esetén. 4-6 pH-tartományban illetve 40-55°C közötti hőmérséklet-tartományban használható. A készítménynek jelentős xilanáz és β -glükózidáz aktivitása is van.

Novozym 188

Aspergillus eredetű β -glükózidáz enzim (Novozymes AB, Dánia). Viszonylag tág pH és hőmérséklet-optimuma van, cellulóz hidrolízisekor keletkező cellobiózt bontja glükózzá.

3.3.4 Alkalmazott módszerek

Lignocellulóz nyersanyag összetételének vizsgálata savas hidrolízissel

A nyersanyag-összetétel vizsgálatát kukoricaszár nyersanyagra dolgoztuk ki.

A 3.6. táblázatban összefoglaltuk az eredeti (Hägglund [7]) és a módosított módszerben alkalmazott paramétereket. A két hidegen végzett hidrolízis-lépés helyett a hidrolízist egy lépésben végeztük a módosított módszerben, melynek időtartamát 0,5 és 4 óra között változtattuk. A forrón végzett hidrolízist 100°C helyett 121°C-on végeztük, a reakcióidőt 6 órától 1 órára csökkentve. Az alkalmazott 72%-os kénsav mennyiségét szintén változtattuk. A vizsgált minta mennyisége mind az eredeti, mind a módosított módszerben 1 g volt. A lignin mennyiségének meghatározása módosítás nélkül, gravimetriás úton történt. A lignin-tartalmat a hamutartalom mérése során kapott savban nem oldódó hamu-tartalommal korrigáltuk. Az analízist szárazanyag- és hamutartalom mérése előzte meg.

3.6. táblázat Lignocellulóz minták összetétel-vizsgálatának körülményei

Paraméter		Eredeti módszer	Módosított módszer
Analizált minta mennyisége		1 g	1 g
72% H ₂ SO ₄		10 ml	5 ml
Hideg hidrolízis 1	hőmérséklete	szobahőmérséklet	szobahőmérséklet
	időtartama	4 óra	2 óra
Hígítás 1 (hozzáadott desztillált víz mennyisége)		25 ml	145 ml
Hideg hidrolízis 2	hőmérséklete	szobahőmérséklet	-
	időtartama	8-10 óra	-
Hígítás 2 (hozzáadott desztillált víz mennyisége)		265 ml	-
Forró hidrolízis	hőmérséklete	100°C	121°C
	időtartama	6 óra	1 óra
Sav/minta aránya		10 ml/g	5 ml/g
Savkoncentráció a forró hidrolízisben		2,4%	2,4%

Folyadékkromatográfia (HPLC)

Az előkezelést, ill. a kezeletlen és az előkezelt lignocellulóz minták savas (nyersanyag-elemzés) és enzimés hidrolízisét követően a hidrolizátumok (felülúszók) cukor-tartalmának (hemicellulóz monomerek, cellulóz dimer és monomer) meghatározása HPLC-vel történt.

A folyadékkromatográfias elemzést megelőzően a folyadék mintákat 0,45 µm pórusméretű regenerált cellulóz szűrőn szűrtük (ProFill). A cellobióz, glükóz, xilóz és arabinóz koncentrációját Aminex HPX-87H⁺ (300x7,8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) kationcserélő oszlopon határoztuk meg, 65°C kolonna hőmérséklet és 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett, 5 mM H₂SO₄ eluenst alkalmazva. Az analitikai kolonna „védelmére” Cation-H (Bio-Rad) előtét-kolonnát alkalmaztunk. Az analitikai kolonnán elválasztott komponensek detektálása Shimadzu RID-10A törésmutató detektorral történt.

Lignocellulózok előkezelése

Az előkezelés célja a cellulóz-hemicellulóz-lignin struktúra megbontása, a cellulóz hozzáférhetővé tétele az enzimek/mikrobák számára, ezáltal az etanol-hozam növelése.

Az előkezelés lehet fizikai, kémiai, biológiai jellegű, vagy az előzők kombinációja. Az első lépés mindig egy mechanikai méret-csökkentés, melyet nem tekintünk előkezelésnek. Tipikus fizikai előkezelések, azaz aprító-zúzó műveletek a következők: száraz vagy nedves őrlés/csépelés, besugárzás, gőzrobbantás, hidrotermolízis. Különböző vegyszerekkel eltávolítható a hemicellulóz és/vagy a lignin, ezáltal megbontható a cellulóz-hemicellulóz-lignin komplex. E célból ásványi savak, lúgok vagy szerves oldószerek használhatók. A lignocellulóz ligninje biológiai úton is elbontható, pl. fehér korhadást okozó gombákkal, de a módszer időigényes és nem túl hatékony.

A fizikai és kémiai előkezelési technikák kombinálhatók, pl. a savas vagy lúgos katalizátorral végzett gőzzel történő előkezelés. A folyamatban a nyersanyagot a gőzzel történő kezelést megelőzően vegyszerben áztatják, ekkor a lignocellulóz megduzzad. A gőzrobbantás során a nyersanyagot nagy nyomású gőzzel érintkeztetik, ekkor megnő a nedvesség-tartalma, majd atmoszférikus nyomásra expandálta, mely folyamatban az anyag szerkezete megbomlik. Végül a lignocellulóz ragasztóanyaga, a hemicellulóz hidrolizálódik.

Az ún. nedves oxidációs eljárásban az előkezelés nagy nyomáson és magas hőmérsékleten, oxigén és víz jelenlétében történik. A folyamaton a cellulóz kristályos szerkezete megbomlik, a ligninből CO₂, víz és különböző mértékben oxidált szerves vegyületek, elsősorban kis molekulatömegű karboxil-savak keletkeznek. Ennél az előkezelésnél viszonylag kevés bomlási melléktermék (pl. furfurool, hidroximetil-furfurool) figyelhető meg.

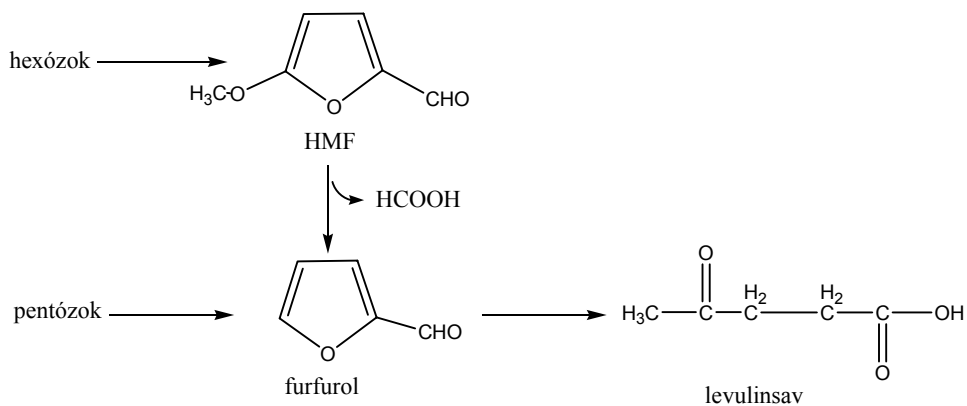
Az alacsonyabb hőfokon végzett ammóniás rost-robbantás során vízmentes ammónia az „oldószer”. A folyamatban a lignint éri támadás, itt a nyersanyag száraz marad. Ez az előkezelés elsősorban alacsony lignin-tartalmú mezőgazdasági hulladékok esetén hatásos.

Gőzrobbantás

Az egyik legjobban tanulmányozott hemicellulóz hidrolízisét célzó technika, melyet különböző lignocellulóz biomasszáknál esetén vizsgáltak, a gőzrobbantás katalitikus mennyiségű kéndioxid jelenlétében. A folyamatban a hemicellulóz hidrolizálódik, a cellulóz pedig hozzáférhetőbbé válik a későbbi enzim támadás során.

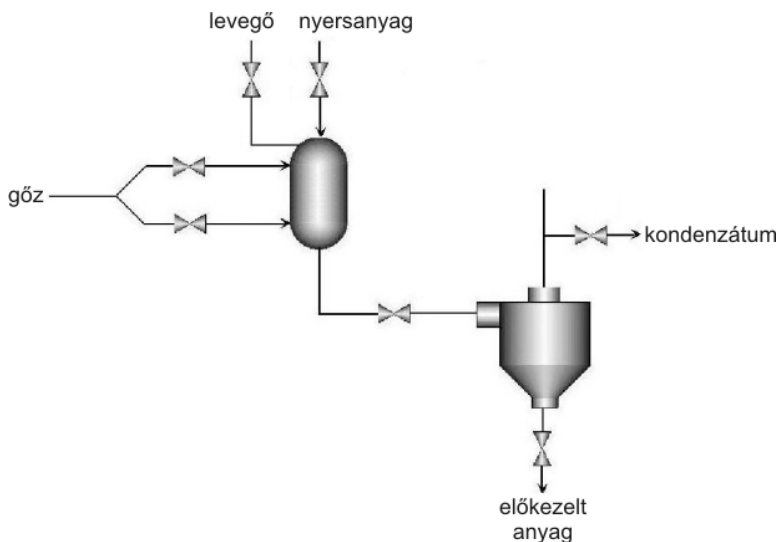
A gőzzel történő kezelés magas hőmérséklete a hemicellulózból felszabaduló cukor monomerek degradációját okozza, valamint részben a lignin is hidrolizálódik az alkalmazott extrém körülmények miatt.

Ezek a bomlástermékek gátló hatással bírnak a későbbi biológiai folyamatokra, azaz a hidrolízisre és a fermentációra. Az inhibitorok lehetnek i) furán származékok, ii) savak és iii) fenolos vegyületek. A furán származékok a hemicellulózok hődegradációjából keletkeznek. A pentózokból és hexózokból 5 és 6 szénatomszámú vegyületek keletkeznek, ilyen a furfurool és az 5-hidroxiimetyl-furfurool (HMF) (3.2. ábra). Az ecetsav és a hangyasav a hemicellulózok észter-kötéseinek felszakadásából keletkeznek. A levulinsav a furfurool hőbomlásából ered. Az inhiheáló melléktermékek harmadik csoportja a lignin bomlástermékeit tartalmazza.



3.2. ábra Cukrok termikus degradációja

A minták gőzrobbantásos előkezelését a Lundi Egyetemen (Vegyipari Műveletek Tanszék, Lund, Svédország) végeztük. Az előkezelő berendezés (3.3. ábra) egy 10 l-es reaktorból és egy ciklonból áll. A lignocellulóz minta a reaktorból a tartózkodási idő letelte után a számítógép által vezérelt alsó szelepen át távozik a ciklonba, itt összegyűlik az előkezelte anyag. Az 500-600 g áztatott nyersanyag (kb. 40% DM) gőzrobbantása a 3.7. táblázatban feltüntetett paraméterek mellett történt.



3.3. ábra Gőzrobbantó berendezés

3.7. táblázat Lignocellulózok gőzrobbantással történő előkezelésének körülményei

Paraméter	Kukoricaszár	Búzaszalma
Hőmérséklet, °C	190	190
Tartózkodási idő, perc	5	10
H ₂ SO ₄ /SO ₂ , %	0	0,2% H ₂ SO ₄

Celluláz enzim termelés

Az American Type Culture Collection-tól beszerzett *Trichoderma reesei* Rut C30 (ATCC#: 56765) liofilizált spórák fenntartása rendszeres áttöltéssel ferde agaron történt, mely a következő táptalaj-komponenseket tartalmazta: 20 g/l maláta extraktum, 5 g/l glükóz, 1 g/l proteóz pepton és 20 g/l bacto agar.

A kb. 14 napos tenyészetekről a spórákból 5 ml steril desztillált vízzel készült spórasuszpenziók 1-1 ml-ével steril körülmények között beoltva 150 ml-nyi inokulumokat (750 ml Erlenmeyer lombikokban) készítettünk. Az inokulumok táptalajának (módosított Mandel's összetétel szerint, pH 5,0-5,5-re állítva) összetétele a következő volt: 0,40 g/l karbamid, 1,87 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,67 g/l KH_2PO_4 , 0,53 g/l CaCl_2 , 0,81 g/l MgSO_4 , 0,33 g/l élesztő extrakt, 1,0 g/l proteóz pepton és 10 g/l laktóz, kiegészítve a következő nyomelemekkel: 6,6 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 26,7 mg/l CoCl_2 , 2,1 mg/l MnSO_4 , 1,9 mg/l ZnSO_4 . Az inokulum készítésének paraméterei: 28°C, 200 rpm, 3 nap.

A 150-150 ml térfogatú (750 ml Erlenmeyer lombikban, Mandel's táptalajon) rázatott lombikos fermentációkat 15-15 ml-nyi inokulummal oltottuk be. A fermentáció szénforrása 10 g/l szárazanyagnak megfelelő mosott előkezelt kukoricaszár, búzaszalma, valamint referenciaként 10 g/l Solka Floc 200 (ligninmentesített fenyő, International Fiber Corporation, USA) volt. A fermentációs tápközeg összetétele: a) módosított Mandel's ld. feljebb; b) szeszgyári törköly alapú tápközeg: 0,83 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,83 g/l KH_2PO_4 , 5,0 g/l törköly. A fermentáció során a pH adott értéken tartása ill. beállítása 0,1 M Tris-maleát puffer (pH 5,6) alkalmazásával, ill. 10% NaOH és 10% H_2SO_4 adagolásával történt (pH 5,6). A rázatott lombikos fermentációk paraméterei a következők voltak: 28°C, 200 rpm, 7 nap.

A felülúszó elválasztására a fermentleveket lecentrifugáltuk (5 perc, 9000 rpm). A felülúszókat vákuumbepárlással (60°C) koncentráltuk (kb. 10x), majd az enzim mintákat felhasználás előtt fagyaszóban tároltuk.

Cellulázok jellemzése

Összfehérje-tartalom és enzim aktivitás

Az összfehérje-tartalom és enzimaktivitás mérések 3 ismétléssel történtek, a mért értékekből számított adatok szórása 5% alatt, a fajlagos enzimaktivitás értéke 10% alatt volt.

Az összfehérje-tartalom mérése Coomassie reagenssel történt [8]. A meghatározás során 0,25 ml megfelelően hígított enzimdát (kereskedelmi enzimmészítmény, ill. fermentlevek felülúszói) és a mintához adagolt 2,75 ml Coomassie Brilliant Blue G250 reagensoldat elegyének 10 perces színreakcióját (szobahőmérséklet) fényelnyelés-mérés követte. A fotometráls 595 nm-en, enzimdát helyett desztillált vizet tartalmazó referencia mintával szemben történt. A kalibrációs diagram bovin szérum albumin (BSA) standarddal készült.

Az enzimaktivitás kifejezésére használt enzimegység (az angol kifejezéssel unit, U) μmol -nyi reakciótermék keletkezését jelöli 1 perc reakcióidő alatt.

A teljes celluláz aktivitást szűrőpapír szubsztráton DNS (dinitrosalicic acid) reagenssel mértük, az eredményeket FPU (filter paper unit) egységben adtuk meg [9-11]. A teljes celluláz komplex hidrolitikus potenciálját jellemző szűrőpapír-bontó aktivitás (FPA) meghatározása során 1,5 ml megfelelően hígított, pufferolt (pH 4,8) enzimdát és 50 mg (1x6 cm) Whatman No. 1 szűrőpapír 60 perces 50°C-on történő inkubálását követően az enzimreakció leállítása 3,0 ml DNS (dinitro-szalicilsav) oldat hozzáadásával történt. A reakciótermék (redukáló véget tartalmazó hidrolízis-termék) mennyiségének meghatározását redukáló cukor tartalom mérésével végeztük.

Az endoglukanáz aktivitást jellemző CMC-áz (karboxi-metil-cellulóz-bontó) aktivitás meghatározása során 1,0 ml megfelelően hígított, pufferolt enzimdát és 0,5 ml 1%-os CMC oldat összekeverését 30 perces inkubálás követte (a vizsgálat hőfokán), majd az enzimreakció leállítása 3,0 ml DNS (dinitro-szalicilsav) oldat hozzáadásával történt. A reakciótermék (redukáló véget tartalmazó hidrolízis-termék) mennyiségének meghatározását redukáló cukor tartalom mérésével végeztük.

A xilánáz aktivitást Bailey módszerét [12] módosítva nyírfá xilán szubsztráttal mértük. A meghatározás során 0,5 ml 1%(w/V) xilán (pH 5,3) szubsztrát oldathoz 0,4 ml pH 5,3 puffert pipettáztunk, ezt 2 percig 50°C-on termosztáltuk. Hozzáadtunk 0,1 ml megfelelően hígított enzimdátot. Ezután a reakcióelegyet 10 percig 50°C-on termosztáltuk. A reakciót 1,5 ml DNS oldat hozzáadásával állítottuk le. A kémcsöveket 5 percre forró vízbe helyeztük, majd szobahőmérsékletre lehűtött minták fényelnyelését 550 nm-en szubsztrát vakkal szemben mértük.

A β -glükózidáz (BGL) aktivitás mérése pNPG (p-nitrofenil- β -D-glükopiranozid) szubsztrát analógon történt, standardként pNP-t (p-nitrofenol) használva. Az aktivitás mérése során 1,0 ml 5 mM pNPG reagens oldatot (pH 4,8-as 0,05 M citrát vagy acetát pufferben) kémcsőbe pipettáztunk, majd 50°C-os vízfürdőbe helyeztük kb. 2 percre (előtermosztálás). A reagenshez 0,1 ml pufferben (0,05 M citrát vagy acetát, pH 4,8) megfelelően hígított enzim oldatot pipettáztunk, majd 10 percig inkubáltuk a reakcióelegyet. Az enzimreakciót 2,0 ml 1 M Na₂CO₃ oldattal állítottuk le, 10 ml desztillált vízzel hígítva, összerázva, 400 nm-en szubsztrát vakkal szemben mértük az abszorbanciát.

Gélelektroforézis

A gélelektroforézis (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) vizsgálatokat 12% Bis-Tris előgyártott (pre-cast gels, Invitrogen) géleken végeztük (NuPAGE Bis-Tris Electrophoresis system, Invitrogen). A gélek festéséhez kolloid Coomassie festéket használtunk [13]. A gélek kiértékelése AlphaEaseFC programmal történt.

Enzimes hidrolízis

A vizsgált szubsztrátok enzimes hidrolízise 5x50 ml teljes térfogatban, csavaros üvegekben, 2% szárazanyag-tartalom mellett, 50°C-on, pH 4,8-on (0,05 M acetát puffer), folyamatos keverés mellett (mágniskeverő) történt.

Az alkalmazott enzim dózis 10, 20, 30 FPU/g sz.a. celluláz és 10, 20, 30 BGL U/g sz.a. β -glükózidáz volt.

A hidrolízisben felhasznált enzim kereskedelmi celluláz, ill. β -glükózidáz (Celluclast 1.5L FG és Novozym 188, Novozymes, Denmark), valamint SolkaFloc (ligninmentesített fenyő) és az adott előkezelt lignocellulóz szubsztráton *T. reesei* Rut C30 törzssel előállított fermenté volt.

A hidrolízis 0., 6., 24., 48., 72. órájában vett minták felülűszoját centrifugálással (9000 rpm, 10 perc) választottuk el a hidrolízis szilárd maradékától.

A hidrolízis lefutását DNS reagenssel, redukáló cukor méréssel követtük nyomon. A reakció során keletkezett egyes hidrolízis-termékek mennyiségét HPLC-vel határoztuk meg.

Enzimadszorpció

A cellulázok adszorpcióját modell és lignocellulóz szubsztrátokon a centrifugált hidrolizátum-felülűszoából vizsgáltuk összehasonlítva az abból mérhető és a bevitt teljes enzimaktivitásokat.

Mivel az alkalmazott enzimaktivitás méréseket zavarja a hidrolízis során keletkező cukrok „hátere”, a felülűszoakat első lépésben cukor-mentesítettük. A hidrolizátumban levő cukor oligomerek és monomerek eltávolítását ultraszűrővel végeztük (Ultrafree centrifugal filter unit, 10 kDa polysulfone membrane, Millipore). A felülűszo minták 4 ml-ét 0,5 ml-re koncentráltuk, majd pufferrel (0,05 M acetát puffer, pH 4,8) az eredeti térfogatra egészítettük ki (a mennyiségi eltéréseket tömegmérés alapján számítva). Három “mosási ciklus” után a permeátban már nem volt jelen DNS módszerrel mérhető redukáló cukor.

A cukormentesített felülűszo teljes celluláz (FPA), CMC-áz, β -glükózidáz aktivitását, ill. fehérje-tartalmát a hidrolízisben alkalmazott enzim dózisnak megfelelő hígítású enzim adataival hasonlítottuk össze, a kettő hányadosából számítva az adszorpció mértékét.

Enzimkinetikai vizsgálatok

A β -glükózidázok (cellobiázok) kinetikai konstansainak meghatározásánál megfelelő mennyiségű enzimet és szubsztrátot (cellobiáz) 0,05 M pH 4,8 acetát pufferben 50°C-on termosztáltunk. A kísérleteket különböző kezdeti cellobiáz koncentrációkkal végeztük. A termékátlás vizsgálatok különböző mennyiségű glükózt adagoltunk a reakcióelegyhez. A 10 perces reakcióban termelődött termék (glükóz) mennyiségét a reakció leállítására (a reakcióelegy 5 percre forrásban levő vízbe helyezésével) után enzimatis klorimetriás módszerrel (GOD-POD) határoztuk meg. A kísérleteket 3-3 párhuzamos méréssel végeztük.

Az enzimes hidrolízis modellezése

A szakaszos enzimes hidrolízisek modellezésére Zacchi és mtsi [14] által használt modellt kibővítve alkalmaztuk. Zacchi és mtsi 95%-os cellulóztartalmú –tisza cellulóznak tekintett– előkezelt fűzfa Celluclast 2L és Novozym 188 (Novo Industries A/S, Denmark) enzimek 1:1 arányú elegyével végzett hidrolízisek leírására folyamatos rendszernél illesztéssel meghatározott paraméterek felhasználásával szakaszos rendszert modelleztünk, melyben a modelltől kapott eredmények jó egyezést mutatnak a kísérlet során kapottakkal. Felállítottunk egy olyan modellt, mely alkalmas a cellulóz hidrolízis leírására mind folytonos, mind szakaszos rendszernél, figyelembe véve a termék-inhibíciót és az enzim dózist. Az általuk

meghatározott modell paraméterek adott szubsztrát – szubsztrátkoncentráció – enzimkeverék hármásra vonatkoznak.

Az általunk kibővített modellt két különböző előkezelt (gőzrobbantott) szubsztrát -melyek a cellulóz mellett jelentős mennyiségű egyéb komponenst (például lignint) is tartalmaztak- szakaszos hidrolízisére különböző enzim- és szubsztrát-koncentrációk mellett vizsgáltuk.

Matematikai modell

A modell az enzimes hidrolízist egy lépéses reakciónak tekinti, melyben a cellulóz glükózzá alakul.

$$\frac{dC}{dt} = - \frac{E}{(1 + k_1 \cdot S)} \cdot (k_2 - k_3 \cdot S) \cdot C^{k_4}$$

A cellulóz-koncentráció (C) időbeli változását négyparaméteres egyenlettel írja le, melyben szerepel az enzim- (E) és a termék-koncentráció (S) is. A paraméterek nem rendelkeznek fizikai jelentéssel, illetéssel határozhatóak meg a kísérleti adatokból.

Szakaszos hidrolízis esetén a termék- (S) és a szubsztrát-koncentráció (C) között az alábbi összefüggés írható fel:

$$S = C_0 - C$$

ahol C_0 a kiindulási cellulóz-koncentráció glükóz ekvivalensben (C is glükóz ekvivalensben szerepel).

A modelleget kísérleti pontokra történő illesztéséhez a Berkeley Madonna™ 8.3.9 (Berkeley Madonna Inc., Berkeley, CA) programot használtuk, mely differenciálegyenletek numerikus megoldására képes. A megoldások meghatározásához az Euler-módszert választottuk. A kezdeti érték feltételünk a következő volt (kivéve változó szubsztrátkoncentráció esetén, ahol módosítottuk): $C(0) = C_0$

3.4 Eredmények, értékelés

3.4.1 Lignocellulóz nyersanyagok összetétele

A 4.1. táblázatban a fermentációs szénforrásként tesztelt kontroll (SolkaFloc), ill. mezőgazdasági és ipari lignocellulóz melléktermékek, valamint a tápközeg-komponensként felhasznált szeszgyári törköly összetétel adatai találhatóak.

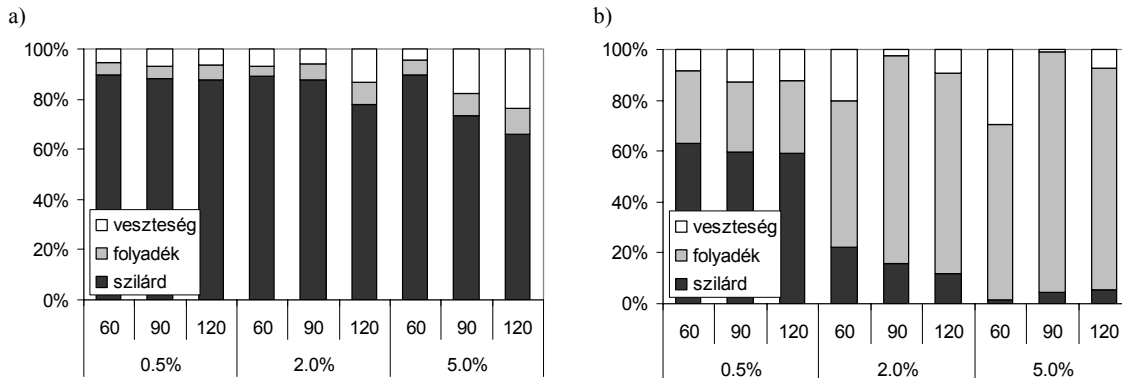
4.1. táblázat Fermentációs nyersanyagok összetétele

	Solka Floc	Kukoricaszár		Búzaszalma		Törköly
		nyersanyag	előkezelt	nyersanyag	előkezelt	
Cellulóz, sz.a.%	78,8	36,7	41,6	36,5	47,7	33,0
Hemicellulóz, sz.a.%	14,2	27,7	16,7	27,3	11,1	20,8
Keményítő, sz.a.%	-	-	-	-	-	3,2
Lignin, sz.a.%	0,6	20,6	23,9	23,4	28,5	13,5
Hamu, sz.a.%	0,9	3,6	11,8	2,5	1,7	3,6

3.4.2 Lignocellulóz nyersanyagok előkezelése

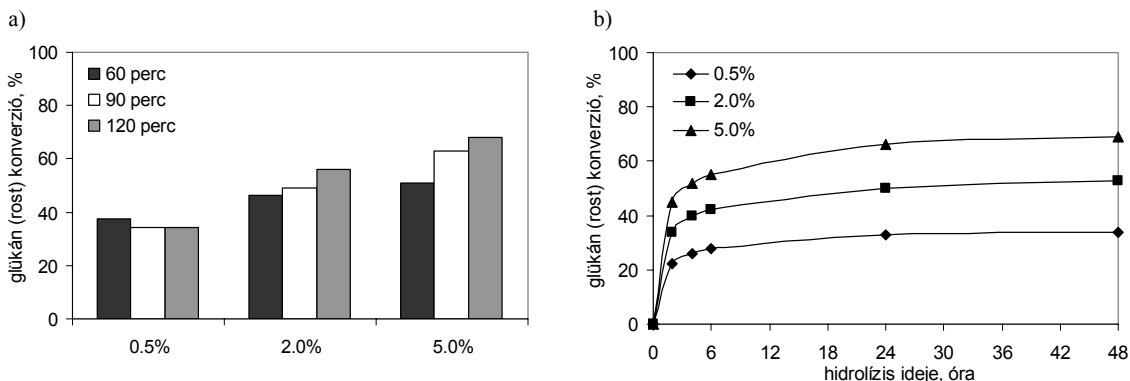
Híg savas előkezelés

A híg kénsavas előkezelés körülményeinek hatását kukoricaszár szubsztráton a hexóz és pentóz anyagmértégre valamint a hidrolízisben elért konverzió mértékére a 4.1 és 4.2 ábra mutatja [15].



4.1 ábra Kukoricaszár híg savas előkezelésének a) hexóz, b) pentóz anyagmértéke különböző paraméterek mellett: 0,5%, 2,0%, 5,0% savkoncentráció; 60, 90, 120 perc időtartam.

A kénsavval végzett híg savas előkezelések 0,5; 2,0 és 5,0% kénsavval, 10% sz.a. tartalom mellett, 1000 ml-es csavaros üvegben, 120°C-on (autokláv) 60, 90 és 120 perc tartózkodási idővel történtek. Az előkezelést szűrés (folyadék és szilárd frakció elválasztása), majd a szilárd frakció desztillát vizes mosása követte.



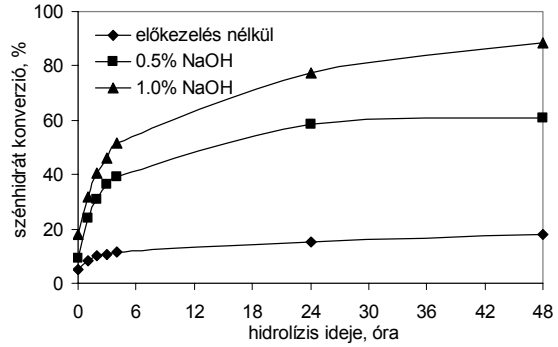
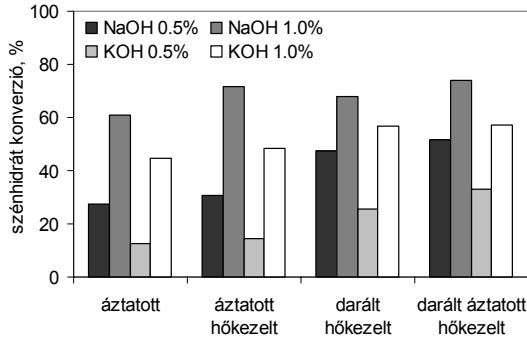
4.2 ábra Híg savval előkezelt kukoricaszár szubsztrát hidrolízise kereskedelmi cellulázzal (3% sz.a. tartalom, 15 FPU/g sz.a. és 15 BGL U/g sz.a. enzimdózis, 0,5 M acetát puffer pH 4,8). a) Különböző koncentrációjú (0,5%, 2,0%, 5,0%) savas előkezelés után elért konverzió. b) 120 perces előkezelés utáni hidrolízisek lefutása

A kezeletlen szubsztrát azonos körülmények között végrehajtott hidrolízisében elért 19,8%-os konverzió az előkezelés kénsav koncentrációjától és idejétől függő mértékben nőtt. A legjobb konverzió a vizsgált legnagyobb savkoncentrációnál és tartózkodási időnél volt tapasztalható (közel 70%). Azonban a savkoncentráció és a tartózkodási idő növelésével az előkezelés során egyre nagyobb hányad glükán bomlik le, 5,0% és 120 perc mellett az eredeti nyersanyag 43% glükán-tartalma 28%-ra csökkent.

Lúgos előkezelés

A lúgos előkezelés hatását búzaszalma szubsztráton vizsgáltuk. A különféle bázisok (NaOH, KOH) hatásának tesztelése mellett vizsgáltuk a hőkezelés (autoklávban 121°C-on 1 órán át), az azt megelőző 5 napos áztatás, ill. a száraz, aprított (3-4 cm) nyersanyag szemcseméret-csökkentésének (darálás) hatását.

a) b)

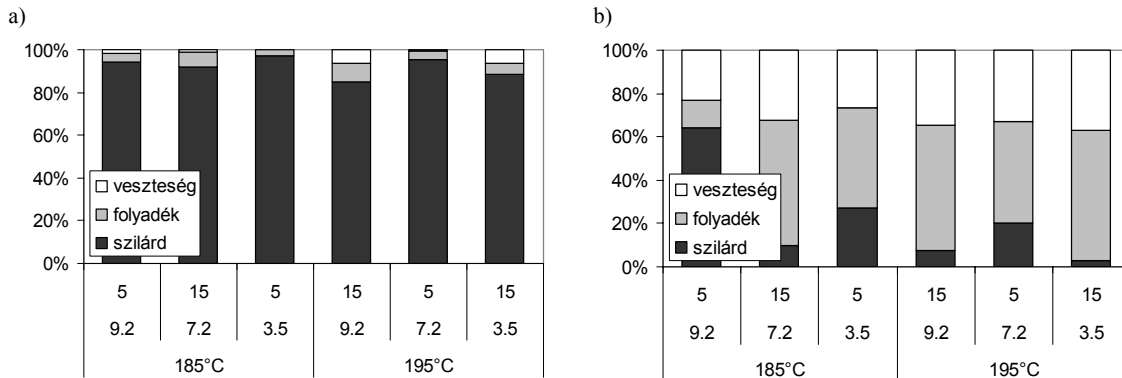


4.3 ábra Lúggal előkezelt búzaszalma szubsztrát hidrolízise kereskedelmi cellulázzal (5% sz.a. tartalom, 20 FPU/g sz.a. és 20 BGL U/g sz.a. enzimdózis, 50°C, 0,05 M citrát puffer pH 4,8). a) Különböző előkezelési paraméterek (áztatás, hőkezelés, darálás) mellett elért 48 órás konverziók. b) kezeletlen, 0,5%-os és 1%-os NaOH-dal előkezelt búzaszalma hidrolízisének lefutása.

A kezeletlen búzaszalma enzimes hidrolízise csupán 12,8%-os szénhidrát konverziót eredményezett. A különböző lúgos előkezelések nagyban növelték a szubsztrát bonthatóságát, legjobb konverziókat a darált, áztatott és hőkezelt mintákon érték el. A vizsgált beállítások minden esetben az 1%-os NaOH-dal eredményezték a legnagyobb enzimes bonthatóságot, azonban meg kell jegyezni, hogy környezeti szempontból a KOH használata előnyösebb.

Nedves oxidáció

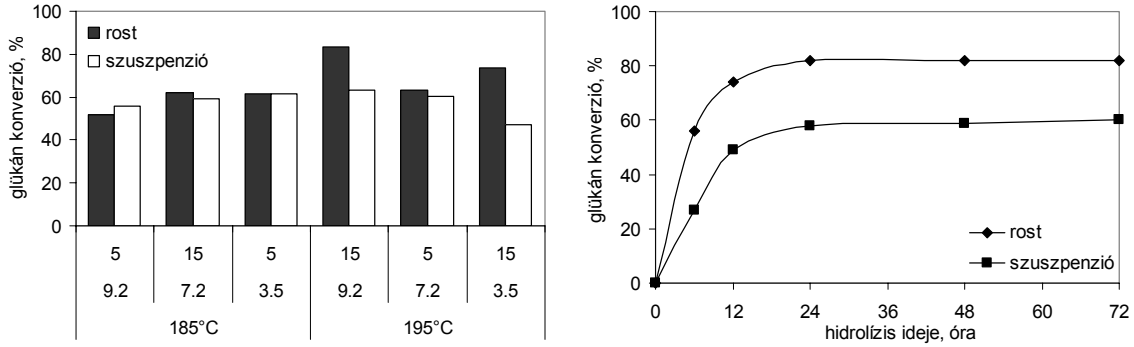
Kukoricaszár szubsztrát esetén a nedves oxidációval végzett előkezelés körülményeinek hatását a hexóz és pentóz anyagmértégre, valamint a hidrolízisben elért konverzió mértékére a 4.4 és 4.5 ábra mutatja [16].



4.4 ábra Kukoricaszár nedves oxidatív előkezelésének a) hexóz, b) pentóz anyagmértégre különböző paraméterek mellett: 185 és 195°C hőmérséklet; lúgos (9,2), semleges (7,2) és savas (3,5) pH; 5 és 15 perc időtartam.

a)

b)

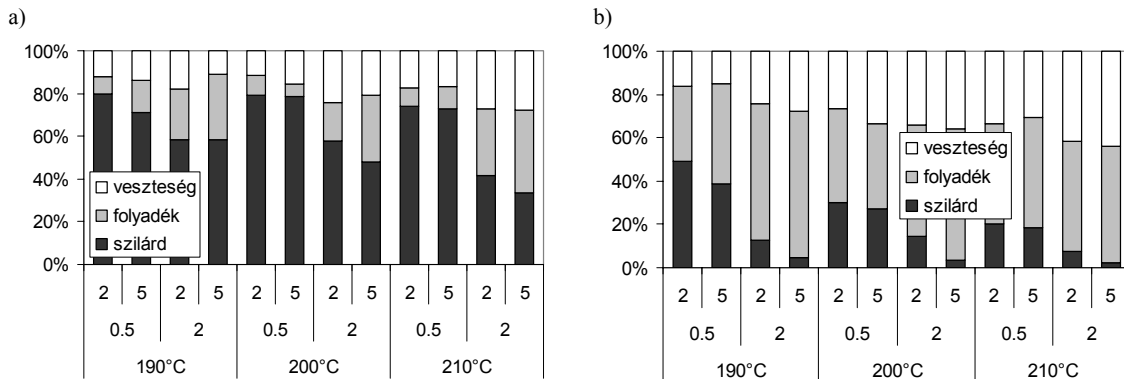


4.5 ábra Nedves oxidációval előkezelt kukoricaszár szubsztrát (szűrt, mosott rost és szuszpenzió) hidrolízise kereskedelmi cellulázzal (2% sz.a. tartalom, 25 FPU/g sz.a. és 25 BGL U/g sz.a. enzimdózis, 50°C, 0,2 M citrát puffer pH 4,8). a) Különböző előkezelési paraméterek (idő, pH, hőmérséklet) mellett elért 24 órás konverziók. b) 15 perc, pH 9,2, 195°C-es előkezelés utáni hidrolízisek lefutása

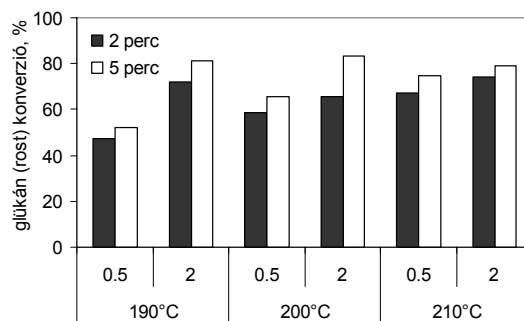
A hat vizsgált előkezelési beállításból a legjobbnak a 15 perc, pH 9,2, 195°C-es előkezelés bizonyult: a kezeletlen szubsztráthoz képest 4-szeres cellulóz konverzió a hidrolízisben. Az ezen paraméterekkel végzett előkezélést követő 24 órás hidrolízisekben az enzimdózsist 5-ről 25 FPU/g sz.a.-ra növelve a cellulóz konverzió szűrt, mosott rost esetén 71%-ról 83%-ra növekedett.

Gőzrobbantás

Kukoricaszár szubsztrát esetén a gőzrobbantással végzett előkezelés körülményeinek hatását a hexóz és pentóz anyagmérlegre, valamint a hidrolízisben elért konverzió mértékére a 4.6 és 4.7 ábra mutatja [17].



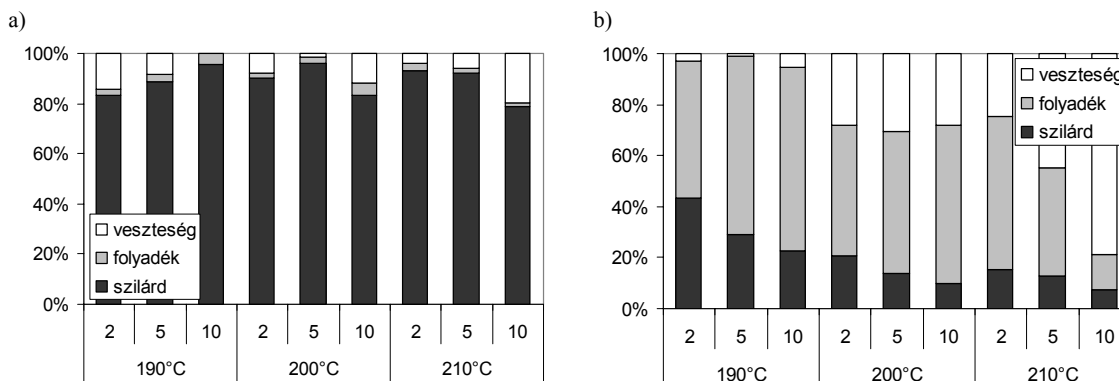
4.6 ábra Kukoricaszár gőzrobbantással végzett előkezelésének a) hexóz, b) pentóz anyagmérlege különböző paraméterek mellett: 190, 200 és 210°C hőmérséklet; 0,5 és 2,0% savkoncentráció; 2 és 5 perc időtartam.



4.7 ábra Gőzrobbantással előkezelt kukoricaszár szubsztrát (szűrt, mosott rost) hidrolízise kereskedelmi cellulázzal (5% sz.a. tartalom, 25 FPU/g sz.a. és 25 BGL U/g sz.a. enzimdózis, 50°C, 0,5 M acetát puffer pH 4,8). Különböző előkezelési paraméterek (2 és 5 perc időtartam, 0,5 és 2% savkoncentráció, 190, 200 és 210°C hőmérséklet) mellett elért 48 órás konverziók.

Búzaszalma szubsztrát gőzrobbantással végzett előkezelés hexóz és pentóz anyagmértékét különböző paraméterek mellett a 4.8 ábra mutatja [18].

Az általunk hidrolízis kísérletekben alkalmazott búzaszalma előkezelése gőzrobbantással történt előző kísérletekben optimalizált paraméterek mellett: 190°C, 5 perc.



4.8 ábra Búzaszalma gőzrobbantással végzett előkezelésének a) hexóz, b) pentóz anyagmértéke különböző paraméterek mellett: 190, 200 és 210°C hőmérséklet; 2, 5 és 10 perc időtartam (0,2% savkoncentráció).

3.4.3 Celluláz enzim termelés *T. reesei* Rut C30 törzssel

Fermentációs paraméterek hatása

Fermentáció különböző szénforrásokon és tápközegben

A termelt enzimek hozamait, ill. összetételét *T. reesei* Rut C30 rázatott lombikos fermentációkban kereskedelemben kapható ligninmentesített cellulózon, ill. előkezelt lignocellulóz szénforrásokon vizsgáltuk.

Felhasznált szénforrások és rövidítéseik:

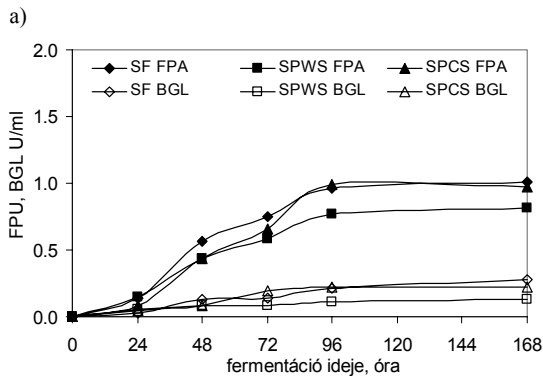
- ligninmentesített fenyő: Solka Floc (SF),
- gőzrobbantással előkezelt búzaszalma (SPWS),
- gőzrobbantással előkezelt kukoricaszár (SPCS).

Az alkalmazott tápközégek:

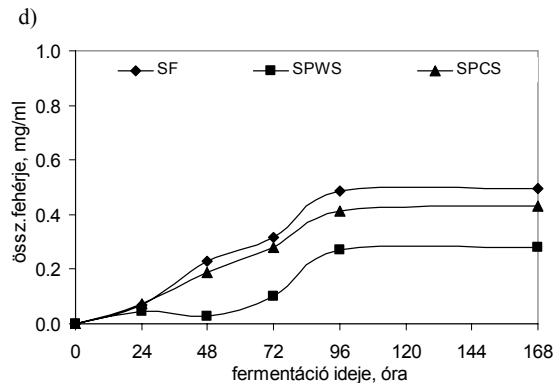
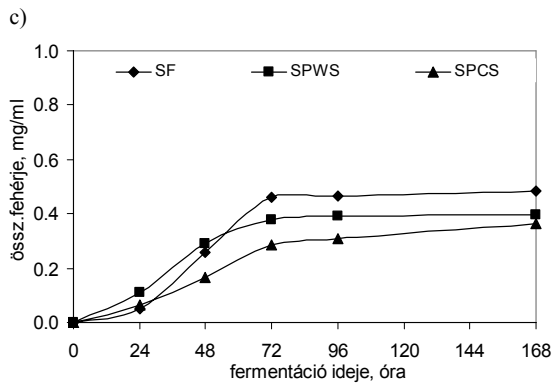
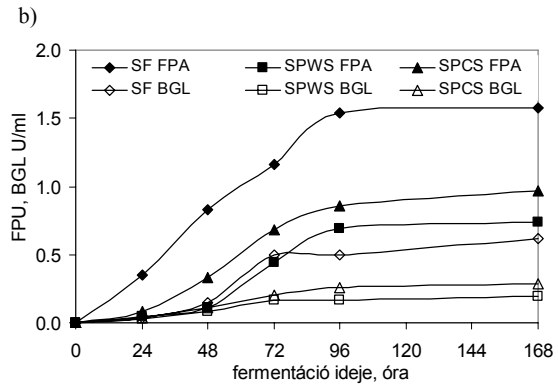
- az un. Mandel's összetétel (sók, nyomelemek),
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tal és KH_2PO_4 -tal kiegészített 5 g/l törköly.

A vizsgált szénforrások közül jellemzően Solka Floc, azaz ligninmentes fenyő szubsztráton értünk el magasabb térfogati teljes celluláz (1,01 és 1,58 FPU/ml), ill. β -glükozidáz (0,28 és 0,62 BGL U/ml) enzimaktivitásokat (4.9 ábra). A Solka Floc-on elérhető képest a lignocellulóz szénforrást tartalmazó Mandel's tápközegen 81% (SPWS) és 96% (SPCS) FP aktivitást, ill. 46% (SPWS) és 79% (SPCS) β -glükozidáz; törköly-tartalmú tápközegen pedig 47% (SPWS) és 62% (SPCS) FP aktivitást, ill. 31% (SPWS) és 45% (SPCS) β -glükozidáz térfogati aktivitást mértünk. A fermentált teljes fehérje-tartalma is eltérő, elsősorban a különböző szénforrásokon, értéke 0,28 és 0,50 mg/ml között mozgott.

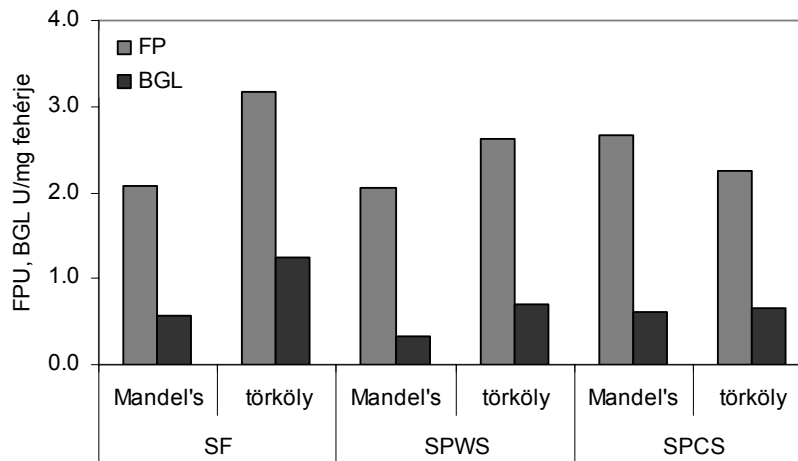
Mandel's



törköly alapú



4.9. ábra *T. reesei* Rut C30 rázatott lombikos fermentációkban Mandel's és törköly alapú tápközegen elért a)-b) térfogati celluláz aktivitások (FPA, β -glükozidáz) és c)-d) össz.fehérje-koncentrációk



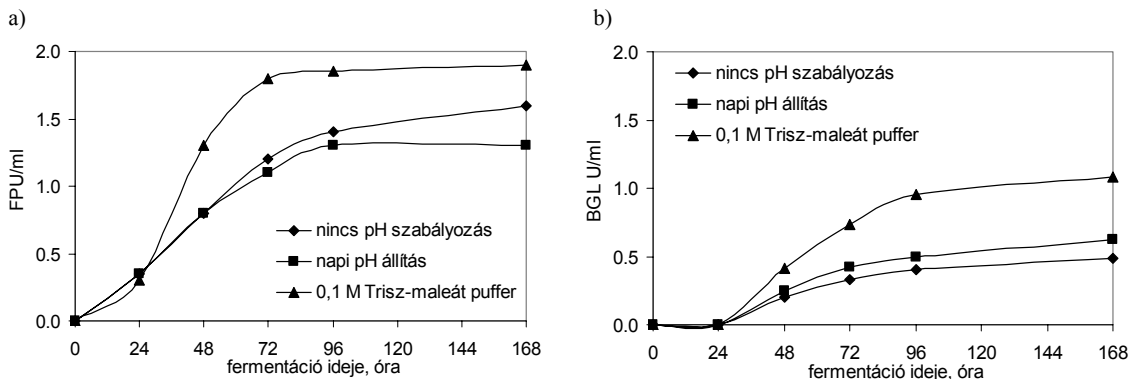
4.10 ábra *T. reesei* Rut C30 rázatott lombikos fermentációkban Mandel's és törköly alapú tápközegen elért fajlagos celluláz (FPA, β -glükozidáz) aktivitások

A különböző szénforráson és tápközeg-összetétel mellett elért fajlagos enzimaktivitások (4.10 ábra) közül legnagyobb értékeket SF szénforráson, törköly-alapú tápközegben mértük (az ábrán a 2. oszlop-pár). Bár ehhez képest alulmaradnak, az előkezelt lignocellulóz szénforrásokon (SPWS, SPCS) mért értékek megközelítik, sőt meg is haladják a referenciának tekinthető SF szénforrással Mandel's tápközegben elért (1. oszlop-pár) fajlagos celluláz aktivitásokat.

pH

A pH lefutásának hatását a következő fermentációs beállítások mellett vizsgáltuk:

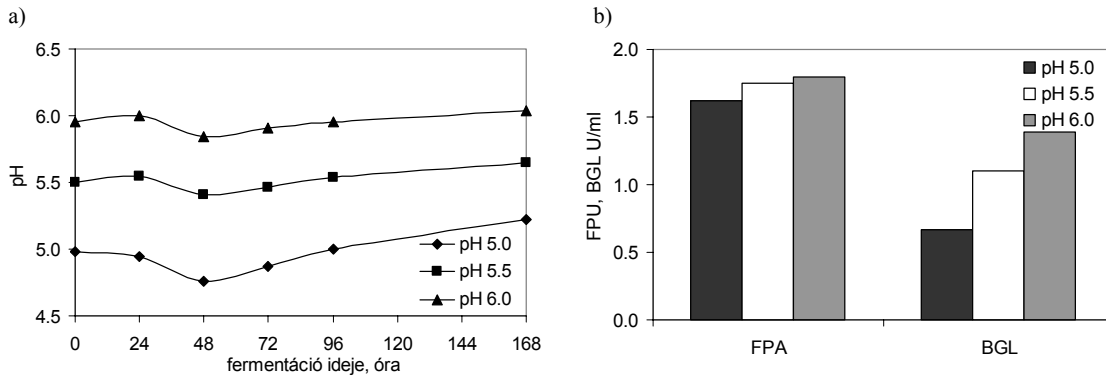
- pH szabályozás nélkül (a közeg lesavanyodott az 1-2. napon pH 3,0 körüli értékre),
- napi pH állítással 10% NaOH-dal, ill. H₂SO₄-val (fűrészfog jellegű pH-profil),
- 0,1 M trisz-maleát pufferrel konstans pH-t tartva (max. \pm pH 0,2 ingadozás).



4.11 ábra *T. reesei* Rut C30 rázatott lombikos fermentációkban 10 g/l SF szénforráson Mandel's tápközegen elért térfogati celluláz aktivitások (a) FPA, b) β -glükózidáz) kiindulási pH 5,6 mellett pH szabályozás nélkül, napi pH állítással, ill. pufferolt tápközegben.

Az elért enzimaktivitások azt mutatják, hogy pH szabályozás nélkül és napi pH állítással hasonló térfogati aktivitások érhetőek el (1,3-1,6 FPU/ml, 0,5-0,6 BGL U/ml), míg 0,1 M trisz-maleát pufferrel lényegesen jobb aktivitásokat (1,9 FPU/ml ill. 1,1 BGL U/ml) tapasztaltunk. A pufferolt tápközeg eredményei FP aktivitásban 20%-kal, BGL aktivitás tekintetében pedig 120%-kal haladták meg a pH állítás nélküli kísérletekben mért értékeket.

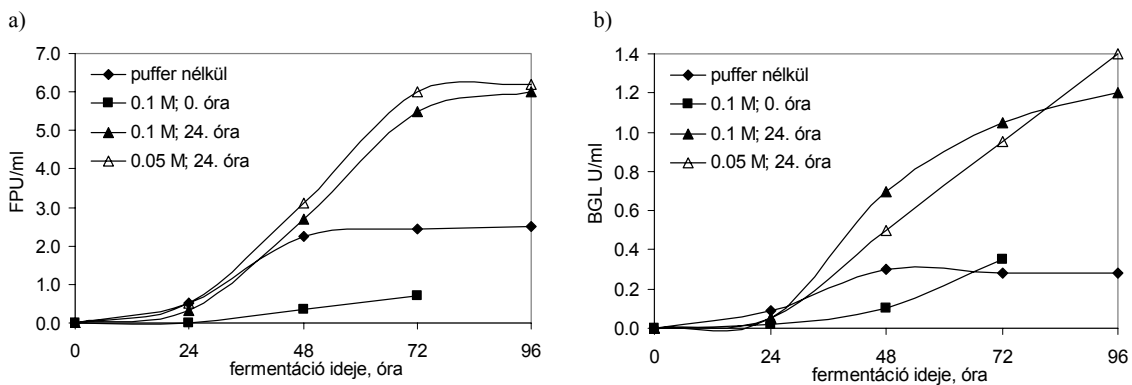
A fermentációs közeg pH-jának hatását a térfogati aktivitásokra pH 5,0; 5,5 és 6,0 értéken vizsgáltuk 10 g/l előkezelt kukoricaszár (SPCS) szénforráson, törköly-alapú, 0,1 M trisz-maleát pufferes táptalajon (4.12 ábra). A közeg pH-jának pH 5,0-ról pH 6,0-ra történő emelése a teljes celluláz aktivitást mutató FP aktivitásra csak kis mértékben hatott (kb. 10%-os növekedés), ezzel szemben kétszeres térfogati β -glükózidáz aktivitást eredményezett.



4.12 ábra *T. reesei* Rut C30 rázatott lombikos fermentációkban 10 g/l SPCS szénforráson törköly-alapú, 0,1 M trisz-maleát pufferes táptalajon a) mért napi pH értékek és b) elért térfogati celluláz aktivitások (FPA, β -glükozidáz) különböző pH értékeknél.

A rázatott lombikos kísérletek azt mutatták, hogy 0,1 M trisz-maleát pufferrel jobb enzimaktivitások érhetők el, mint pH szabályozás nélkül, ill. napi pH-állítással. Laboratóriumi fermentoros kísérletekben megvizsgáltuk a puffer-adagolás idejének ill. a puffer koncentrációjának hatását.

Kísérleti körülmények: 3 napos inokulum laktózon, Mandel's táptalaj, beoltáshoz 10 V/V%; 30 l-es laborfermentor 20 l munkatérfogattal (B-Braun Biostat C-DCU); 28°C; 60 g/l SF szénforrás; törköly-alapú tápközeg; pH 5,8 szabályozás: automatikus (10% NH_4OH -dal és H_3PO_4 -val), trisz-maleát pufferrel; a telítési oldott oxigén szint (DO) kaszkád rendszerben automatikusan 30%-ra szabályozva a légáram (1-12 l/min) és keverés (300-650 rpm) segítségével.

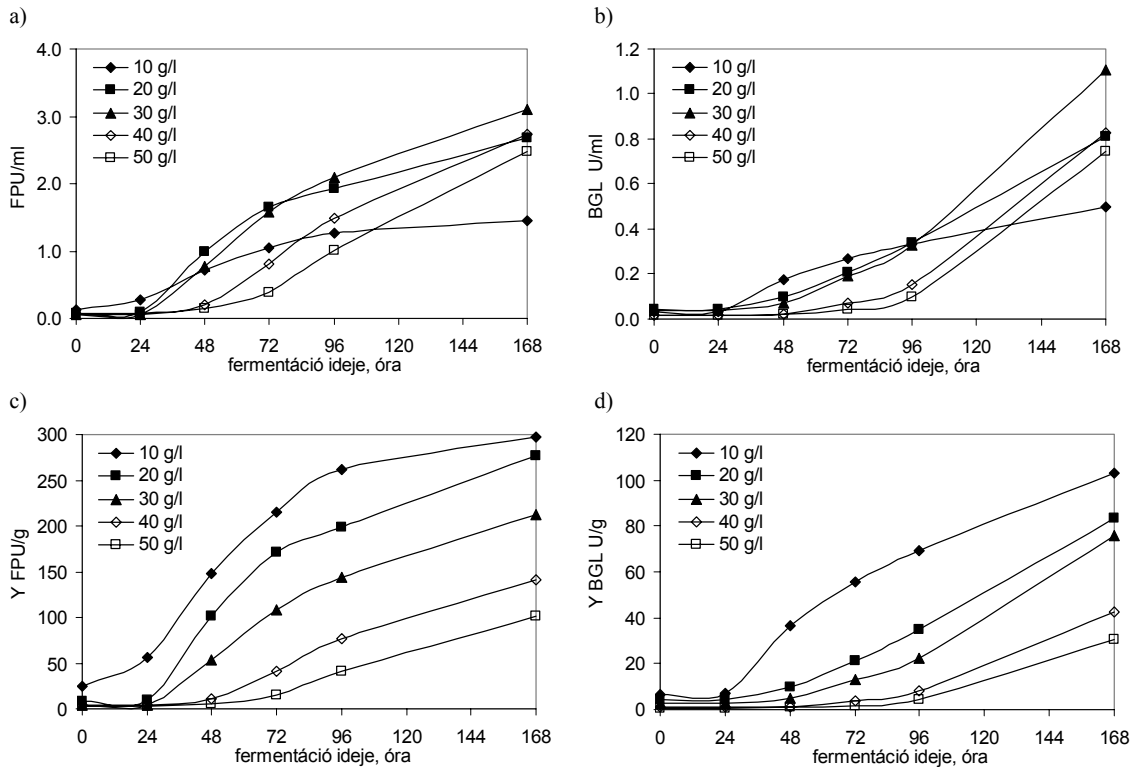


4.13 ábra *T. reesei* Rut C30 laboratóriumi fermentoros tenyésztésben 60 g/l SF szénforráson, törköly-alapú táptalajon mért térfogati celluláz aktivitások (a) FPA, b) BGL), pH 5,8 folyamatos pH-állítással (puffer nélkül), 0,05 M és 0,1 M trisz-maleát pufferes közegben a puffer 0. és 24. órában történő adagolása mellett.

A fermentoros kísérletekben a késleltetett puffer adagolás (a lag szakasz végén) jobb eredményeket hozott, mint amikor a tápközeg már a fermentáció elején is tartalmazott puffert. A 24. órában történő puffer-adagolás hatására a teljes celluláz aktivitás (FPA) a 2,5-3,0-szorosára, míg a β -glükozidáz aktivitás (BGL) 3,5-4,0-szeresére nőtt. A puffert 0,05 M, ill. 0,1 M koncentrációban alkalmazva nem tapasztaltunk jelentős eltérést az elért térfogati aktivitásokban, bár a hígabb puffer valamivel nagyobb aktivitásértékeket eredményezett.

C-forrás koncentrációja

A fermentációs szénforrás koncentrációjának hatását a térfogati aktivitásokra rázatott lombikos fermentációkban 10, 20, 30, 40, 50 g/l sz.a. értékeken vizsgáltuk előkezelt kukoricaszár (SPCS) szénforráson.



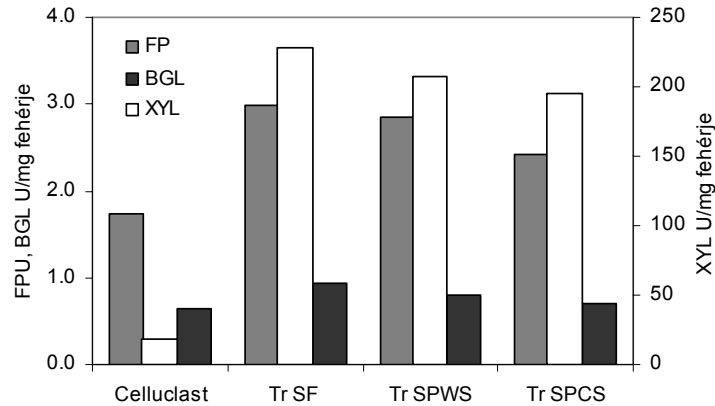
4.14 ábra *T. reesei* Rut C30 rázatott lombikos fermentációkban különböző SPCS szénforrás koncentrációk mellett elért térfogati celluláz aktivitások (a) FPA, b) β -glükozidáz) és aktivitás hozamok (c) Y FPU, d) Y BGL)

A legjobb térfogati celluláz aktivitásokat (FPA, BGL) 30 g/l sz.a. szénforrás koncentráció mellett értük el, ennél nagyobb szárazanyag mellett már nem nőtt, hanem csökkent a mért aktivitások értéke. Az aktivitás hozamok a szénforrás koncentrációjának növelésével jelentősen csökkentek, a szárazanyag-tartalom 5-szörös növelése mellett az aktivitás hozam értéke a harmadára esett le.

3.4.4 Előállított cellulázok jellemzése

Specifikus aktivitások

A hidrolízis kísérletekben alkalmazott cellulázok előállítására *T. reesei* Rut C30 törzset használtunk, a fermentációkat törköly-alapú tápközegben végeztük. Az elért fajlagos celluláz és hemicelluláz enzimaktivitásokat a 4.15 ábra mutatja, ahol összehasonlításként egy kereskedelmi *Trichoderma* celluláz készítmény, a Celluclast 1.5L FG (Novozymes) adatait is feltüntettük. Utóbbi kereskedelmi cellulázt alkalmaztuk referenciaként a lignocellulóz szubsztrátok hidrolízisének is.



4.15 ábra Kereskedelmi (Celluclast) és *T. reesei*/Rut C30 törzssel SolkaFloc (Tr SF), valamint gőzrobbantott búzaszalmán (Tr SPWS), ill. kukoricaszáron (Tr SPCS) fermentált, koncentrált enzimek fajlagos celluláz (FP), β -glükózidáz (BGL) és xilanáz (XYL) aktivitásai (U/mg fehérje)

A kereskedelmi enzimhez (Celluclast) képest 1,5-2-szeres celluláz (FP) és β -glükózidáz (BGL) fajlagos aktivitást értünk el mind ligninmentesített fenyőn (SF), mind előkezelt búzaszalmán (SPWS) és kukoricaszáron (SPCS). A fajlagos xilanáz aktivitások ennél jóval jelentősebb pozitív eltérést mutatnak, 10-13-szor nagyobb aktivitások voltak mérhetőek a lignocellulóz szénforrásokon. A saját fermentálású enzimek fajlagos aktivitásértékei hasonlóak, közülük Solka Floc (SF) szubsztráton értük el a legnagyobb fajlagos celluláz és xilanáz aktivitást.

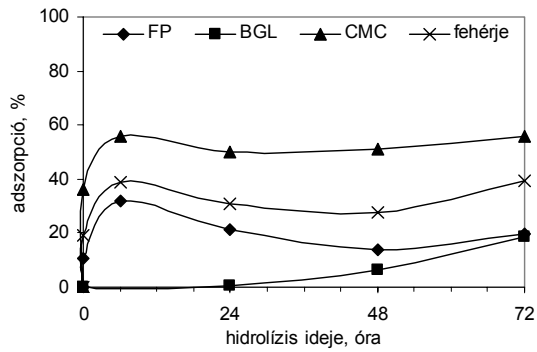
Enzimadszorpció

Kereskedelmi celluláz enzimek készítmény (Celluclast) és előkezelt lignocellulóz szénforráson *T. reesei* Rut C30 törzssel fermentált cellulázok (SPWS és SPCS szénforráson) adszorpcióját vizsgáltuk a lignocellulóz szubsztrát 72 órás hidrolízise alatt (mintavétel a 0., 6., 24. 48. 72. órában). A különböző cellulázok kötődésének mértékét Avicel (tiszt cellulóz), SPWS és SPCS szubsztráton vizsgáltuk.

A membránszűréssel cukormentesített felülúszókat teljes celluláz (FPA), endoglukanáz (CMC-áz), ill. β -glükózidáz (BGL) aktivitással jellemeztük, ezek értékéből számítottuk az adszorpció mértékét (4.16 ábra). Mivel nemcsak a szubsztrátra való kötődés, hanem az esetleges inaktiválódás is csökkenést okoz a felülúszóból mérhető aktivitásban, az enzimek adszorpcióját a különböző időpontban vett, koncentrált minták össz.fehérje-tartalmának mérésével, ill. gélelektroforézis képének elemzésével (AlphaEase program) is nyomon követtük (4.17 ábra).

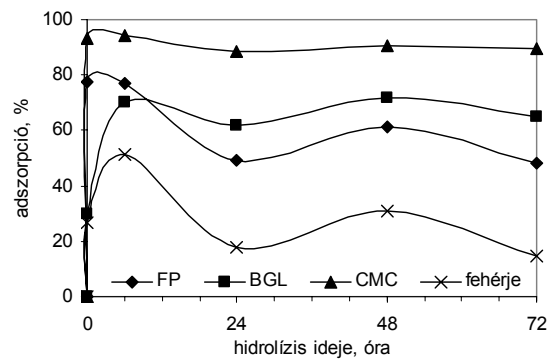
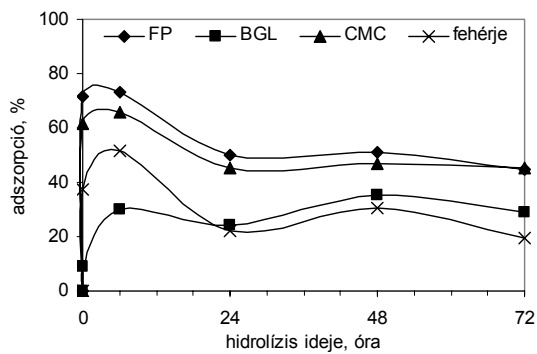
A kereskedelmi celluláz (Celluclast) tiszt cellulóz (Avicel), gőzrobbantással előkezelt búzaszalma (SPWS) és kukoricaszár (SPCS) szubsztráton is kb. 20-60%-os adszorpciót/inaktiválódást mutatott. Ezzel szemben a SPWS-en fermentált celluláz SPWS szubsztráton, ill. a SPCS-en fermentált enzim SPCS szubsztráton kb. 60-90%-os kötődését/inaktiválódását mértük. Az egyes celluláz komponensek közül jellemzően az endoglukanázok nagyobb, míg a β -glükózidázok kisebb mértékben inaktiválódtak, ill. adszorbeálódtak a szubsztráton.

a)
I.

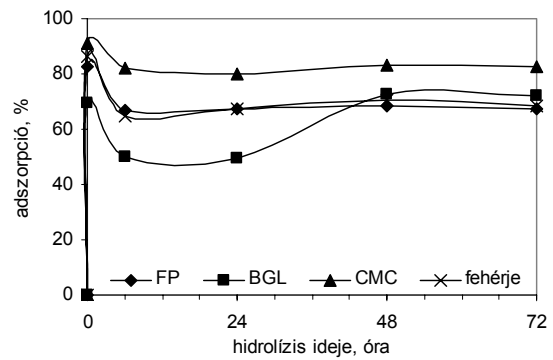
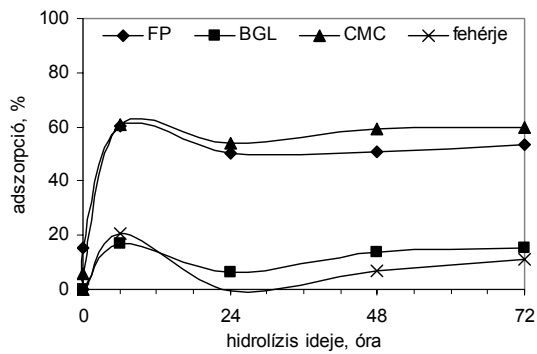


b)

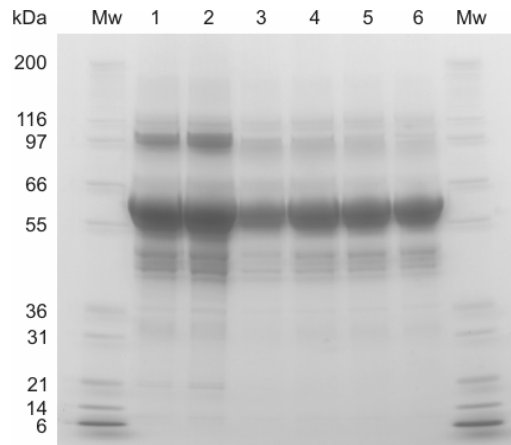
II.



III.



4.16 ábra a) Kereskedelmi, b) *T. reesei* Rut C30 fermentlé celluláz adszorpciója (ill. inaktiválódása) I. tiszta cellulóz (Avicel), II. SPWS, III. SPCS szubsztráton a felülúszók FPA (teljes celluláz), BGL (β -glükozidáz), CMC (endoglükánáz) aktivitásából, valamint össz.fehérje-tartalmából számítva.



4.17 ábra a) Kereskedelmi celluláz adszorpciója tiszta cellulóz (Avicel) szubsztráton. Minták a gélen: 1) eredeti enzim referencia, 2) 0 óras, 3) 6 óras, 4) 24 óras, 5) 48 óras, 6) 72 óras minta; Mw: molekulatömeg markerek.

Enzimek kinetikai vizsgálata

A kísérletekben alkalmazott enzimek összehasonlításának egyik módja a kinetikai konstansok meghatározása. A celluláz enzimrendszeren belül a β -glükózidáz komponens, azaz a cellobiózt glükózzá bontó enzimet vizsgáltuk. A β -glükózidáz vagy másnéven cellobiáz komponens kiválasztásának gyakorlati szempontjai a következők voltak: i) az enzim nem szilárd, hanem vízoldható szubsztráton aktív, tehát működése egyszerű Michaelis-Menten kinetikával leírható, melyben a legfontosabb paraméterek a k_3 ($r_{\max} = k_3 \times E_0$) és a K_m ; ii) a cellobiáz a cellobióz lebontásával fontos szerepet játszik a cellulóz hidrolízisében, csökkentve a többi cellulázkomponensre ható cellobióz inhibíciót; iii) a termék (ez esetben glükóz) inhibíció kompetitív modellel leírható.

A kísérletekben felhasznált kereskedelmi enzimek (Novozymes) közül a Celluclast 1.5L *Trichoderma* eredetű cellulázt, míg a Novozym 188 *Aspergillus* eredetű β -glükózidázt tartalmaz. Az irodalomból tudható, hogy az *Aspergillus niger* β -glükózidázára a termékinhibíció mellett a szubsztrátgátlás is jellemző. Utóbbi *Trichoderma reesei* esetében nem jellemző, bár k_3 és K_m értéke változhat a szubsztrát koncentrációval.

A felhasznált egyenletek a következők:

$$\frac{r}{E_0} = \frac{k_3 \times S}{K_m \times \left(1 + \frac{G}{K_I}\right) + S} \quad \text{1. egyenlet}$$

$$\frac{r}{E_0} = \frac{k_3 \times S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_S}} \quad \text{2. egyenlet}$$

Az 1. egyenlet a glükóz inhibíciót (K_I) írja le megfelelően alacsony cellobióz koncentrációnál, míg a 2. egyenletet a szubsztrát gátlás követésénél alkalmaztuk (*Aspergillus* eredetű β -glükózidáz esetén) alacsony termék koncentrációnál.

β -glükózidáz szubsztrát inhibíciója

Mint ahogy azt a 3.4.5 fejezetben ismertettük, a β -glükózidáz aktivitását pNPG (p-nitrofenil- β -D-glükopiranozid) szubsztráton mérjük. A β -glükózidáz aktivitását különböző szubsztrát koncentrációknál először ezen a szubsztrátanalógon vizsgáltuk az alkalmazott két kereskedelmi, valamint saját fermentálású *Trichoderma* celluláz esetében. A szubsztrátgátlás vizsgálatának eredményeit a szintetikus szubsztráton Novozym 188 (*Aspergillus* eredetű β -glükózidáz), valamint Celluclast 1.5L és *T. reesei* Rut C30 fermentlé (*Trichoderma* eredetű β -glükózidázok) esetén a 4.18 ábra I., II., és III. a) diagramjai mutatják.

A következő mérések során az enzimes hidrolízis reakciósebességét (a termék glükóz termelődését jellemző sebesség fele) vizsgáltuk a kezdeti cellobióz koncentráció függvényében. A β -glükózidáz „valódi”

szubsztrátján, cellobiózon mért aktivitások S koncentráció függését mutatják a 4.18 ábra I. és II. b) diagramjai.

Mint ahogy az feljebb említésre került, az *Aspergillus* β -glükózidázra szubsztrát inhibíció jellemző, ez pNPG és cellobióz szubsztráton is tapasztalható (Novozym 188, 4.18 ábra I.a) és I. b) diagramok) kb. 2,5 és 13 mM szubsztrát koncentráció felett. Ez a szubsztrát koncentráció felső határa a reakcióparaméterek (k_3 , K_m , K_i) meghatározásánál.

A *Trichoderma* eredetű β -glükózidázoknál nem tapasztalható szubsztrátgátlás, mint az Celluclast 1.5L és *T. reesei* Rut C30 fermentlé (*Trichoderma* eredetű β -glükózidázok) esetén pNPG és cellobióz szubsztráton is látható a 4.18 ábra II. a) és b), ill. III. a) diagramokon.

A Celluclast 1.5L kereskedelmi enzim *Trichoderma* β -glükózidáza esetében a fajlagos reakciósebesség, azaz tulajdonképpen egyfajta aktivitás növekedést mutat a cellobióz koncentráció növelésével. A reakciósebesség görbéje azonban kb. 27 mM cellobióz koncentráció alatt és felett két szakaszra bontható, eltérő cellobiózhoz való affinitást mutatva (4.18 ábra II. b) diagram). Ebből adódóan a cellobióz hidrolízisének katalízise két-két különböző kinetikai paraméterrel jellemezhető a két tartományban. Bár a 9-10 g/l feletti cellobióz koncentráció valószínűtlenül magas lignocellulóz szubsztrátok hidrolízise során, a kinetikai paramétereket ebben a tartományban is meghatároztuk.

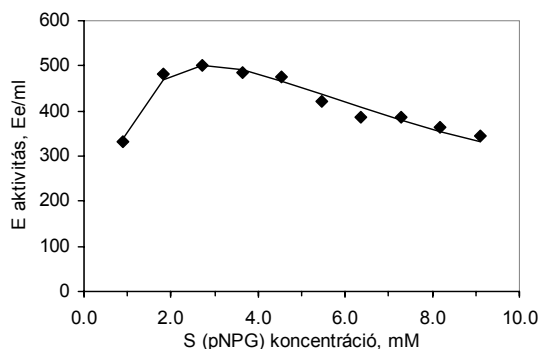
β -glükózidáz termék inhibíciója

Novozym 188 *Aspergillus* eredetű β -glükózidáz esetében a görbe maximumáig, azaz 13 mM-os kezdeti cellobióz szubsztrát koncentráció eléréséig nincs szubsztrát gátlás, így a termék, azaz glükóz gátlás zavarás nélkül vizsgálható.

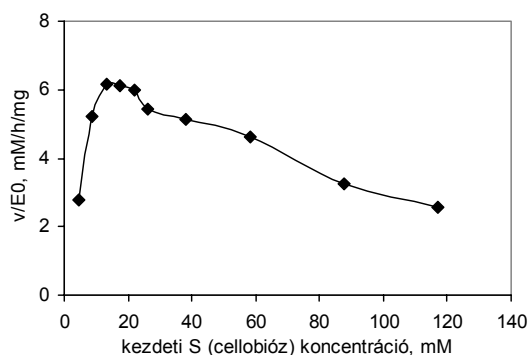
Az eredményeket kiértékelése Lineweaver-Burk linearizálási módszerrel történt. A reakció paraméterek (k_3 , K_m , K_i) meghatározása során a következő lépéseket követtük:

- A reakciósebesség mérése különböző glükóz és cellobióz koncentrációknál. Novozym 188 esetében a S koncentrációja 13 mM alatt, míg Celluclast esetében 27 mM alatt és felett vizsgálva.
- Az E_0/v értékek ábrázolása $1/S$ függvényében, ahol S a kezdeti szubsztrát koncentrációt jelöli. A különböző glükóz koncentrációkhoz tartozó egyenesek, melyek meredeksége függ a kiindulási glükóz koncentrációtól, közös metszéspontot adnak az y tengelyen.
- A mért adatokhoz illesztett egyenes paramétereinek (meredekség, tengelymetszet) meghatározása.
- Az egyenesek y tengelymetszete megadja $1/k_3$ értékét.
- Az egyenesek meredekségét a glükóz koncentráció függvényében ábrázolva a kapott egyenes y tengelymetszete K_m/k_3 , melyből az előző lépésben meghatározott k_3 értékének segítségével K_m számolható. Az illesztett egyenes meredeksége $K_m/(K_i \times k_3)$, melyből k_3 és K_m ismeretében K_i számolható.

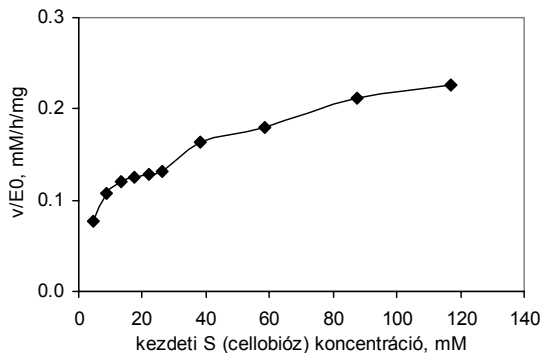
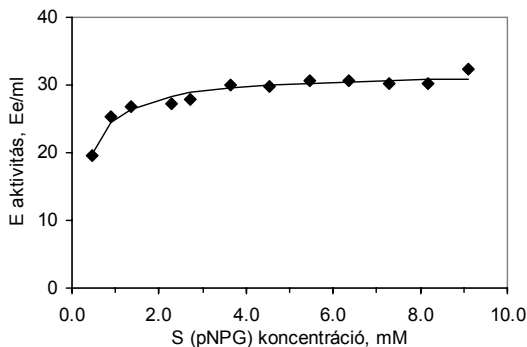
a)
I.



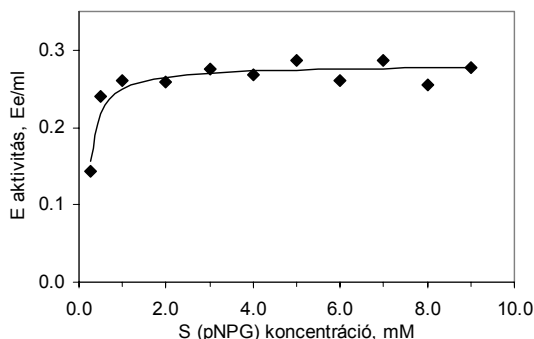
b)



II.



III.



4.18 ábra Alkalmazott enzimek β -glükózidáz komponensének szubsztrát inhibíciós vizsgálata
a) pNPG, b) cellobióz szubsztráton. I. Novozym 188 kereskedelmi enzim, *Aspergillus* eredetű β -glükózidáz;
II. Celluclast 1.5L kereskedelmi enzim, *Trichoderma* eredetű β -glükózidáz;
III. *T. reesei* Rut C30 fermentlé (Tr SPWS) β -glükózidáz.

4.2. táblázat Cellobióz hidrolízis paraméterei Novozym 188 és Celluclast 1.5L kereskedelmi enzimek, valamint *T. reesei* RutC30 (irodalmi adat) β -glükózidázokra

	eredet	S konc., mM	k_3 , mM/h/mg	K_m , mM	K_I , mM
Novozym 188	<i>Aspergillus</i>	<13	10,77	1,42	2,38
Celluclast 1.5 L	<i>Trichoderma</i>	<27	0,14	13,22	27,47
Celluclast 1.5 L	<i>Trichoderma</i>	>27	0,32	30,76	6,45
<i>T. reesei</i> RutC30	<i>Trichoderma</i>	<27	0,62	0,15	0,21
<i>T. reesei</i> RutC30	<i>Trichoderma</i>	>27	0,01	472,6	32,60

Az *Aspergillus* és a *Trichoderma* eredetű β -glükózidázok eltérő mértékű glükóz inhibíciót mutatnak. Előbbieknél kisebb mértékű termékátlás figyelhető meg, ami a kinetikai paraméterek közül a nagyobb K_I értékekben mutatkozik meg. Azonban méréseink során a két kereskedelmi enzim közül a *Trichoderma* eredetű β -glükózidáz (Celluclast 1.5L) esetén nagyobb K_I értéket tapasztaltunk, mint az *Aspergillus* (Novozym 188) β -glükózidáznál. Érdekes összehasonlítani, hogy a kisebb cellobióz tartományban (<27 mM) a Celluclast 1.5 L β -glükózidáz kisebb, a *T. reesei* RutC30 nagyobb termékátlást mutat, mint nagyobb szubsztrát koncentrációnál (>27 mM). A szubsztráthoz való affinitásuk mindkét esetben kisebb cellobióz koncentrációnál mutat nagyobb értéket (azaz kisebb K_m értéke). A kereskedelmi enzimek közül az *Aspergillus* β -glükózidáz (Novozym 188) kisebb K_m értéke jelzi, hogy maximális hidrolitikus kapacitást kisebb cellobióz koncentrációnál ér el, mint a *Trichoderma* β -glükózidáza (Celluclast 1.5 L). Mint azt előbb láttuk, a Novozym 188 β -glükózidáznál szubsztrát inhibíció figyelhető meg 13 mM cellobióz koncentráció felett. Ennek mértéke a 2. egyenlet ábrázolásával jellemezhető (v/E_0 vs. S), melyből k_3 és K_m ismeretében K_S értéke 26,7 l/mmol-nek adódik.

3.4.5 Enzimes hidrolízis

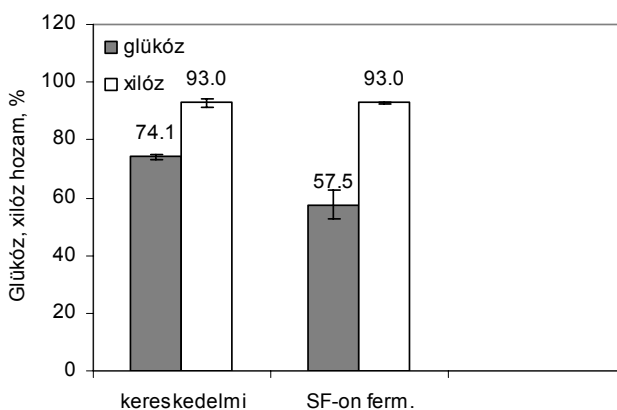
A fent említett, referenciaként alkalmazott kereskedelmi és a *T. reesei* Rut C30 törzssel különböző lignocellulóz szénforrásokon termelt cellulázok hatását különböző szubsztrátok hidrolízisében hasonlítottuk össze. Az azonos enzim/szubsztrát arány biztosítása érdekében az alkalmazott enzimdózis alapja a szűrőpapír-bontó aktivitás (FPA) volt.

Kereskedelmi és fermentált enzimek hidrolitikus képessége

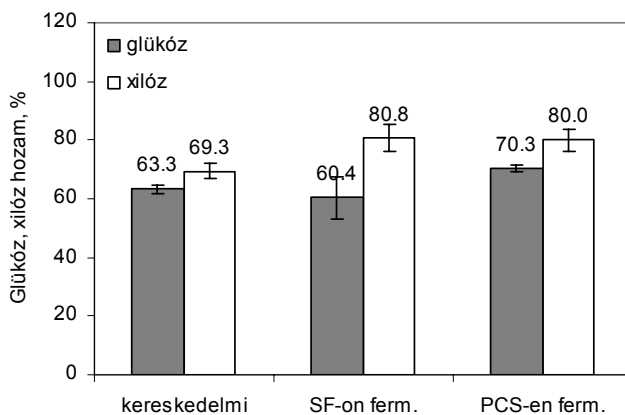
Feltételezések szerint a termelt celluláz-hemicelluláz komplex összetétele változik a különböző szénforrásokon, azaz a hidrolitikus potenciál szubsztrát-specifikus lehet az alkalmazott szénforrás alapján.

A különböző szénforráson termelt enzimekkel különböző szubsztrátokon végzett hidrolízis kísérletek eredményeit a 4.19-4.21 ábrák foglalják össze. A termelt enzimek mellett referenciaként kereskedelmi cellulázt, a fermentációkban referencia szénforrásként SF-ot alkalmaztunk.

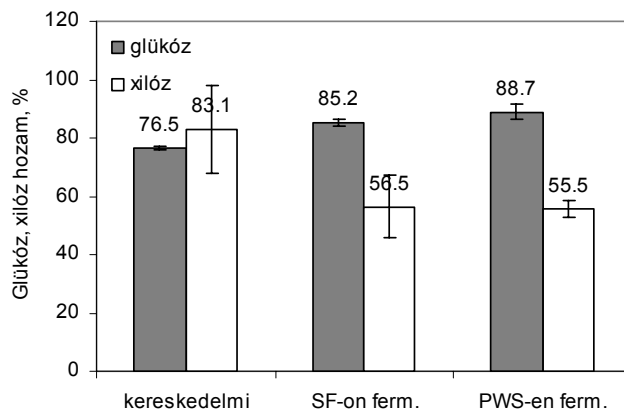
A 48 órás hidrolízisben kapott hozamokat összehasonlítva a gőzrobbantással előkezelt lignocellulózok esetén (SPCS, SPWS) az adott szubsztrátot szénforrásként alkalmazva valóban nagyobb glükóz hozamokat értünk el, tehát valóban megfigyelhető bizonyos szubsztrát-specifikusság. Függetlenül az alkalmazott enzim előállítása során használt szénforrástól, a három vizsgált szubsztrát közül a gőzrobbantott búzaszalma volt a legkönnyebben hidrolizálható.



4.19 ábra Ligninmentesített fenyő (SF) szubsztrát hidrolízise kereskedelmi és SF szénforráson termelt cellulázzal



4.20 ábra Előkezelt kukoricaszár (SPCS) szubsztrát hidrolízise kereskedelmi, SF és SPCS szénforráson termelt cellulázzal



4.21 ábra Előkezelt búzaszalma (SPWS) szubsztrát hidrolízise kereskedelmi, SF és SPWS szénforráson termelt cellulázzal

Bár a hidrolízis kísérletek során az alkalmazott enzimek bemérése azonos celluláz dózis (20 FPU és 20 BGL U/g glükán) alapon történt, a bevitt hemicelluláz aktivitások eltérőek voltak (4.3 táblázat). A vizsgált szubsztrátok közül saját fermentálású enzimekkel az előkezelt búzaszalma (SPWS) xilán-tartalma tűnik a legnehezebben hidrolizálhatónak, ugyanis ebben az esetben nagyobb bevitt xilánáz aktivitás mellett kisebb xilóz hozamokat tapasztaltunk. Azonban ez esetben az előkezelt szubsztrát rostfrakciójának xilóz-tartalma nagyon kicsi, viszont a folyadékfrakció xilóz-tartalma miatt a „0 órás” mintában mérhető xilóz-koncentráció viszonylag nagy, tehát a két érték különbsége meglehetősen nagy relatív hibával számolható.

4.3. táblázat Alkalmazott enzimdózisok

Szubsztrát	Xilán g /100 g sz.a.	Szénforrás	FPU /g glükán	BGL U /g glükán	XYL U /g xilán
SF	14	kereskedelmi	20	20	1.837
		SF	20	20	11.135
SPCS	16	kereskedelmi	20	20	484
		SF	20	20	3.132
SPWS	3	SPCS	20	20	3.807
		kereskedelmi	20	20	3.357
		SF	20	20	21.743
		SPWS	20	20	25.056

Enzimes hidrolízis modellezése

Gőzrobbantott kukoricaszár (SPCS) enzimes hidrolízise

A gőzrobbantott kukoricaszár hidrolízisét kereskedelmi celluláz és β -glükozidáz enzimekkel különböző szubsztrát és enzimkoncentrációk mellett vizsgáltuk. A nyersanyag koncentráció hatását 30 FPU/g cellulóz enzimdózisnál 2, 4, 6, 8, 10% sz.a. tartalom mellett végzett hidrolízisben követtük nyomon.

4.4. táblázat SPCS kiindulási szubsztrát koncentrációk glükóz ekvivalensben (36,7% glükán tartalom)

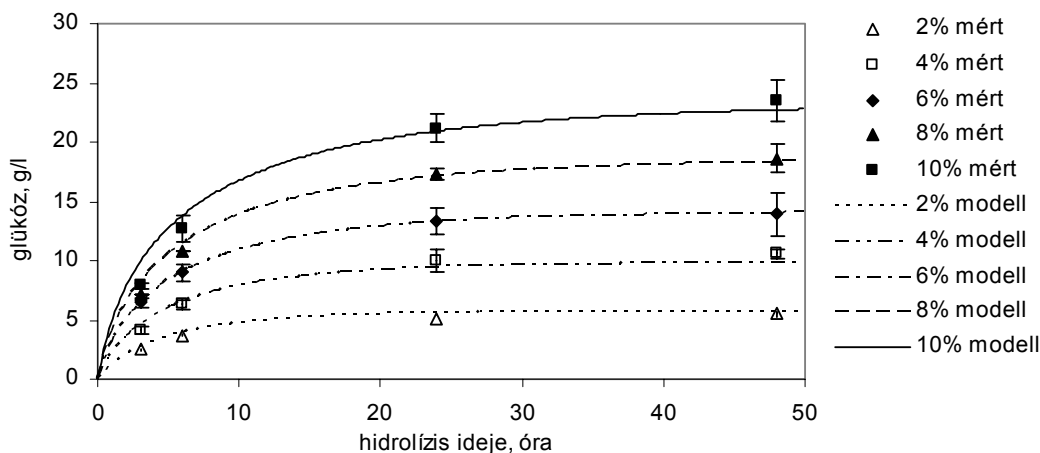
SPCS sz.a. %	g glükóz ekv./l
2	8,3
4	17,0
6	26,0
8	35,4
10	45,2

Az illesztéssel történő paramétermeghatározás során az egyes szubsztrát koncentrációkhoz tartozó mérési pontokra illesztett görbék paraméterei nagy különbségeket mutattak, és az átlaguk sem adott jó illeszkedést. Az egyes adatsorokból kapott paraméterekkel modellezve a többi szintén nem kaptunk jó eredményt. Azt tapasztaltuk, hogy a futtatott görbék platója eltolódik a mérési pontokhoz képest, azok kisebbek a modelltől

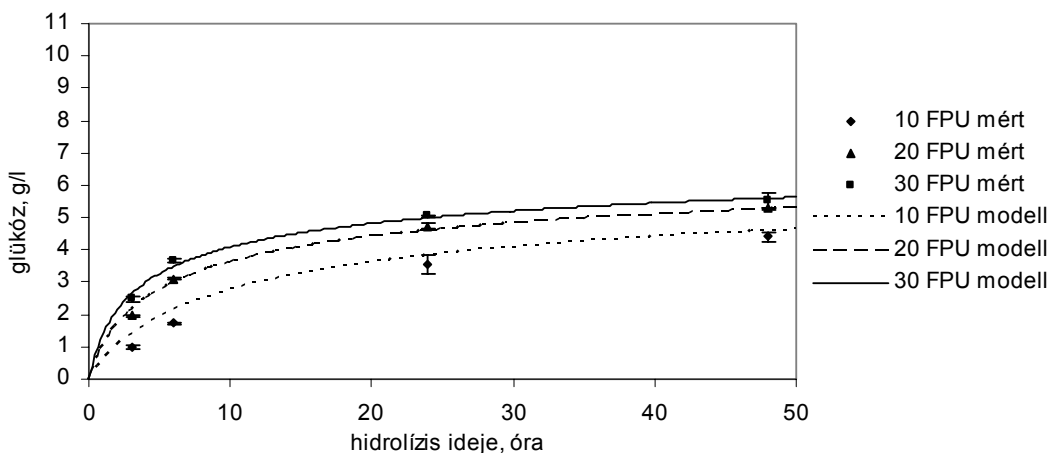
kapottaktól, azaz a cellulóznak csak egy része hidrolizálható. Az un. reaktív szubsztrát koncentrációt egy korrekcióval vettük figyelembe, mely során meghatároztuk a glükóz ekvivalensben vett kiindulási glükóztartalom és a hidrolízis során elért glükózkoncentráció közötti lineáris összefüggést, így a kezdeti érték feltételünk a következőre módosult:

$$C(0)=0,477 \cdot C_0+1,833$$

Ennek felhasználásával az illesztést a 6%-os adatsor pontjaira végeztük el, majd vizsgáltuk a modell jóságát kisebb és nagyobb szubsztrát-koncentrációk esetén (4.22 ábra). A mért adatok és a modell értékei a 4.5. táblázatban találhatóak. A hidrolízis második felében (24, 48 óra) a modell illeszkedése jobb, kisebb relatív hibák jellemzőek. A módosított kezdeti érték feltétellel a modell alkalmasnak bizonyult a szubsztrátkoncentráció változásának leírására.



4.22 ábra Előkezelt kukoricaszár (SPCS) szubsztrát hidrolízise kereskedelmi cellulázzal 2, 4, 6, 8, 10% sz.a. tartalom mellett (30 FPU/g cellulóz enzimdózis)

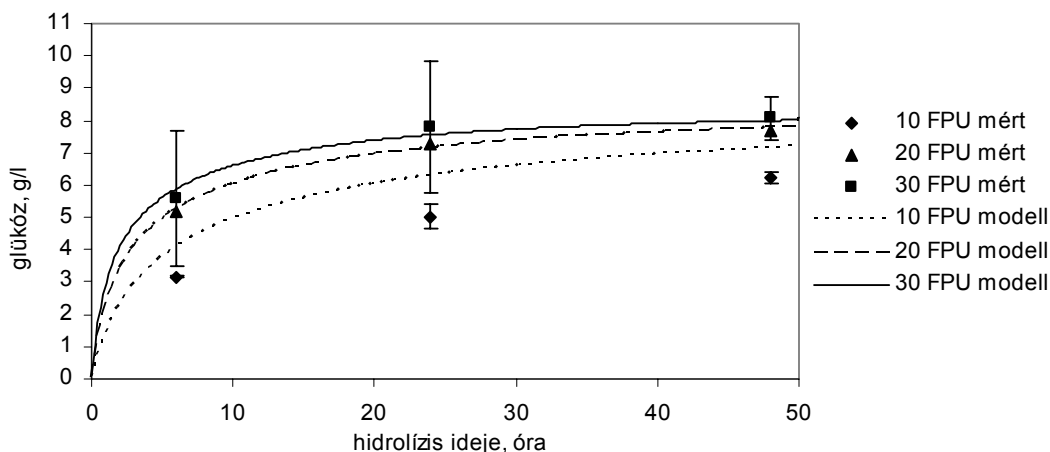


4.23 ábra Előkezelt kukoricaszár (SPCS) szubsztrát hidrolízise kereskedelmi cellulázzal 10, 20, 30 FPU/g cellulóz enzimdózis mellett (2% sz.a. tartalom)

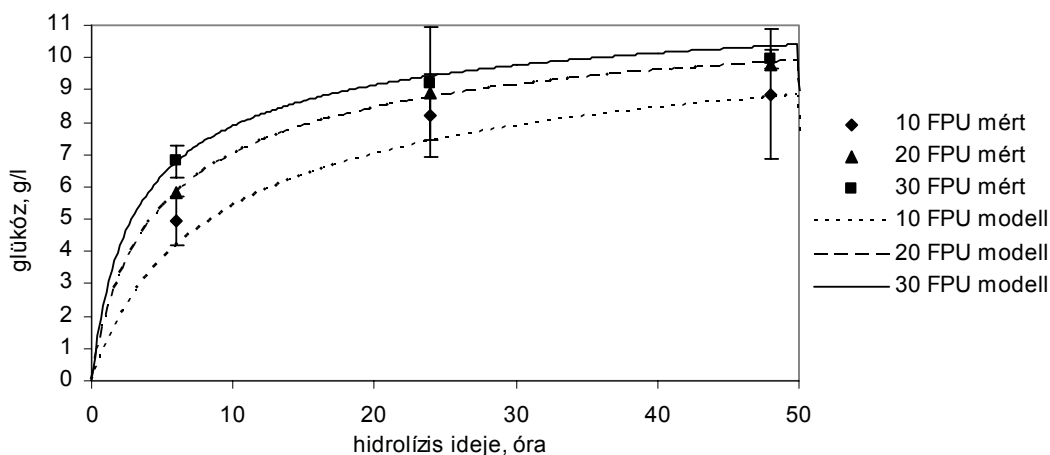
Az enzimdózis hatását 2% sz.a. SPCS szubsztrát koncentrációnál három szinten vizsgáltuk: 10, 20 és 30 FPU/g cellulóz. Ilyen kis szubsztrát koncentrációnál nem volt szükség a kezdeti érték feltétel módosítására. Az illesztést a 20 FPU-s adatsorra végeztük el, és vizsgáltuk a modell jóságát kisebb és nagyobb enzimdózisok esetén. Az eredményeket a 4.23 ábra és a 4.6. táblázat mutatja. A relatív hibák 20 és 30 FPU-nál 7% alatt maradnak, 10 FPU-nál azonban jelentősen rosszabb a modell illeszkedése, főleg a hidrolízis 24 óra előtti szakaszában.

Gőzrobbantott búzaszalma (SPWS) enzimes hidrolízise

A gőzrobbantott búzaszalma (glükán-tartalma 60,0%, 13,3 g/l glükóz ekvivalens) enzimes hidrolízisét 2% sz.a. kiindulási szubsztrát-koncentráció mellett vizsgáltuk. Ebben az esetben mind kereskedelmi, mind az adott szubsztráton fermentált enzimmel elvégeztük a hidrolízist 10, 20 és 30 FPU/g cellulóz enzimdózist alkalmazva (4.24 és 4.25 ábra). Kis szubsztrát koncentráció mellett hidrolizáltunk, így nem módosítottuk a kezdeti érték feltételt. Az illesztések ezen esetekben is a 20 FPU-s adatsorokra történtek.



4.24 ábra Előkezelt búzaszalma (SPWS) szubsztrát hidrolízise kereskedelmi cellulázzal 10, 20, 30 FPU/g cellulóz enzimdózis mellett (2% sz.a. tartalom)



4.25 ábra Előkezelt búzaszalma (SPWS) szubsztrát hidrolízise T.r. RutC30 fermentlével 10, 20, 30 FPU/g cellulóz enzimdózis mellett (2% sz.a. tartalom)

Mind a kereskedelmi, mind a saját fermentálású enzim esetében 20 és 30 FPU-nál jó a modell illeszkedése a mérési pontokra, kis relatív hibák jellemzőek (<6%) (4.7. és 4.8. táblázat). A kereskedelmi enzimre 10 FPU/g cellulóz enzimdózisnál gyenge illeszkedést kaptunk, de a saját enzimmél kis enzimdózisnál is viszonylag jó az illeszkedés, a relatív hibák 16% alatt maradnak.

4.5. táblázat Előkezelt kukoricaszár (SPCS) szubsztrát hidrolízise kereskedelmi cellulázzal 2, 4, 6, 8, 10% sz.a. tartalom mellett mellett (30 FPU/g cellulóz enzimdózis).
Mért (m) és számított (sz) glükóz koncentrációk, relatív hibák (%)

Hidrolízis ideje, óra	2%			4%			6%			8%			10%		
	glükóz, g/l			glükóz, g/l			glükóz, g/l			glükóz, g/l			glükóz, g/l		
	m	sz	%	m	sz	%	m	sz	%	m	sz	%	m	sz	%
3	2,48	2,75	10,8	4,16	4,62	11,0	6,45	6,42	0,5	7,02	8,18	16,5	7,90	9,91	25,4
6	3,68	3,94	7,1	6,28	6,54	4,2	8,98	9,03	0,6	10,38	11,45	10,4	10,82	13,82	27,8
24	5,05	5,58	10,5	9,97	9,43	5,4	13,34	13,26	0,6	17,32	17,10	1,3	21,16	20,95	1,0
48	5,50	5,77	4,8	10,57	9,86	6,7	13,93	14,04	0,8	18,62	18,34	1,5	23,47	22,73	3,1

4.6. táblázat Előkezelt kukoricaszár (SPCS) szubsztrát hidrolízise kereskedelmi cellulázzal 10, 20, 30 FPU/g cellulóz enzimdózis mellett (2% sz.a. tartalom).
Mért (m) és számított (sz) glükóz koncentrációk, relatív hibák (%)

Hidrolízis ideje, óra	10 FPU			20 FPU			30 FPU		
	glükóz, g/l			glükóz, g/l			glükóz, g/l		
	m	sz	%	m	sz	%	m	sz	%
3	0,99	1,33	34,4	1,95	2,08	6,8	2,48	2,59	4,4
6	1,72	2,08	21,0	3,09	2,96	4,2	3,68	3,49	5,2
24	3,53	3,85	9,1	4,73	4,67	1,2	5,05	5,10	1,0
48	4,40	4,67	6,2	5,30	5,38	1,5	5,50	5,73	4,3

4.7. táblázat Előkezelt búzaszalma (SPWS) szubsztrát hidrolízise kereskedelmi cellulázzal 10, 20, 30 FPU/g cellulóz enzimdózis mellett (2% sz.a. tartalom).
Mért (m) és számított (sz) glükóz koncentrációk, relatív hibák (%)

Hidrolízis ideje, óra	10 FPU			20 FPU			30 FPU		
	glükóz, g/l			glükóz, g/l			glükóz, g/l		
	m	sz	%	m	sz	%	m	sz	%
6	1,99	4,10	106,1	5,24	5,26	0,4	5,59	5,89	5,4
24	5,03	6,30	25,3	7,25	7,17	1,2	7,81	7,56	3,2
48	6,23	7,16	15,0	7,66	7,78	1,5	8,07	8,00	0,9

4.8. táblázat Előkezelt búzaszalma (SPWS) szubsztrát hidrolízise T.r. RutC30 fermentlével 10, 20, 30 FPU/g cellulóz enzimdózis mellett (2% sz.a. tartalom).
Mért (m) és számított (sz) glükóz koncentrációk, relatív hibák (%)

Hidrolízis ideje, óra	10 FPU			20 FPU			30 FPU		
	glükóz, g/l			glükóz, g/l			glükóz, g/l		
	m	sz	%	m	sz	%	m	sz	%
6	4,95	4,18	15,6	5,80	5,84	0,6	6,79	6,79	0,1
24	8,20	7,42	9,5	8,89	8,78	1,3	9,20	9,44	2,6
48	8,86	8,77	1,0	9,76	9,85	0,9	9,95	10,36	4,1

Az egyes esetekben illesztett modell paramétereiket a 4.9. táblázat tartalmazza. Gőzrobbantott kukoricaszár (SPCS) esetén az első oszlopban lévő paraméterek 30 FPU/g cellulóz enzimdózis mellett a szubsztrát-koncentráció változás hatásának leírására vonatkoznak. Ebben az esetben a szubsztrát korlátozott hozzáférést figyelembe véve a modell kezdeti érték feltételét módosítottuk. Az SPCS második oszlopában található modell paraméterek az enzimdózis változásának hatását írják le 2% sz.a. szubsztrátkoncentráció mellett.

A gőzrobbantott búzaszalma (SPWS) szubsztráton 2% sz.a. tartalom mellett az enzimdózis változásának hatását leíró modell paramétereit találjuk kereskedelmi és saját fermentálású (T.r. RutC30) enzimek esetén.

4.9. táblázat Illesztett modell paraméterek

	SPCS		SPWS	
	6% sz.a. 30 FPU	2% sz.a. 20 FPU	2% sz.a. 20 FPU	2% sz.a. 20 FPU
Illesztés adatsora	kereskedelmi	kereskedelmi	kereskedelmi	T.r. RutC30 fermentlé
Enzim	módosított	eredeti	eredeti	eredeti
Kezdeti érték feltétel	módosított	eredeti	eredeti	eredeti
k_1	0,118	$5 \cdot 10^{-4}$	-0,106	-0,055
k_2	0,007	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$6,6 \cdot 10^{-7}$	$4,7 \cdot 10^{-6}$
k_3	$2,9 \cdot 10^{-5}$	$9 \cdot 10^{-9}$	$8,1 \cdot 10^{-8}$	$-1,2 \cdot 10^{-9}$
k_4	1,134	4,001	4,865	3,951

3.5 Összefoglalás

A kutatás első lépéseként felmértük a magyarországi mezőgazdasági lignocellulóz melléktermékek technológiai potenciálját. A technológia szempontjából fontos biomassa-komponensek (cellulóz, hemicellulóz, lignin, hamu és extraktanyagok) meghatározására standard analitikai módszert dolgoztunk ki. Megvizsgáltuk a potenciális lignocellulóz nyersanyagok, a búzaszalma és a kukoricaszár összetételét.

Saját kísérleti eredmények és irodalmi adatok alapján vizsgáltuk a lignocellulóz nyersanyagok mikrobiológiai bonthatóságát javító egyes kémiai előkezelések nyersanyag összetételre gyakorolt hatását. Ebben a munkaszakaszban a következő előkezeléseket vizsgáltuk: híg savas, lúgos, nedves oxidáció, gőzrobbantás.

Vizsgáltuk a fermentációs paraméterek enzimermelésre gyakorolt hatását rázatott lombikban, ill. laboratóriumi fermentorban *Trichoderma reesei* Rut C30 fonalas gomba törzssel végzett enzimermentációkban. Összehasonlítottuk az előkezelt nyersanyagokat celluláztermelés szempontjából. Kísérleteinkben a következő paraméterek hatását követtük nyomon: szénforrás minősége, koncentrációja; tápközeg összetétele; tápközeg pH-ja, ill. annak állandósága. A fermentációs kísérletekben kontrollként SolkaFloc (SF, ligninmentesített fenyő) szénforrást alkalmaztunk.

Az előkezelt lignocellulóz szénforrásokon előállított celluláz enzimek biokémiai vizsgálata során összehasonlítottuk végeztünk kereskedelmi forgalomban lévő celluláz enzimmel specifikus aktivitásuk, komponens-összetételük, ill. adszorpciós tulajdonságaik alapján. Az adszorpciós kísérletekben az enzimek viselkedését tiszta cellulóz és előkezelt búzaszalma, valamint kukoricaszár szubsztráton követtük nyomon. Elvégeztük a celluláz enzimerendszer β -glükozidáz komponensei kinetikai jellemzőinek meghatározását.

A celluláz-hemicelluláz fermentáció során alkalmazott szénforrás befolyásolja a termelt enzimek összetételét, azaz a különböző szénforrások nem azonos arányban indukálják az egyes enzim-komponensek termelődését. Annak vizsgálatára, hogy egy adott fermentációs szénforráson termelt enzim-keverék hatékonyabb-e ugyanazon szubsztrát hidrolízisében, kísérleteket végeztünk különböző szénforráson termelt enzimekkel különböző szubsztrátokon. A termelt enzimek mellett referenciaként kereskedelmi cellulázt, a fermentációkban referencia szénforrásként SF-ot alkalmaztunk.

Az előkezelt lignocellulózok hidrolízisét egy, a cellulóz-koncentráció időbeli változását négyparaméteres egyenlettel leíró, az enzim- és a termék-koncentrációt is tartalmazó modellt használtunk. A modell paraméterek meghatározását Berkeley Madonna program segítségével, nem-lineáris illesztéssel végeztük. A modell validálása során különböző szubsztrát- és enzimkoncentrációk mellett vizsgáltuk a modell jóságát.

3.6 Irodalomjegyzék

- 1 Hernádi S., Lele I., Rab A., Vig A., Lepenye Gy., Janowszky J., Új egynyári növény (Ipari fű) a cellulóz- és papíripar számára, Papíripar, 2006, 1. szám, 12-19
- 2 http://www.undp.hu/oss_hu/tartalom/kiadvanyh/kiadvanyh_body/energazd/egk09/egk09_body/09_3fej/09_3fej_body.htm
- 3 KVM, Klímapolitika, A biomassza energetikai alkalmazásának jövője, aktuális problémái, 2007
- 4 Vitainé dr. Rotkó Cecília: Melléktermékek hasznosítása az állatok takarmányozásánál, Mezőgazdaságunk útja az Európai Unióba, 3. füz., 1994
- 5 Medve, J., Cellulose hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: Studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II, Doctoral Dissertation, Lund University, Sweden, 1997
- 6 Wood, T.M., Preparation of crystalline, amorphous and dyed avicel cellulase substrates, W. A. Wood and S. T. Kellog (eds.), Methods in Enzymology, 160, 19-25, Academic Press, San Diego, CA, 1988
- 7 Håggglund, E., Chemistry of wood, Academic Press Inc., Publishers New York, N. Y., 1951, p. 324-327
- 8 Bradford MM., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 1976, 72, 248-54
- 9 Ghose, TK., Measurement of Cellulase Activities, Pure and Applied Chemistry, 1987, 2, 257-268
- 10 Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C., Measurement of Saccharifying Cellulase, Biotechnology & Bioengineering Symposium, 1976, 6, 21-33
- 11 Miller, GL., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Analytical Chemistry, 1959, 31, 426-428
- 12 Bailey, MJ., Biley, P., Poutanen, K., Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity, Journal of Biotechnology, 1992, 23, 257-270
- 13 Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, Electrophoresis, 1988, 9, 255-262
- 14 Zacchi, G., Dahlbom, J., Simulation of continuous and batch hydrolysis of sawlog, Biotechnology and Bioengineering Symposium, 1986, 17:85-96
- 15 Kálmán, G., Varga, E., Réczey, K., Dilute sulphuric acid pretreatment of corn stover at long residence times, Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2002, 16, 151-157
- 16 Varga, E., Schmidt, AS., Reczey, K., Thomsen, AB., Pretreatment of corn stover using wet oxidation to enhance enzymatic digestibility, Applied Biochemistry and Biotechnology, 2003, 104, 37-50
- 17 Varga, E., Reczey, K., Zacchi, G., Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility, Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004, 113, 509-523
- 18 Linde, M., Jakobsson, E-L., Galbe, M., Zacchi, G. Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. Biomass and Bioenergy, 2007, doi:10.1016/j.biombioe.2007.09.013

3.7 Közlemények

Az alábbi publikációkban az OTKA támogatása feltüntetésre került

- Gáspár M. és mtsi, Két út a kukorica rost hasznosítására, „Műszaki Kémiai Napok '05” konferenciakiadvány, 2005
- Réczey I. és mtsi, Etanol előállítás lignocellulózokból, „Műszaki Kémiai Napok '05” konferenciakiadvány, 2005
- Dienes D. és mtsi, *Trichoderma reesei* alkalikus szerin proteáz azonosítása és jellemzése, „Műszaki Kémiai Napok '05” konferenciakiadvány, 2005
- Kádár Zs. és mtsi, Microbial production of biofuels from wastes, „1st Central European Forum for Microbiology (CEFARM)” konferenciakiadvány, 2005
- Kádár Zs. és mtsi, Effect of inhibitors of pretreated lignocellulosic biomass on the ethanol yield, “14th European Biomass Conference and Exhibition, Biomass for Energy and Climate Protection” konferenciakiadvány, 2005
- Réczey K. és mtsi, Integrated process scheme for on-site production of cellulase enzymes in the lignocellulose to ethanol process using wet oxidised corn stover as the substrate, „14th European Biomass Conference and Exhibition, Biomass for Energy and Climate Protection” konferenciakiadvány, 2005
- Gáspár M. és mtsi, Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production, „27th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals” konferenciakiadvány, 2005, poszter
- Kálmán G. és mtsi, Novel approach of corn fiber utilization, „27th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals” konferenciakiadvány, 2005
- Szijártó N. és mtsi, Előkezelt kukoricaszár hemicellulóz frakciójának hasznosítása celluláz enzim előállítására, „Műszaki Kémiai Napok '06” konferenciakiadvány, 2006
- Szijártó N. és mtsi, Integrated process for on-site production of cellulose degrading enzymes in the lignocellulose to ethanol process using wet oxidized corn stover as the substrate, „14th European Biomass Conference – Biomass for Energy, Industry and Climate Protection 2005” konferenciakiadvány, 2006
- Dienes D. és mtsi, Production of *Trichoderma reesei* Cel7B and its catalytic core on glucose medium and its application for the treatment of secondary fibers, Process Biochemistry, 2006
- Dienes D. és mtsi, Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414, Enzyme and Microbial Technology, 2006
- Benkő Zs. és mtsi, Heat extraction of corn fiber hemicellulose, Applied Biochemistry and Biotechnology (28th Symposium Proceedings issue), 2007
- Benkő Zs. és mtsi, Hemicellulázok hatása lignocellulózok enzimes degradációjára, „XXX. Kémiai Előadói Napok Tudományos Szimpózium” konferenciakiadvány, 2007
- Benkő Zs. és mtsi, *Trichoderma reesei* fermentációja alternatív szubsztrátokon, „Műszaki Kémiai Napok '07” konferenciakiadvány, 2007
- Benkő Zs. és mtsi, The role of xyloglucan hydrolysis in the total hydrolysis of lignocellulosic materials, North Carolina State University/ Helsinki area Institutes workshop, Helsinki, Finland, valamint European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE) Scientific meeting, Iasi, Romania, 2007, poszter
- Benkő Zs. és mtsi, How can xyloglucanase enhance the total hydrolysis of lignocellulosic substrates?, 29th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Denver, CO, USA, 2007, absztrakt, poszter
- Dienes D. és mtsi, *Trichoderma reesei* alkalikus szerin proteáz azonosítása és jellemzése, KÉKI kollokvium, konferenciakiadvány, 2007, absztrakt
- Benkő Zs. és mtsi, Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates, Enzyme and Microbial Technology, 2008
- Dienes D. és mtsi, Etanol lignocellulózokból - Az enzimszisztéma összetételének hatása a lignocellulózok hidrolízisére, Műszaki Kémiai Napok '08, Veszprém, konferenciakiadvány, 2008, absztrakt
- Barta Zs. és mtsi, Kinetic modelling of enzymatic hydrolysis of agricultural residues, First European Workshop on Biotechnology for Lignocellulose Biorefineries, Koppenhága, Dánia, 2008, absztrakt, poszter
- Dienes D. és mtsi, Effect of medium carbon source on the hydrolytic potential of cellulases, 30th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, New Orleans, LA, USA, 2008, absztrakt, poszter
- Gyalai-Korpos M. és mtsi, Looking for feedstock – Bioethanol potential in Hungary, 16th European Biomass Conference and Exhibition, Feria Valencia, Spanyolország, 2008, poszter